

Benzochinony i saponozydy triterpenowe w *Lysimachia vulgaris* L.

Rozprawa doktorska

Irma Podolak †

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095196

Promotor: doc. dr hab. Zbigniew Janeczko

Pracę wykonano w Katedrze Farmakognozji
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków 1997

Pragnę podziękować mojemu Promotorowi,
Panu doc. dr hab. Zbigniewowi Janeczko,
kierownikowi Katedry Farmakognozji C.M.U.J.,
za poświęcony czas, pomoc w przezwyciężaniu
trudności eksperymentalnych oraz za wiele
cennych dyskusji.

Koleżankom i Kolegom z Katedry
Farmakognozji dziękuję za stworzenie bardzo
miłej atmosfery.

Spis treści

| | |
|--|----|
| I Część teoretyczna | 1 |
| 1 Saponozydy triterpenowe | 1 |
| 1.1 Definicja i rys historyczny | 1 |
| 1.2 Biogeneza | 2 |
| 1.3 Budowa chemiczna | 6 |
| 1.4 Właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczna | 15 |
| 1.5 Analiza fitochemiczna | 17 |
| 1.5.1 Metody identyfikacji | 17 |
| 1.5.2 Izolacja | 18 |
| 1.5.3 Analiza strukturalna | 20 |
| 1.6 Aktywność farmakologiczna | 25 |
| 1.6.1 Elementy biofarmacji i farmakokinetyki saponozydów | 36 |
| 1.7 Rozpowszechnienie | 37 |
| 1.7.1 Lokalizacja, zawartość i rola w roślinie | 38 |
| 1.8 Saponozydy w rodzinie <i>Primulaceae</i> | 40 |
| 2 Benzochinony | 44 |
| 2.1 Wprowadzenie | 44 |
| 2.2 Budowa, biogeneza i właściwości fizykochemiczne | 48 |
| 2.3 Metody izolacji z elementami badań strukturalnych | 52 |
| 2.4 Aktywność farmakologiczna i właściwości biologiczne | 53 |
| 2.5 Rozpowszechnienie | 56 |
| 3 <i>Lysimachia vulgaris</i> L. | 58 |
| 3.1 Etymologia | 58 |
| 3.2 Systematyka | 60 |
| 3.3 Opis morfologiczny z elementami budowy anatomicznej | 63 |
| 3.4 Występowanie | 66 |
| 3.5 Aktywność farmakologiczna | 68 |
| 3.5.1 Toksyczność | 70 |
| 3.6 Skład chemiczny | 71 |
| II Założenia i cel pracy | 73 |
| III Dyskusja | 74 |
| 1 Omówienie wyników badań | 74 |
| 1.1 Podsumowanie | 85 |

| | |
|--|-----|
| 2 Wnioski | 87 |
| IV Badania własne | 88 |
| 1 Aparatura i metody | 88 |
| 1.1 Testy jakościowe | 88 |
| 1.2 Metody chromatograficzne | 88 |
| 1.2.1 Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) | 88 |
| 1.2.2 Chromatografia kolumnowa (CC) | 89 |
| 1.2.3 Chromatografia gazowa (GC) | 90 |
| 1.3 Metody spektralne | 91 |
| 1.4 Inne metody | 91 |
| 2 Wstępna analiza fitochemiczna surowca | 92 |
| 2.1 Próby jakościowe | 92 |
| 2.2 Badania chromatograficzne (TLC) poszczególnych części morfotycznych rośliny | 92 |
| 2.3 Analiza porównawcza (TLC) części podziemnych <i>Lysimachia vulgaris</i> L. zebranych w różnych okresach wegetacji | 94 |
| 2.3.1 Analiza wyciągu chloroformowego | 94 |
| 2.3.2 Analiza wyciągu metanolowego | 96 |
| 3 Izolacja saponozydów i benzochinonów | 98 |
| 3.1 Materiał do izolacji | 98 |
| 3.2 Ekstrakcja | 98 |
| 3.2.1 Ekstrakcja chloroformowa | 98 |
| 3.2.2 Ekstrakcja metanolowa | 98 |
| 3.3 Chromatografia kolumnowa | 100 |
| 3.3.1 Rozdział chromatograficzny (CC) benzochinonów | 100 |
| 3.3.2 Rozdział chromatograficzny (CC) saponozydów | 100 |
| 3.3.2.1 Etap I - wstępne oczyszczanie | 100 |
| 3.3.2.2 Etap II - oczyszczanie frakcji f_A , f_B , f_C i f_D na tlenku glinu. | 102 |
| 3.3.2.2.1 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd A | 102 |
| 3.3.2.2.2 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd B | 102 |
| 3.3.2.2.3 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd C | 102 |
| 3.3.2.2.4 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd D | 102 |
| 3.3.2.3 Etap III - otrzymanie czystych saponozydów | 103 |
| 4 Badania strukturalne wyizolowanych związków | 105 |
| 4.1 Benzochinony | 105 |
| 4.1.1 Acetylacja | 105 |
| 4.1.2 Metylacja | 105 |
| 4.1.3 Utlenienie nadmanaganianem potasu i metylacja powstałych kwasów tłuszczowych | 105 |
| 4.2 Saponozydy | 106 |
| 4.2.1 Hydroliza gazowym chlorowodorem na płytce chromatograficznej | 106 |
| 4.2.1.1 Identyfikacja aglikonów | 106 |
| 4.2.1.2 Identyfikacja cukrów | 106 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.2 Hydroliza kwaśna saponozydu B | 109 |
| 4.2.2.1 Analiza produktów hydrolizy kwaśnej saponozydu B | 109 |
| 4.2.3 Hydroliza częściowa saponozydu B | 109 |
| 4.2.3.1 Analiza cukrów prosapogenin saponozydu B | 109 |
| 4.2.4 Metylacja saponozydu B metodą Hakomori [287,115] | 110 |
| 4.2.4.1 Hydroliza kwaśna zmetylowanego saponozydu B | 110 |
| 4.2.4.2 Przeprowadzenie częściowo zmetylowanych cukrów saponozydu B w octany alditoli. | 110 |
| 4.2.5 Hydroliza alkaliczna saponozydu A | 111 |
| 4.2.5.1 Analiza prosapogeniny po hydrolizie alkalicznej saponozydu A | 111 |
| 4.2.5.1.1 Hydroliza prosapogeniny saponozydu A gazowym chlorowodorem na płytce chromatograficznej – analiza części cukrowej | 111 |
| 4.2.5.1.2 Metylacja prosapogeniny saponozydu A i analiza zmetylowanych cukrów po hydrolizie gazowym chlorowodorem na płytce chromatograficznej | 111 |
| 4.2.5.2 Analiza cukrów pozostałych w fazie wodnej po hydrolizie alkalicznej saponozydu A | 112 |
| 4.2.5.2.1 Metylacja oligosacharydu A i analiza zmetylowanych cukrów po hydrolizie gazowym chlorowodorem na płytce chromatograficznej | 112 |
| 5 Wyniki analiz fizykochemicznych i spektralnych | 113 |
| 5.1 Substancja BQ | 113 |
| 5.2 Saponozyd B | 115 |
| 5.3 Saponozyd A | 118 |
| 6 Badania aktywności biologicznej | 121 |
| Bibliografia | 123 |
| Spis widm | 137 |

I Część teoretyczna

1 Saponozydy triterpenowe

1.1 Definicja i rys historyczny

Saponozydami czy saponinami zwykło się określać grupę związków glikozydowych mających zdolność pienienia w roztworach wodnych. Właściwość tę odzwierciedla nadana im nazwa, wywodząca się od łacińskiego *sapo* czyli mydło. Innymi cechami, które uważano za właściwe saponozydom, są zdolność do hemolizy krwinek czerwonych, tworzenie kompleksów z cholesterolem oraz toksyczność dla ryb i innych wodnych organizmów zimnokrwistych [256,100].

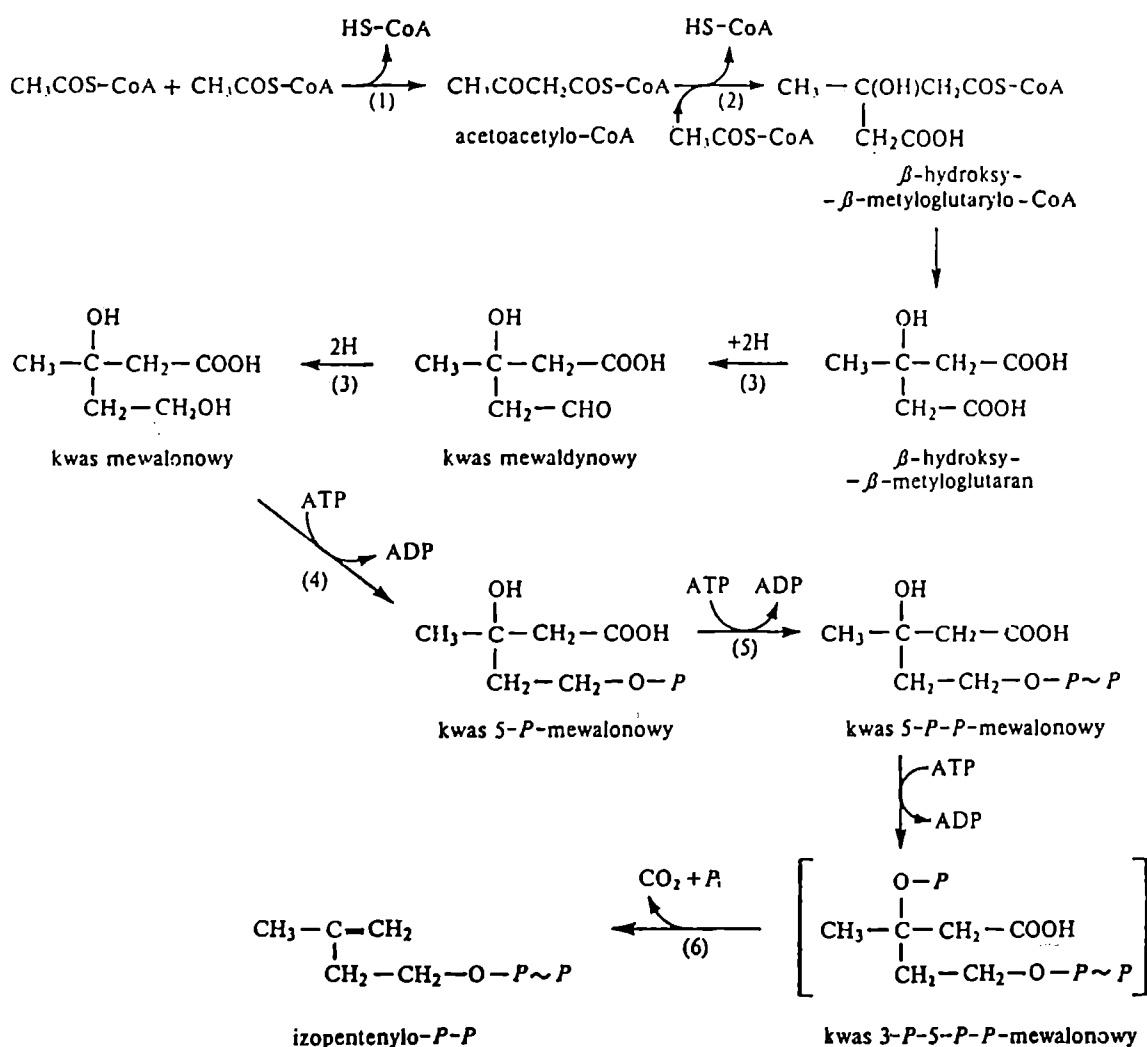
Surowce zawierające te związki były od wieków wykorzystywane głównie jako detergenty oraz w połowach ryb. O metodzie tej wspomina już Arystoteles, a w niektórych rejonach świata stosowana jest ona do dnia dzisiejszego, np. z bogatej w saponiny kory *Myrsine pellucida* korzystają rybacy indiańskiego plemienia Chiriguano z boliwijskiej prowincji Chaco [158].

Klasyczna definicja opierająca zasadę klasyfikacji do saponozydów na w/w właściwościach fizykalnych i biologicznych nie jest całkowicie jednoznaczna, między innymi ze względu na fakt iż trwałą pianę tworzą również białka. Z kolei za aktywność hemolityczną wyciągu metanolowego z popularnego surowca leczniczego *Viola tricolor* L., przypisywaną obecności saponin, odpowiedzialny jest związek peptydowy [241].

Współcześnie przyjmuje się system klasyfikacji uwzględniający przede wszystkim budowę chemiczną. Wszystkie saponozydy są więc strukturami, w których wyodrębnia się część cukrową tzw. glikon, oraz niecukrową zwaną aglikonem czy sapogeniną. Budowa tej ostatniej determinuje przynależność związku do jednej z trzech klas, a mianowicie: saponozydów steroidowych, sterydoalkaloidowych (z heterocyklicznie wbudowanym w układ steranu azotem) względnie **triterpenowych**.

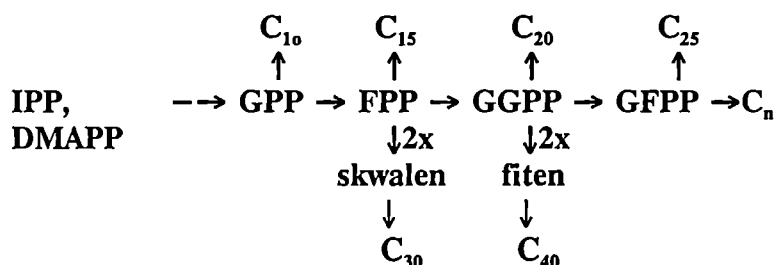
1.2 Biogeneza

Aglikony saponozydów triterpenowych, a także steroidowych, są biogenetycznie włączone w centralny szlak produkcji naturalnych terpenoidów. Reguła rządząca tworzeniem poszczególnych klas związków od hemiterpenów do politerpenów, opracowana przez Ruzickę [cyt. wg. 22], zakłada istnienie wspólnego prekursora będącego rozgałęzionym pięciowęglowym układem. Tą podstawową jednostką nie jest jednak naturalnie występujący izopren, lecz powstały wskutek przemian produktu glikolizy – kwasu pirogronowego (poprzez m.in. tzw. aktywny octan i kwas mewalonowy) pirofosforan izopentenyłu (IPP).



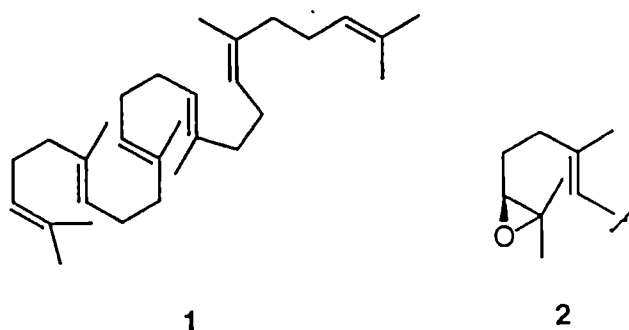
Rys.1 Schemat biosyntezy difosforanu izopentenyłu; 1 - acetylotransferaza acetylo -S-CoA, 2 - syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-S-CoA, 3 - reduktaza hydroksymetyloglutarylo-S-CoA, 4 - kinaza mewalonianowa, 5 - kinaza fosfomewalonianowa, 6 - dekarboksylaza mewalonilo-5-difosforanowa [123].

Centralna droga biogenetyczna, utworzona przez kolejną addycję reszt IPP do tzw. startera czyli pirofosforanu 3,3-dimetyloallilu (DMAPP), prowadzi przez pirofosforan geranylu GPP do monoterpenów (C_{10}), przez pirofosforan 2E,6E-farnezylu FPP do sesquiterpenów (C_{15}), przez pirofosforan 2E,6E,10E-geranylogeranylu GGPP do diterpenów (C_{20}) i w końcu przez pirofosforan 2E,6E,10E,14E-geranylofarnezylu GFPP do sesteroterpenów (C_{25}).



Rys.2 Centralna ścieżka biosyntezy terpenoidów [22].

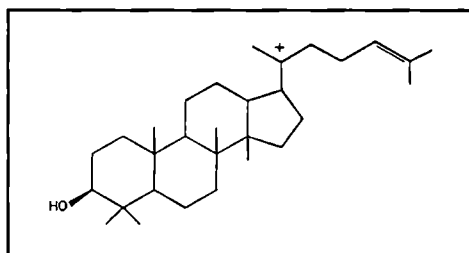
Dwa wewnętrzne ogniwa tego prostego szlaku tworzą u roślin i niektórych mikroorganizmów odgałęzienie boczne. I tak, przy GGPP oddziela się ścieżka pięciowęglowych dobudowań prowadząca w efekcie do politerpenów, a ponadto poprzez redukcyjną kondensację dwóch jego cząsteczek dochodzi do powstania fitenu i dalej tetraterpenów (C_{40}). Kluczową pozycją szlaku biogenetycznego triterpenoidów (C_{30}) jest FPP. W wyniku jego kondensacji (2 cząsteczki) tworzy się skwalen. Jeden z jego izomerów, w którym atomy wodoru i grupy metylowe przy wiązaniach podwójnych znajdują się w pozycji *trans*, określany jest jako układ macierzysty, bowiem w rezultacie rozmaitych przekształceń daje on początek wielkiej liczbie struktur trzydziestowęglowych, w tym aglikonom saponozydów [47,22,31]. Ich różnorodność jest zdeterminowana, zarówno typem konformacji przyjętej przed cyklizacją jak i tym, czy układem macierzystym jest sam skwalen (co ma miejsce u *Prokaryota*) czy 3S izomer jego epoksydu (w organizmach należących do *Eukaryota*). W tym drugim przypadku otrzymujemy bowiem 3 β -hydroksytriterpenoidy, a z nich poprzez ewentualne dalsze przekształcenia 3 α -hydroksytriterpenoidy. Epoksydacja u roślin wyższych zachodzi przy udziale specyficznej cytoplazmatycznej monooksygenazy [31].



Rys.3 Skwalen (1) i jego epoksyd (2).

Produktem cyklizacji epoksydu skwalenu są tzw. kationy pośrednie, które ulegają serii transformacji w obrębie szkieletu, obejmujących głównie migracje grup metylowych i wodorów [47].

Należy wspomnieć, że biogeneza triterpenów jest ściśle powiązana z biogenezą steroidów, albowiem cyklizacja epoksydu skwalenu w konformacji krzesło–łódka–krzesło–łódka prowadzi poprzez **kation protostanu** do lanostanów, które są ich prekursorami. W organizmach zwierzęcych wymaga to udziału cykazy 2,3–oksydoskwalenu. Produktem cykazy u roślin jest cykloartan, z którego dopiero poprzez otwarcie pierścienia cyklopropylowego tworzy się lanostan, a także kukurbitan [75].

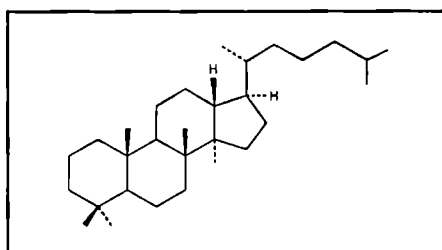


Rys.4 Kation pośredni protostanu.

Układy powstałe z przekształceń protostanu pojawiają się jako geniny saponozydów triterpenowych niezmiernie rzadko. Pochodne lanostanowe zidentyfikowano np. w *Cimicifuga dahurica* [248] czy *Pistacia integerrima* [12], przede wszystkim jednak źródłem związków o szkielecie lanostanu z pierścieniem γ –laktonowym tworzącym tzw. holostan są morskie bezkręgowce *Echinodermata* (holoturynozydy A–D [229]). Z kolei z cykloartanów wywodzą się np. saponozydy z *Astragalus trigonus*, *Passiflora quadrangularis* [239]), *Thalictrum sp.* [319] czy *Juncus effusus* [48], a z kukurbitanów np. glikozydy dihydrokukurbitacyny F z *Hemsleya panacis-scandens*) [239].

Równie rzadkie są saponozydy o szkielecie hohanu, powstałe poprzez cyklizację skwalenu w konformacji krzesło–krzesło–krzesło–krzesło–krzesło. Sa one spotykane jedynie u kilku przedstawicieli fauny [100].

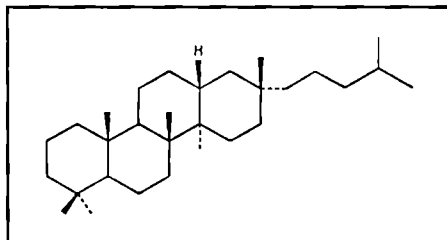
Cyklizacja w konformacji krzesło–krzesło–krzesło–łódka prowadzi natomiast do tzw. **kationu dammaranu**. Stanowi on punkt wyjścia produkcji tetracyklicznych aglikonów



Rys.5 Dammaran.

charakterystycznych zwłaszcza dla rodzaju *Panax*, *Gynostemma*, *Bacopa*, czyli dammaranów, a ponadto eufanów i apotirukanów, będących prekursorami gorzkich kwasynoidów i limonoidów.

Zdecydowana większość saponozydów triterpenowych wywodzi się z **kationu bakcharanu**, utworzonego także w wyniku cyklizacji epoksydu skwalenu w konformacji krzesło–krzesło–krzesło–łódka.



Rys.6 Bakcharan.

Jego przekształcenia prowadzą do pentacyklicznych triterpenów z pięcio– (szkielet lupanu) lub sześćo– (szkielet oleananu) członowym pierścieniem E. Najrzadsze w tej grupie są pochodne samego bakcharanu, nieliczne przykłady to hosenkozydy F–K, wyizolowane w 1994 roku z *Impatiens balsamina* [257]. Nieco więcej jest saponozydów lupanowych ale aż ponad 50% wszystkich znanych sapogenin zawiera szkielet oleananu [100].

1.3 Budowa chemiczna

Wszystkie saponozydy zbudowane są z policyklicznego aglikonu, zwanego też sapogeniną czy geniną, połączonego z co najmniej jednym łańcuchem cukrowym tworzącym część glikonową. **Glikozydy triterpenowe** stanowią najliczniejszą i najbardziej rozpowszechnioną grupę. Zidentyfikowano ich dotychczas ponad 1000.

Podstawowy szkielet aglikonu zbudowany jest zazwyczaj z 30 węgli, chociaż spotkać można 29 czy 31 węglowe (np. saponozyd dammaranowy z *Amelozizyphus amazonicus* [30]). Ma on albo strukturę pięciopierścieniową albo czteropierścieniową. W położeniu C-3 występuje grupa hydroksylowa, zazwyczaj w pozycji β rzadziej α , i to ona najczęściej pełni rolę ogniwa łączącego geninę z glikonem.

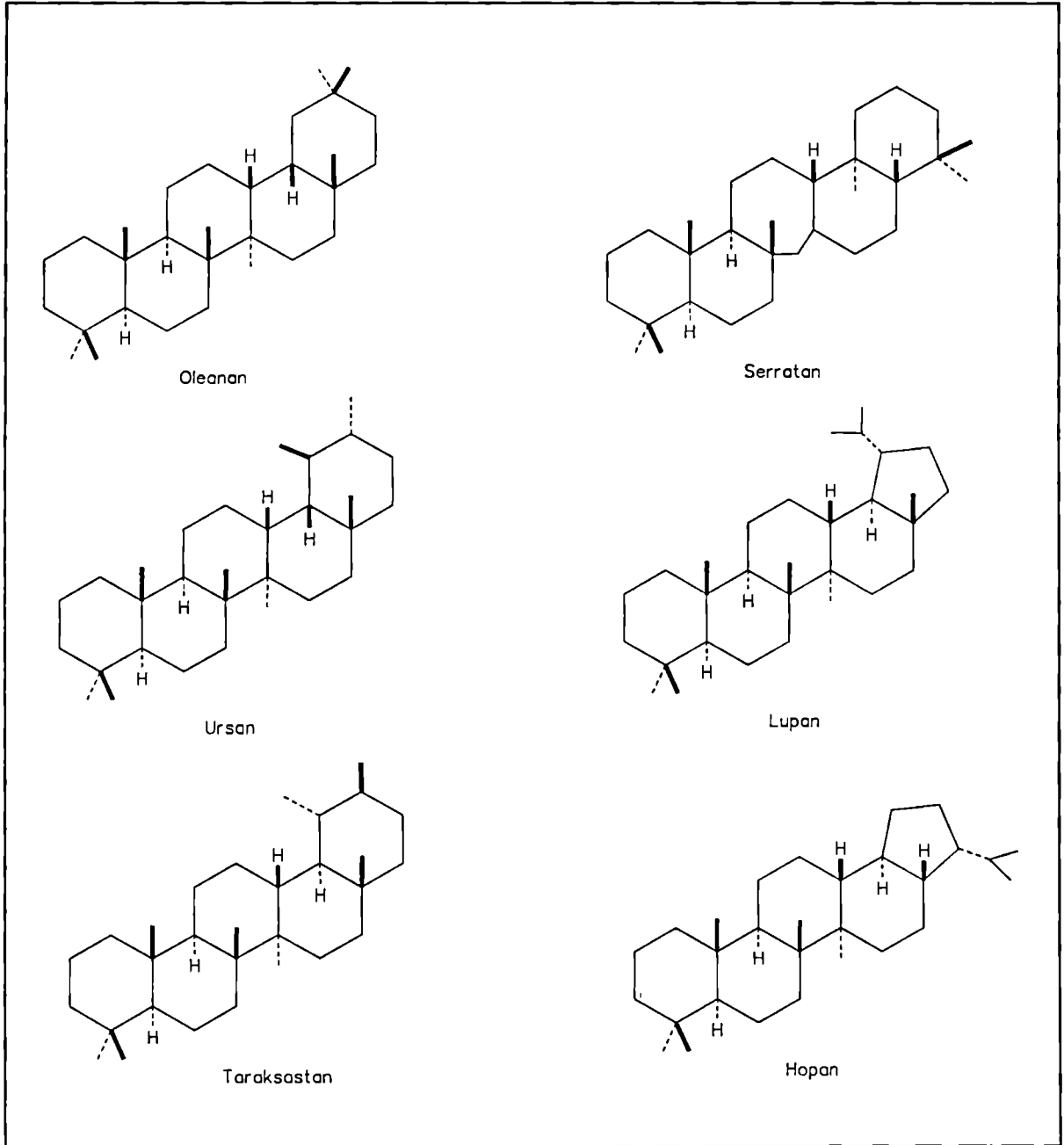
Wśród sapogenin pentacyklicznych (Rys.7) wyróżnia się zasadniczo następujące typy:

- o sześciowęglowych pierścieniach A,B,C,D,E
 - oleanan**
 - ursan**
 - taraksastan**
- o pięciowęglowym pierścieniu E
 - lupan**
 - hopan**
- z siedmiowęglowym pierścieniem C
 - serratan**

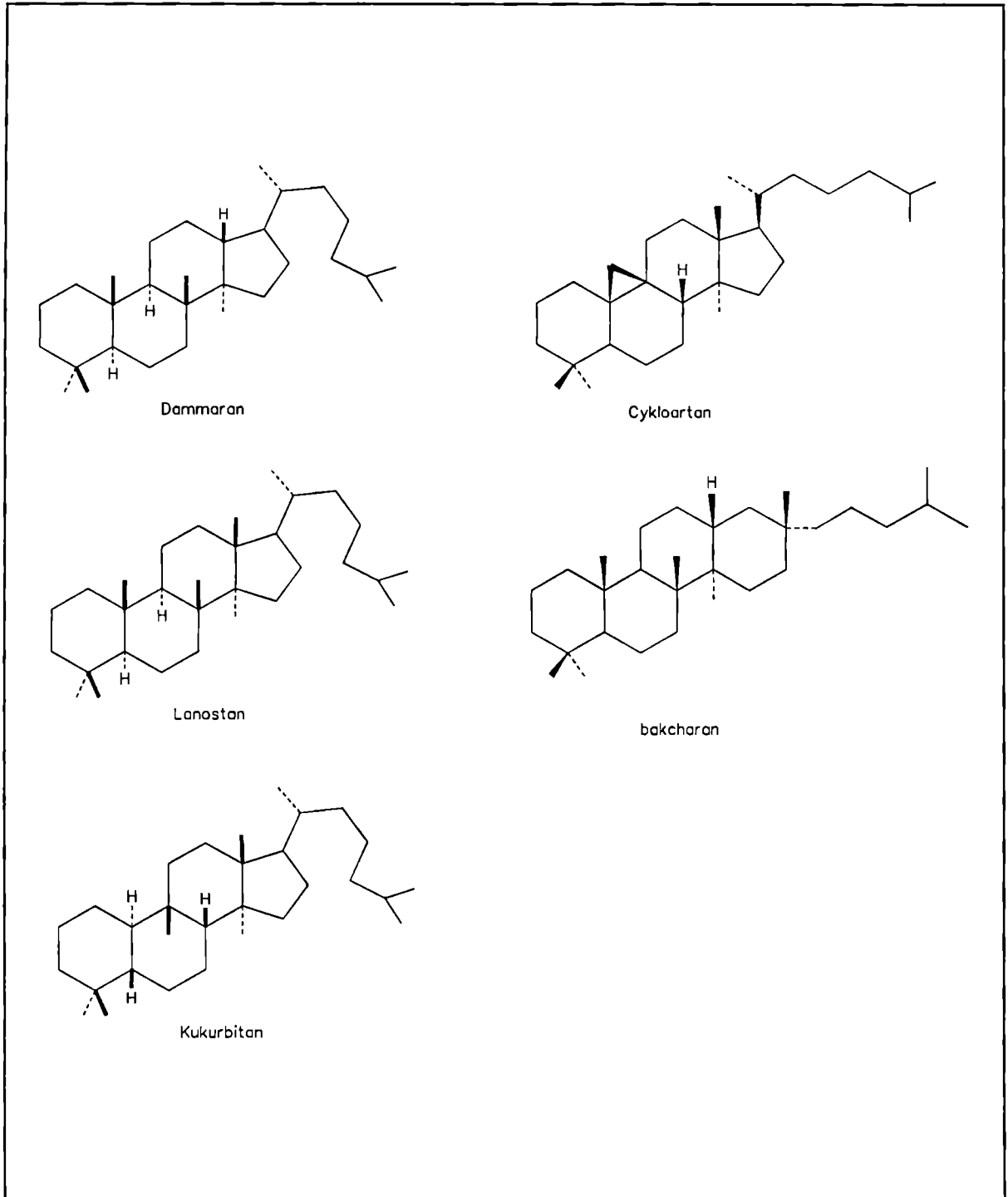
Pierścienie od A do D przybierają zazwyczaj formę krzesłową w konfiguracji *trans,anti,trans,anti* natomiast D i E *trans* (w przypadku gdy ten ostatni jest nienasycony) lub *cis* (jeśli wiązanie podwójne znajduje się w którymś z pierścieni od A–D) [31].

Wśród aglikonów tetracyklicznych (Rys.8) spotykane są typy:

dammaranu
lanostanu
kukurbitanu
cykloartanu
bakcharanu
holostanu [229]

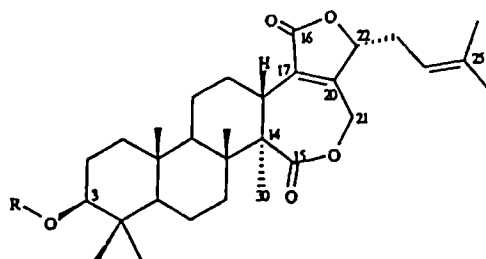


Rys.7 Sapogeniny pentacykliczne.



Rys.8 Sapogeniny tetracykliczne.

Z dammaranu wywodzą się opisane przez Oulad [207] geniny mabiozydów A, C i D, o czwartym pierścieniu będącym cyklicznym laktonem.

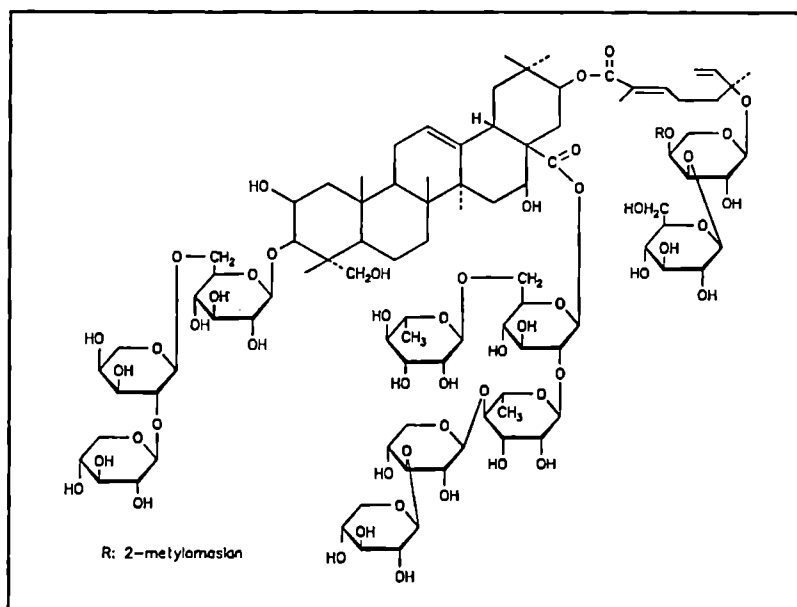


Rys.9 Mabiozyd A.

Zdecydowaną większość glikozydów triterpenowych to pochodne oleananu (inaczej β -amyryny), najrzadziej spotyka się saponozydy holostanowe i bakcharanowe. Pięć pierścieni szkieletu oleananu występuje w konfiguracji *trans-anti trans-trans-syn-cis*. Obok grup metylowych C-25, C-26, C-27 i C-28 bardzo charakterystyczne są dwie pary tzw. grup geminalnych lub bliźniaczych C-24/C-23 oraz C-29/C-30. Często w tych pozycjach spotyka się funkcje tlenowe np. hydroksymetylowe, karboksylowe względnie aldehydowe.

Podstawniki hydroksylowe, obok wspomnianego położenia przy C-3, występują zwłaszcza w pozycji C-15, C-16, C-21 i C-22. Mogą one ulegać utlenieniu do grup CHO czy COOH (zwłaszcza te w pierścieniach D i E w pozycji α) [31] lub być zestyfikowane drobnocząsteczkowymi, alifatycznymi kwasami organicznymi zazwyczaj octowym, masłowym, tyglinowym, angelikowym, ferulowym, cynamonowym. Saponozydy o takich geninach określane są mianem estrowych (np. glikozydy escyny, ranunkozydy I-VI z *Hydrocotyle ranunculoides* [54] czy dodonozydy z *Dodonea viscosa*). Zdarza się, co stwierdzono w awenacynach owsa, iż do grupy hydroksylowej (tu C-21) przyłączone są reszty kwasów aromatycznych np. N-metyloantranilowego czy benzooesowego.

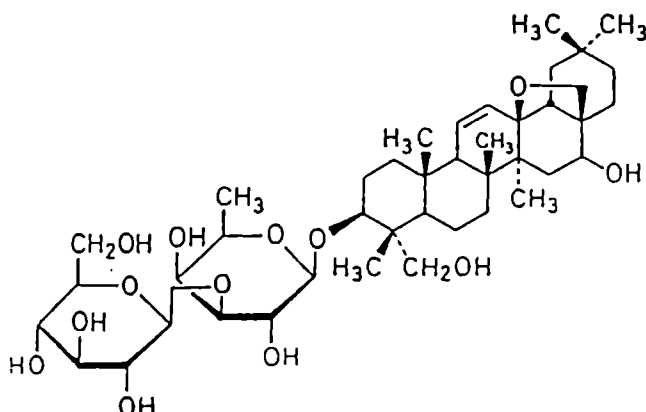
Rzadsze są przypadki obecności innych, niekwasowych rodników, np. reszt terpenoidowych, połączonych przez grupę hydroksylową. Pierwszą strukturą tego typu była gymnokladosaponina G, wyodrębniona w 1986 roku z *Gymnocladus chinensis* (Rys.10) [145]. Odrębną klasę stanowią saponozydy z *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* z rodziny *Fagaceae*. Są to pochodne kwasu oleanolowego i ursolowego, których hydroksylowe podstawniki w pierścieniu A są zestyfikowane charakterystycznymi dla garbników resztami galoilowymi. Równie unikalne są saponozydy o sulfonowanym w pozycji C-3 aglikonie, wyodrębnione w 1985 roku z *Bupleurum rotundifolium* [100,239].



Rys.10 Gymnokladosaponina G.

Pochodne oleananu często zawierają wiązanie podwójne pomiędzy węglami C-12 i C-13, sporadycznie przesunięte jest ono w pozycję Δ^{11} (werbaskogenina [47]). Czasem spotyka się struktury z dwoma wiązaniami podwójnymi np. Δ^{11} i Δ^{13} w songarosaponinach E i F z *Verbascum songaricum* [85], lub z aromatycznym pierścieniem A jak fewikordyna A z *Fevillea cordifolia* [167].

Ciekawą, ze względu na aktywność, grupą są geniny oleananowe z utworzonym przez podstawniki 13β -OH i 28β -CH₂OH pierścieniem tetrahydrofuranu. Ten typ jest charakterystyczny dla saponozydów rodziny *Primulaceae*, *Myrsinaceae*, a także saikosaponin *Bupleurum falcatum* (Rys.11) [100,119,158,296,116,27]. Rzadszą jego odmianą są tzw. sapogeniny laktonowe i hemiacetalowe, posiadające przy węglu C-28 w układzie tetrahydrofuranu grupę ketonową lub hydroksylową. Zidentyfikowano je po raz pierwszy w australijskich gatunkach *Myrsine* [27].



Rys.11 Saikosaponina d.

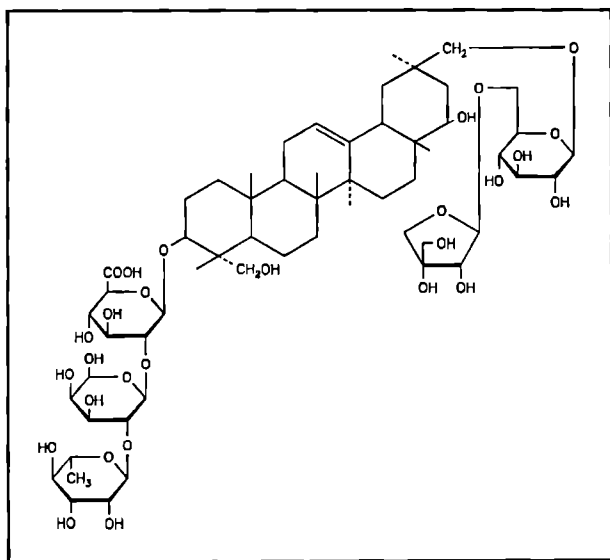
Znane są pochodne oleananowe z ugrupowaniem ketonowym np. melilotigenina z *Melilotus officinalis*, androsacenol z *Androsace saxifragifolia* [239,47].

Równie ciekawe modyfikacje strukturalne, obejmujące np. wewnętrzną laktonizację czy podstawienie różnymi niecukrowymi rodnikami, opisano także dla saponin wywodzących się od ursanu, dammaranu i in.[239,47].

Glikon składa się z co najmniej jednego, a maksymalnie trzech łańcuchów cukrowych. W zależności od ich liczby glikozydy triterpenowe określa się mianem monodesmozydów, bidesmozydów lub tridesmozydów. Te ostatnie należą w zasadzie do wyjątków. Po raz pierwszy stwierdzono je w 1988 roku w *Chenopodium quinoa* (łańcuchy przy C-3, C-23 i C-28 hederageniny [100]). Od tego czasu wyizolowano kilka następnych m.in. solidagosaponiny X-XIII z *Solidago virga-aurea* [111], hosenkozyd K z *Impatiens balsamina* [257].

W **monodesmozydach** łańcuch cukrowy z reguły powiązany jest z aglikonem glikozydowo (eterowo) poprzez grupę hydroksylową przy węglu C-3, w rzadkich przypadkach przez hydroksyl przy węglu C-23 (np. monozyd kwasu arjunolowego z *Anamirta cocculus* [118]) lub estrowo w pozycji C-28 (np. azjatykozyd, saponozydy z *Aphloia madagascariensis* [55], herniariasaponozydy 1 i 2, unikalne sulfonowane rotundiozydy A,B,C, czy galoilowane kastanopsyny A-H [100,239,28,37]).

U większości **bidesmozydów** jeden z łańcuchów powiązany jest eterowo z grupą hydroksylową przy węglu C-3 a drugi wiązaniem acyloglikozydowym z grupą karboksylową najczęściej C-28, rzadziej C-30 (**ardisiakrenozydy C i D** z *Ardisia crenata* [120]). Odmienny układ stwierdzono w kilku saponozydach z *Solidago virga-aurea* (solidagosaponiny III, V, VII), gdzie obok cukrów związanych estrowo (C-28), drugi łańcuch połączony jest poprzez grupę hydroksylową w pozycji C-16 [110].

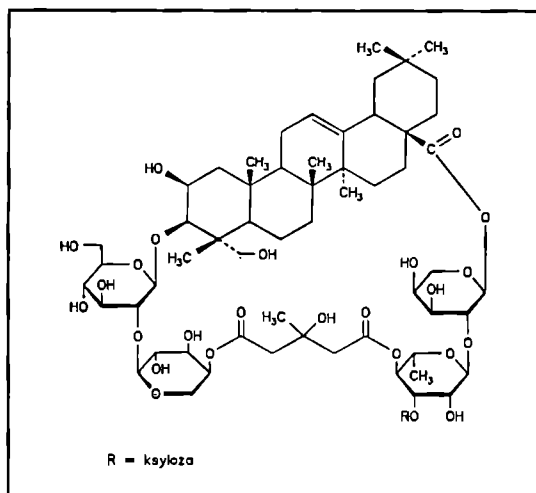


W 1992 roku Cui [49] opisał bidesmozydy abrisapogenolu B z *Robinia pseudo-acacia*. Stwierdził on, iż oba łańcuchy tych związków związane są z geniną eterowo, poprzez resztę hydroksylową przy węglu C-3 oraz C-30 (robiniozydy G i H) lub przy węglach C-3 i C-22 (robiniozydy I i J).

Rys.12 Robiniozyd H.

Kolejnymi przykładami takich "dwuglikozydowych" bidesmozydów są bersimozyd I z *Trifolium alexandrinum* (C-3, C-22) [181] oraz lablab saponina I z *Dolichos lablab*. Ten ostatni saponozyd jest niezmiernie interesujący również ze względu na występujący tu niezwykle cukier tzw. DDMP czyli 2,3-dihydro-2,5-dihydroksy-6-metylo-4H-piran-4-on [318].

W ostatnich latach wyodrębniono też bidesmozydy cykliczne, którym nadano nazwę tubeimozydy I-III. Ogniwem spajającym oba łańcuchy ze sobą jest reszta 3-hydroksy-3-metyloglutaranu [239,127].

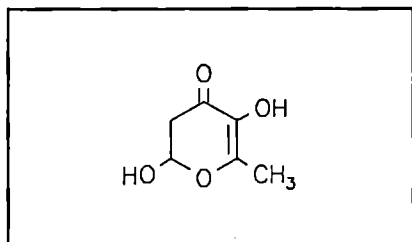


Rys.13 Tubeimozyd 1

W tridesmozydach dwa łańcuchy związane są z sapogeniną glikozydowo (w pozycji C-3 oraz C-16 lub C-23), a trzeci estrowo (C-28) [257,111].

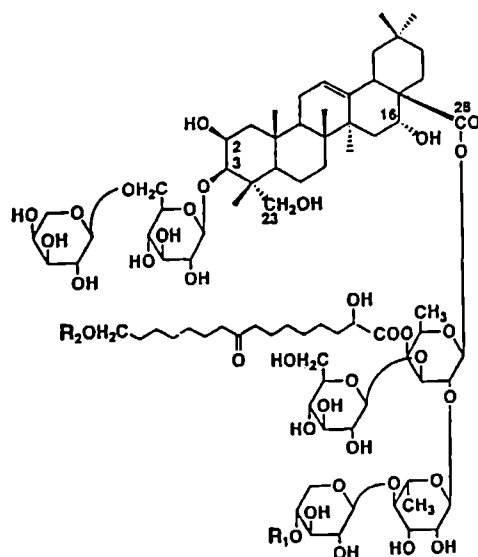
Łańcuchy mogą być proste lub rozgałęzione. Zwykle tworzy je kilka, pięć czy sześć monosacharydów (np. solidagosaponina XX, [111]). Najdłuższy, zbudowany aż z 11 jednostek, stwierdzono w klematozydzie C z *Clematis mandshurica* [100]. W przypadku bi- i tridesmozydów są one zazwyczaj niesymetryczne, często ten przyłączony estrowo jest dłuższy.

Cukry, wchodzące w skład glikonu to przeważnie D-glukoza, kwas D-glukuronowy, D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksyloza, rzadziej D-fukoza, D-chinowoza, D-apioza, sporadycznie D-ryboza czy unikalny DDMP.



Rys.14 DDMP.

Bywają one zacylowane najczęściej resztą octanową (m.in. saponozydy *Sapindus delavayi*), rzadziej kwasami masłowym, krotonowym (solidagosaponiny X–XX *Solidago virga-aurea* [111]), p-metoksycynamonowym (saponozydy *Silene jennisensis* [155], *Polygala senega var. latifolia* [317]). Opisano też przypadki estryfikacji kwasami tłuszczowymi (kwilajasaponina QS–III z *Quillaja saponaria*, krokosmiozydy z *Crococsmia crocosmiiflora*, masonozydy A–C z *C. masoniorum* [15] Rys.15) czy monoterpenuidowymi (saponiny z *Entada phaseoloides* [239], *Calliandra anomala* [190]), a także podstawienie resztami sulfonowymi (glikozydy kwasu echinocystowego z *Eclipta alba* [306], zygyfolyzyd F z *Zygophyllum coccineum* [62]).

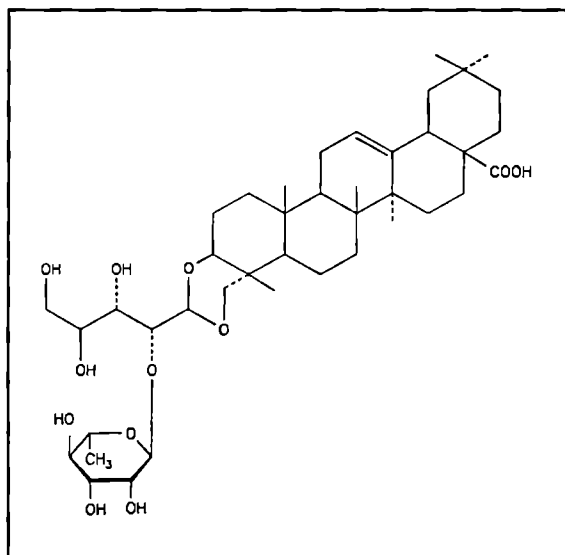


Rys.15 Masonozyd A: R₁=apioza, R₂=ramnoza.

Spotyka się też cukry zmetylowane np. D-3-O-metyloglukozę i D-3-O-metyloksylozę. Zidentyfikowano je w holostanowych saponozydach morskich bezkręgowców z klasy *Holothuridae* jak np. holoturynozydy A–D (*Holothuria forskalii*) [229].

Najczęściej ogniwem łączącym glikon z sapogeniną jest glukoza, arabinoza względnie ksyloza (saponozydy z *Astragalus sieversianus*, *Hebeloma vinosophyllum*, *Thalictrum sp.* [239,319]), rzadziej fukoza (*Bupleurum kunmingense* [100]) czy N-acetylo glukozamina (*Calliandra anomala* [190], *Entada phaseoloides* [239]). W rodzinie *Primulaceae* tym łącznikiem jest z reguły arabinoza lub kwas glukuronowy.

Monosacharydy występują w cyklicznej formie piranozy lub furanozy. Pierwszy przypadek glikozydu, w którym cukier łączący się z aglikonem ma formę prostego łańcucha opisał w 1995 roku Li *et al.* [160]. W izolowanych z rosnącego w górskich rejonach Chin, tradycyjnego surowca leczniczego *Anemoclema glaucifolium* anemoklemozydach A i B, grupa hydroksylowa przy węglu C-3 hederageniny łączy się wiązaniem eterowym z prostym łańcuchem arabinozy.



Rys.16 Anemoklemozyd B.

1.4 Właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczna

Saponozydy triterpenowe są najczęściej substancjami bezpostaciowymi o ostrym, cierpkim smaku i białym, czasem kremowym zabarwieniu. Krystalizują trudno, z reguły w postaci igieł [47]. Pewną ciekawostką jest fakt, iż escynę czy teasaponinę, pomimo niejednorodności można, w określonych warunkach, otrzymać w formie krystalicznej [256,284].

Saponozydy topią się w wysokiej temperaturze (200–350 °C), często ulegając rozkładowi w punkcie topnienia. Są związkami wielkocząsteczkowymi o dużej polarności, dzięki czemu posiadają zdolność adsorbowania na swej powierzchni m.in. soli mineralnych czy niektórych barwników [29]. Zazwyczaj są optycznie czynne, zarówno triterpenowa genina jak i monosacharydy tworzące glikon, zawierają bowiem wiele centrów optycznych. Skręcają płaszczyznę światła spolaryzowanego w lewo lub prawo [47].

Saponozydy triterpenowe mają często charakter kwaśny, związany bądź z obecnością reszt karboksylowych w geninie bądź też z występowaniem kwasów uronowych w części cukrowej. Można je wytrącić z roztworów zasadowym octanem ołowianym.

Glikozydy rozpuszczalne są w wodzie, w stopniu zależnym od ilości łańcuchów cukrowych oraz tworzących je monosacharydów, a także w uwodnionym metanolu i pirydynie. Nie rozpuszczają się natomiast w rozpuszczalnikach niepolarnych jak chloroform, benzen czy eter naftowy, będących dobrymi rozpuszczalnikami dla samych aglikonów.

Bipolarna struktura cząsteczki sprawia, iż saponozydy wykazują aktywność powierzchniową. Zdolność obniżania napięcia powierzchniowego, a co za tym idzie tworzenia trwałej piany w roztworach wodnych, stała się podstawą pierwotnego zainteresowania człowieka tymi związkami. Z tego też względu nadano im nazwę saponin.

Z punktu widzenia farmakologii najbardziej istotną cechą wydaje się być zdolność tworzenia kompleksów z cholesterolem. Warunkuje ona aktywność hemolityczną tych związków, a także w dużym stopniu tłumaczy mechanizm leżący u podstaw ochronnej funkcji saponin i ich fizjologicznej roli w roślinie.

Aktywność hemolityczna jest drugą, obok pienienia, własnością nieodłącznie kojarzoną z saponozydami. Mimo, iż jej stopień jest niezależny od ilości błonowego cholesterolu uważana jest za rezultat interakcji tych związków z cholesterolem błon erytrocytarnych, tworzącym swoisty receptor [100,271,243,245]. Właściwości hemolityczne nie są wspólne wszystkim saponozydom. Z reguły aktywne są monodesmozydy. Bidesmozydy wykazują słabą aktywność lub jej brak, podobnie jak same aglikony, początkowo przyjmowano więc, iż zdolność do hemolizy zależy głównie od części cukrowej [242,282]. Późniejsze badania, mimo iż potwierdziły pewną rolę glikozydacji przy węglu C-3 [86], zasadniczo zrewidowały ten pogląd. Ich wyniki wskazują, iż to przede wszystkim cechy strukturalne aglikonu determinują stopień i siłę hemolizy. Saponozydy steroidowe charakteryzują się znacznie wyższą aktywnością niż glikozydy o triterpenowych geninach. Średnia szybkość hemolizy, w badaniach przeprowadzonych na 75 syntetycznych związkach, wynosi odpowiednio 5 minut i 60 minut [272,271]. Prawdopodobnie wynika

to z wyższego powinowactwa steroidów do cholesterolu błon erytrocytarnych, a jak sugeruje Takechi [271], saponozydy łączą się z krwinkami czerwonymi od strony sapogeniny. Segal [245] potwierdziła, że obecność w aglikonie silnych polarnych ugrupowań, takich jak podstawnik karboksylowy czy hydroksylowy, przeszkadza w tworzeniu się kompleksu saponina–erytrocyt. Saponifikacja glikozydów estrowych ze *Styrax officinalis* L. praktycznie pozbawiła je aktywności hemolitycznej; podobną sytuację zaobserwowano w przypadku escyny [244]. Spośród pochodnych triterpenowych nie hemolizują saponozydy dammaranowe [100]. Z kolei dla aktywności hemolitycznej saikosaponin niezbędna wydaje się być obecność grupy hydroksylowej w położeniu C–16 [79].

Kolejną cechą biologiczną saponin, o raczej historycznym znaczeniu jeśli chodzi o praktyczne wykorzystanie, jest toksyczność wobec organizmów zimnokrwistych. Szczególnie podatne na to działanie są ryby skrzelowe. Jego mechanizm także opiera się na uszkodzeniu błon komórkowych, co prowadzi do wzrostu ich przepuszczalności i utraty ważnych życiowo elektrolitów [100].

Mechanizm ingerencji saponozydów w prawidłowe funkcjonowanie błon fizjologicznych budził zrozumiałe zainteresowanie badaczy. Jak ustalono, jeden z mechanizmów polega na wspomnianej już interakcji z cholesterolem warstwy lipidowej i destabilizacji błony, drugi tłumaczony jest wpływem na wartość ładunku ujemnego jej powierzchni [214,271,1]. W warunkach fizjologicznych zależy on głównie od obecności kwasu N–acetyloneuraminowego i jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu funkcji życiowych. Abe *et al.* [1] badali wpływ saikosaponin na powierzchnię błony komórek raka Ehrlicha, obserwując m.in. zmiany jej ładunku oraz struktury. Saponozydy o silnej aktywności hemolitycznej i znacznej aktywności farmakologicznej *in vivo* (saikosaponiny a i d) powodowały zdecydowane obniżenie ładunku i zniszczenie struktury mikrokosmków komórkowych, natomiast te nieaktywne farmakologicznie (saikosaponina c) nie różniły się od próbek kontrolnych. Znamienne jest, iż tak zasadnicza różnica w bezpośrednim oddziaływaniu na błony jest rezultatem stosunkowo niewielkich różnic budowy tych związków, w tym przypadku obecności mostku tlenowego między węglami C–13 i C–28.

1.5 Analiza fitochemiczna

1.5.1 Metody identyfikacji

Wymienione w poprzednim rozdziale cechy fizykochemiczne i biologiczne saponin stanowiły podstawę ich wstępnej identyfikacji w surowcu. Najstarsze metody analityczne, opracowane nie tylko dla stwierdzenia obecności lecz również oszacowania ewentualnej aktywności saponin, polegały na określeniu tzw. wskaźników czy indeksów trucia ryb, hemolitycznego oraz pienienia.

Porównywano z wzorcem rozcieńczenie wyciągu badanego, które całkowicie hemolizuje 1% zawiesinę krwinek, zabija w ciągu godziny rybki gatunku *Leuciscus rutilus* czy *Carassius vulgaris*, względnie tworzy utrzymującą się przez kwadrans trwałą pianę [265]. Najbardziej wiarygodne są wyniki testu pienienia, powierzchniowo aktywne są bowiem wszystkie saponozydy, próby na aktywność hemolityczną natomiast, uważane niegdyś za podstawowy wyznacznik ich obecności w surowcu, straciły na znaczeniu z kilku względów. Przede wszystkim, jak wspomniano w punkcie 1.4, nie wszystkie związki saponinowe ją posiadają. Koronnym przykładem są pochodne dammaranu czy bidesmozydy. Ponadto, własności hemolityczne mogą się nie ujawnić w wyniku maskowania przez współwystępujące w surowcu garbniki czy sterole. Było to m.in. powodem ujemnych wyników uzyskanych przez Hofa w badaniach z użyciem metody hemolitycznej roślin z rodz. *Primulaceae*, m.in. *Primula farinosa* L. czy *Lysimachia vulgaris* L., które zostały zakwestionowane przez innych autorów [92,288]. Błędy mogą wynikać również z faktu, że inne niesaponozydowe struktury też hemolizują [241]. Warto byłoby więc zrewidować dane dotyczące obecności saponin w niektórych surowcach.

Indeks hemolityczny traktowany jest współcześnie raczej jako element analizy ilościowej w przypadku potwierdzenia obecności saponin innymi metodami. Według Farmakopei Europejskiej mierzy się ilość ml krwi wołu (w rozcieńczeniu 1:50), która zostanie całkowicie zhemolizowana przez wyciąg z 1 g testowanego surowca. Za wzorzec uznano frakcję saponinową z *Gypsophila paniculata* o aktywności 30 tys. jednostek [100].

Najczęściej stosowanymi obecnie metodami jakościowej identyfikacji saponozydów w wyciągach są charakterystyczne reakcje barwne *in vitro* oraz chromatografia cienkowarstwowa (TLC). Saponozydy triterpenowe można odróżnić od steroidowych na podstawie zabarwienia jakie dają w próbach z odczynnikami Liebermanna–Burcharda (bezwodnik kwasu octowego/ kwas siarkowy – zabarwienie fioletowe), Brieskorna–Brinera (kwas chlorosulfonowy w sesolwanie – zabarwienie czerwono-fioletowe przechodzące w niebieskie), z waniliną i kwasem siarkowym lub fosforowym (czerwono-fioletowe) czy odczynnikami Komarowskiego (kwas siarkowy/p–hydroksybenzaldehyd – zabarwienie żółto-brązowe lub fioletowe). Nie są to jednak reakcje specyficzne [292,100].

W chromatografii cienkowarstwowej (TLC) stosuje się przede wszystkim płytki pokryte żelazem krzemionkowym, rozwijane w układach chloroform–metanol–woda w rozmaitych stosunkach (64:50:10, 65:35:10, 23:12:2 v/v.[115]) czy n–butanol–lodowaty kwas octowy–woda (50:10:40 v/v górna warstwa) [292]. Jako odczynników wywołujących używa się: 10% roztworu kwasu siarkowego w etanolu, stężonego kwasu siarkowego, kwasu siarkowego z waniliną, odczynnika Komarowskiego, odczynnika Liebermanna–Burcharda,

względnie wody [100].

Ilościowo można oznaczyć saponozydy metodą densytometryczną na TLC lub kolorymetrycznie wykorzystując reakcje barwne [141].

1.5.2 Izolacja

Wyodrębnienie czystych saponozydów z materiału roślinnego następcza szereg trudności. Wynikają one przede wszystkim ze specyficznej, fizykochemicznej charakterystyki tych związków (wielkocząsteczkowe, trudnokryształizujące, polarne struktury, wykazujące zdolności adsorbcyjne) oraz z faktu, iż w surowcu występują one często w postaci kompleksów nieznacznie się od siebie różniących glikozydów. Dodatkową trudność stanowi znikoma w wielu przypadkach zawartość, a także niebezpieczeństwo przekształceń w trakcie ekstrakcji i dalszej obróbki, prowadzące w efekcie do otrzymania artefaktów. Zmiany te obejmują przede wszystkim estryfikację, hydrolizę, transacylację, rozszczepienie mostka 13 β ,28–epoksydowego, epimeryzację, laktonizację (w przypadku pochodnych kwasu olean–12–en–28–karboksylowego) i inne.

Aby uniknąć takiej ewentualności oraz uzyskać jak najlepszą wydajność, każdy z autorów przyjmuje w praktyce odrębną drogę postępowania starając się modyfikować klasyczny, kilkustopniowy schemat izolacji saponozydów, który w swojej zasadniczej postaci nie zawsze daje zadowalające rezultaty. Rozpoczyna się on od odtłuszczenia surowca eterem naftowym, chloroformem, octanem etylu lub heksanem, a następnie ekstrakcji metanolem czy etanolem na ciepło lub zimno. Zagęszczony wyciąg alkoholowy, po rozpuszczeniu w wodzie, poddawany jest ekstrakcji butanolem. Saponozydy w większości przechodzą, wraz z pewną ilością wody, do fazy butanolowej skąd wytrąca się je np. eterem etylowym uzyskując tzw. surową frakcję saponinową, względnie poddaje od razu rozdzielowi chromatograficznemu.

Postępowanie według w/w schematu nadal jest często przyjmowane bez żadnych zasadniczych zmian, np. w 1994 roku Reznicek zastosował go do izolacji saponin *Polemonium caeruleum* [225], a Bader bidesmozydów *Heteropappus* sp. [18].

Niektórzy autorzy pomijają etap odtłuszczenia surowca, a saponozydy wytrącają bezpośrednio z pierwotnego wyciągu etanolowego (np. Noorwala, 1994, *Symhytum officinale* [194]). Kusano [153] izolując ksylozyd cykloartanowy z *Cimicifuga simplex* poprzedził proces ekstrakcji butanolem przepuszczeniem wyciągu metanolowego z rośliny przez kolumnę wypełnioną węglem aktywowanym.

Podczas ekstrakcji metanolem zdarzają się przypadki estryfikacji lub eteryfikacji grup hydroksylowych aglikonu lub otwarcia pierścienia 13 β ,28–epoksydowego genin typu protoprymulageniny. Aby temu zapobiec Kubota, a także Kitagawa stosowali metanol z dodatkiem 0.5 % pirydyny [137].

Otrzymaną w wyniku ekstrakcji surowca, i ewentualnie wytrącania, surową frakcję saponinową poddaje się dalszemu oczyszczeniu i rozdzielowi chromatograficznemu z wykorzystaniem klasycznej chromatografii kolumnowej (CC) oraz nowszych technik jak:

flash chromatography (FC), *droplet counter-current chromatography* (DCC), *medium pressure liquid chromatography* (MPLC), *low pressure LC* (LPLC), *high performance LC* (HPLC). Fazę stacjonarną stanowi żel krzemionkowy, ODS, LiChrosorb RP-18, RP-8, PhA [180,111,319,6]. Stosowana bywa też, aczkolwiek rzadziej, tzw. odśrodkowa (wirowa) chromatografia cienkowarstwowa (CTLC) na żelu krzemionkowym. Technikę tę wykorzystywała m.in. Segiet-Kujawa [246] rozdzielając dwa oligosacharydy protoprymulageniny A w końcowym etapie ich izolacji z *Eleutherococcus senticosus*.

Kolumny najczęściej wypełnia się żelem krzemionkowym i eluuje układem chloroform-metanol-woda (np.7:33:1, warstwa dolna [204,240], 70:25:3 [246], 30:10:1 [205]), octan etylu-metanol (np.4:1 [257,260]), względnie Sephadexem LH-20 gdzie eluentem jest zazwyczaj metanol [35,211] lub gradient metanol-woda [204]. Rzadziej stosowany jest żel krzemionkowy silanizowany, wykorzystał go np. Shoji [257] izolując z *Impatiens balsamina* hosenkozydy D-J (eluent 50% MeOH), czy hydroksypatyt użyty m.in. w jednym z etapów oczyszczania cyklicznych tubeimozydów z *Bolbostemma paniculatum* [127].

Ostatnio w celu rozdziału surowej frakcji saponozydów popularność zyskały makroporowe żywice. Przykładowo żywicę D-101 zastosowano m.in. w procesie izolacji anemoklemydów A i B (eluent 80% MeOH) [160]. Chińczycy, w szeregu pracach dotyczących saponozydów z rozmaitych gatunków *Aster* (*Compositae*), opisali metodę izolacji z zastosowaniem żywicy SIP-1300. Kolumnę przemywano początkowo wodą, a następnie etanolem [254,253,255,252]. Inni autorzy stosowali Amberlite XAD-2 (Della Greca [54], glikozydy oleananowe *Hydrocotyle ranunculoides*), Diaion HP-20 (Yoshimitsu [319], *Thalictrum* sp., Mohamed [181] *Trifolium alexandrinum*), poliamid (Maotian [296], *Ardisia crenata*). Lavaud wykorzystała natomiast celulozę [158].

W ostatnim okresie, kolumn wypełnionych Diaionem HP-20, Amberlitem XAD-2 czy żelami polistyrenowymi MCI coraz częściej używa się już w pierwszym etapie izolacji saponozydów z surowca. W takich przypadkach roślina ekstrahowana jest gorącą wodą, a następnie wyciąg wodny poddaje się CC. W pierwszym etapie kolumnę wymywa się wodą, a następnie eluuje zaadsorbowane saponozydy stosując wzrastający gradient metanolu. Frakcje metanolową, już w znacznym stopniu pozbawioną towarzyszących substancji o zbliżonej do saponin polarności, poddaje się dalszej obróbce. Taki sposób postępowania przyjęto m.in. w procesie izolacji solidagosaponin z *Solidago virga-aurea* [110,180,111] i mazusaponin z *Mazus miquelii* [305].

Zazwyczaj izolacja saponozydów jest działaniem wieloetapowym, wykorzystującym kombinację poszczególnych technik. Na przykład w procesie wyodrębniania i oczyszczania glikozydów kwasu oleanolowego z *Aralia armata*, surowiec poddano wstępnie ekstrakcji metanolem oraz rozdziałowi pomiędzy wodę i butanol, a następnie chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym ($\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{MeOH}$) i Diaionie HP-20 ($\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$), MPLC z użyciem żelu krzemionkowego i Sephadexu LH-20, preparatywnej TLC i w końcu HPLC na kolumnie ODS (octadecyl silyl silica) [102].

Jedną z alternatywnych metod postępowania jest uprzednia metylacja frakcji saponinowej np. diazometanem, a dopiero potem rozdział chromatograficzny poszczególnych estrów metylowych. Tak identyfikowano m.in. saponozydy *Lyndernia*

pyxidaria [179], *Castanospermum australe* [7], *Achyranthes fauriei* [104] czy *Aralia elata* [236].

1.5.3 Analiza strukturalna

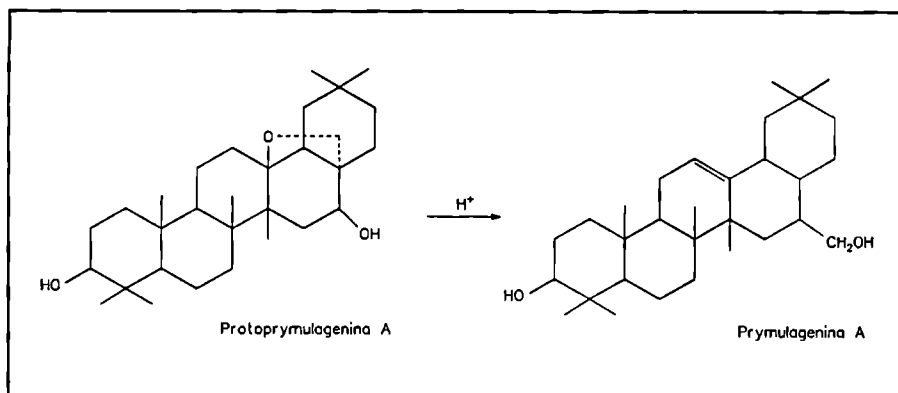
Kolejnym, po izolacji, krokiem analizy fitochemicznej jest określenie budowy chemicznej wyizolowanych związków. Do połowy lat 60-tych ustalono struktury zaledwie kilku saponozydów, mimo iż znano już stosunkowo wiele sapogenin [256]. Izolacja tych ostatnich w stanie czystym nastęrczała mniej trudności. Początkowo ograniczano się więc do przeprowadzenia hydrolizy kwaśnej nieoczyszczonej, surowej frakcji saponinowej i wyodrębnienia aglikonów. Taki tok postępowania przyjął m.in. Tschesche w swych początkowych pracach nad pierwiósnkami [286].

Wraz z rozwojem nowych technik spektrometrycznych, ustalenie pełnej struktury saponozydów stało się nieco mniej kłopotliwe. Współcześnie większość autorów opiera się w zasadzie jedynie na odpowiednim zestawie widm spektralnych. Częściową lub pełną hydrolizę saponozydu i dalszą identyfikację aglikonu oraz komponent cukrowych, a także przeprowadzanie glikozydu w pochodne acetylowe czy metylowe, traktuje się jako dodatkowe potwierdzenie założonej na podstawie widm struktury, podobnie jak pomiary temperatury topnienia lub skręcalności optycznej.

Prowadzona w łagodnych warunkach hydroliza alkaliczna umożliwia rozerwanie połączeń estrowych i analizę otrzymanej w ten sposób tzw. prosapogeniny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku większości bidesmozydów czy saponozydów estrowych. Najczęściej do tego celu służy 0.5 M KOH, lub też metanolowe czy etanolowe roztwory KOH, z tym że zwiększają one niebezpieczeństwo metylacji zwłaszcza grup karboksylowych aglikonu. Shao [253] w celu selektywnego odszczepienia związanego estrowo łańcucha cukrowego asterjunanozydu E z *Aster yunnanensis* zastosował opracowaną przez Ohtanina metodę z użyciem 2,6-lutydyny, bezwodnego metanolu i LiI. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano przez 16 godzin w 160 °C, a następnie oczyszczano na kolumnie z żywicą SIP-1300. Technikę tę stosował też Yoshimitsu dla saponozydów *Hb. Thalictri* [319].

Pełną hydrolizę kwaśną, prowadzącą do całkowitego odszczepienia glikonu, wykonuje się zazwyczaj w obecności 2–4 M HCl, 20% H₂SO₄ względnie mieszaniny 10% HCl w dioksanie-woda (1:1) czy 5% H₂SO₄-dioksan (1:1). Ten ostatni odczynnik ma większe zastosowanie dla pochodnych nieoleananowych. Jak bowiem stwierdzono, obecność dioksanu sprzyja laktonizacji aglikonów pochodnych kwasu olean-12-en-28-owego. Niebezpieczeństwo tworzenia takich pochodnych rośnie zwłaszcza w środowisku niewodnym i jest największe gdy grupa hydroksylowa znajduje się w pozycji γ w stosunku do grupy karboksylowej [239]. Natomiast z powodzeniem zastosowano go hydrolizując glikozyd α -amyrynowego kwasu siarezinolowego [305]

Innym typem zmian jaki zaobserwowano podczas hydrolizy kwaśnej (15% kwasem siarkowym) było rozerwanie pierścienia cyklopropanu u cykloartanowych saponozydów *Thalictrum squarrosum* [239], a także rozszczepienie mostka 13 β ,28-epoksydowego pochodnych oleananu typu protoprymulageniny.



Rys.17 Przekształcenie protoprymulageniny A w prymulageninę A w środowisku kwaśnym.

Kitagawa, analizując skład saponinowy kilku gatunków *Primulaceae*, w celu izolacji oryginalnych aglikonów zastosował zmodyfikowaną degradację Smitha, polegającą na utlenieniu saponozydów $NaIO_4$, a następnie hydrolizie 3% etanolem KOH w atmosferze azotu [139,137]. Takie postępowanie przyjęto też wyodrębniając dammaranową geninę z mostkiem tlenowym – jujubogeninę (Brandao, 1993) [30]. Kitagawa, przy okazji identyfikacji sakuraso-saponiny z *Primula sieboldi*, opracował również skuteczną metodą zapobiegającą przekształceniu protoprymulageniny, a mianowicie fotolizę czyli godzinne naświetlanie roztworu metanolowego glikozydu lampą rtęciową (500 W) zaopatrzoną w filtr Vycor [138].

Z reguły zastosowanie do hydrolizy kwasu siarkowego jest bezpieczniejsze, jeśli chodzi o ewentualne przekształcenia czy degradację małowielkich fragmentów cząsteczki, lecz często nie jest całkowicie skuteczne dla rozerwania wiązań eterowych [100].

Niebezpieczeństwa tworzenia artefaktów można uniknąć przeprowadzając hydrolizę enzymatyczną. Najczęściej stosowanymi enzymami są proteaza (typ XIII z *Aspergillus satoi*) [305], hydrolaza glicyryzyny [181,49], cellulaza (z *Trichoderma viride*) [153,257], hesperydinaza [124,296], takadiastaza [263], narynginaza [30], pektynaza [236], β -glukuronidaza (z *Helix pomatia*) [35,225], β -glukozydaza [48], emulsyna (z migdałów) [16,15], molsyna (z *Aspergillus saitoi*) [248], mieszanina glikozydaz (z *Charonia lampas*) [280].

Otrzymany w wyniku hydrolizy kwaśnej lub enzymatycznej aglikon ekstrahuje się chloroformem, eterem lub octanem etylu i poddaje analizom służącym identyfikacji. Są to przede wszystkim analizy spektralne, a także pomiar temperatury topnienia, skręcalności właściwej czy, kiedy jest to możliwe, kochromatografia z wzorcem. Jedną z rzadszych i prawie już zapomnianych metod wykorzystywanych dla pochodnych kwasu olean-12-en-28-owego jest charakterystyczna dla nich metoda tworzenia bromolaktonu. Zastosował ją np. Yu w badaniach strukturalnych saponozydów *Nothopanax davidii* w 1995 roku [320].

Skład glikonu ustalany jest między innymi w wyniku hydrolizy, kiedy to cukry, po uprzedniej neutralizacji fazy wodnej, przeprowadza się do pirydyny i poddaje analizie TLC na żelu krzemionkowym. Chromatogramy rozwijane są z reguły w fazach ruchomych: octan etylu–metanol–woda–kwas octowy (65:25:15:20), chloroform–metanol–woda (8:5:1), izopropanol–butanol–woda (7:1:2). Wartości R_f cukrów badanych porównuje się z wzorcami po wywołaniu difenyloaminą w kwasie fosforowym [30] lub butanolowym roztworem ftalanu aniliny [138,6]. Zamiast analizy TLC można, po odparowaniu do sucha fazy zawierającej monosacharydy, zadać mieszaninę N–trimetylosilyloimidazolem lub heksametylodisilazanem i trójmetylochlorosilanem i analizować metodą chromatografii gazowej GC [296]. Alternatywnie można zmetylować saponozyd diazometanem i MeI lub Ag_2O i MeI (względnie różnymi modyfikacjami metod wg. Hakomori, Purdie, Kuhn), a następnie poddać go hydrolizie 5% metanolowym HCl i analizować zmetylowane cukry przy użyciu TLC, GC lub GC–MS [134,225], lub też dalej redukować i acetylować analizując w rezultacie (GC lub GC–MS) częściowo zmetylowane octany odpowiednich alditoli [30,246]. W ten sposób można uzyskać informacje dotyczące miejsc wiązania między poszczególnymi cukrami.

Częściowa hydroliza kwaśna (np. 0.5 M HCl) dająca prosapogeniny z niecałkowicie zhydrolizowanym łańcuchem cukrowym, pozwala również wnioskować o sekwencji tworzących łańcuch monosacharydów, jednak przy założeniu, że jest on nierozgałęziony.

W przypadku bidesmozydów, skład łańcucha cukrowego związanego estrowo ustala się po uprzedniej hydrolizie alkalicznej saponozydu, względnie redukcji zmetylowanego związku wodorkiem litowo–glinowym, co zapobiega odszczepieniu łańcucha połączonego glikozydowo.

Jak już wspomniano wyżej, w ostatnich latach, dla ustalenia struktury chemicznej w coraz większym zakresie wykorzystuje się informacje, których dostarczają techniki spektralne. Obok od dawna wykonywanych widm w nadfiolecie i podczerwieni korzysta się z nowych możliwości jakie dał rozwój technik spektrometrii masowej (MS), a przede wszystkim spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Spośród metod MS do analiz aglikonów nadaje się zwłaszcza EIMS (electron impact MS) czy HREIMS (high resolution EIMS), natomiast dobre widma fragmentacyjne saponozydów uzyskuje się stosując FAB (fast atom bombardment)–MS (jony ujemne i dodatnie, matryca: glicerol lub alkohol m–nitrobenzylowy [252,124]) czy wysokorozdzielczą (high-resolution) FAB–MS. W analizie glikozydów saponinowych wykorzystywano ponadto FD (field desorption)–MS. Widmo przedstawia obraz fragmentacji jonów $[M+Na]^+$ oraz $[M+K]^+$. Popularne jest też połączenie MS z chromatografią gazową (GC–MS) lub cieczową (LC–MS) [167,239].

Widma NMR wykonuje się zazwyczaj przy częstotliwości 500 MHz dla 1H i 200 MHz dla ^{13}C . Dodatkową informację dotyczącą szkieletu węglowego zawierają techniki takie jak APT (attached proton test), INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) czy DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer), które umożliwiają rozróżnienie węgli metylowych, metylenowych, metinowych i czwartorzędowych. I tak np. w widmie DEPT sygnały tych ostatnich znikają, a przy zastosowaniu odpowiednich warunków pomiaru (kąt 90°) można obserwować jedynie piki

metinowe, względnie (kąąt 135°) spowodować, że sygnały metylenowe pojawią się jako ujemne, a metinowe i metylowe jako dodatnie.

Istotną pomoc w prawidłowym przypisaniu sygnałów zarówno H jak i C, z uwzględnieniem ich wzajemnego położenia w cząsteczce dają rozmaite dwuwymiarowe (2D – two dimensional) techniki NMR [239,66,122,261,168]. Jeśli przesunięcia chemiczne są wykreślone na jednej z osi częstotliwości, a stałe sprzężenia na drugiej, to widmo nosi nazwę angielską *two-dimensional J-resolved spectrum*, zaś gdy obie osi dają wartości chemicznych przesunięć otrzymujemy tzw. *two-dimensional (shift)-correlated NMR spectrum*. W analizie saponozydów najczęściej wykorzystywane są widma drugiego typu uzyskane dzięki następującym technikom:

● **¹H–¹H COSY** – *Homonuclear correlation spectroscopy* – **spektroskopia sprzężenia homojądrowego**

Pozwala dokładnie przypisać sygnały protonów, w razie wątpliwości interpretacyjnych stosuje się rozmaite modyfikacje tej techniki dające wyższą rozdzielczość pików pozadiagonalnych (ang. cross-peaks) jak np. PS-COSY (phase sensitive), która ułatwia dokładny pomiar przesunięć i stałych sprzężenia szczególnie przy niewyraźnym na skutek nakładania sygnałów widmie jednowymiarowym, lub też DQF-COSY (double-quantum filtered) i TQF-COSY (triple-quantum filtered) czyli COSY z filtrowaniem dwu- i trzykwantowym co pozwala na selektywną rejestrację wybranych przejść wielokwantowych. Natomiast dzięki H-relayed COSY ("pośrednie" COSY) można przypisać protony oddzielone od siebie o 4 do 6 wiązań.

● **2D NOESY** – *Two dimensional Overhauser effect spectroscopy* – **spektroskopia dwuwymiarowego jądrowego efektu Overhausera**

Dostarcza wskazówek odnośnie sąsiedztwa przestrzennego. Widoczne na widmie piki pozadiagonalne obrazują blisko położone pary protonowe. Jej odmianą jest ROESY (rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy).

● **HOHAHA** – *Homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy* – **homojądrowa spektroskopia Hartmanna-Hahna**

Uzupełnia informację dotyczącą protonów pozwalając na określenie tzw. sieci sprzężeń ¹J-network' czyli grupy protonów powiązanej poprzez ¹H–¹H J sprzężenia (skalarne).

● **HETCOR** – *Heteronuclear correlation spectroscopy* – **spektroskopia sprzężeń heterojądrowych**

W oparciu o znane sygnały protonów pozwala przypisać im odpowiednie sygnały ¹³C, dostarczając tym samym danych o liczbie wodorów związanych z konkretnym atomem węgla. Zmodyfikowana wersja tej techniki tzw. long range HETCOR uzupełnia te

informacje wzbogacając je o oddziaływania C–H poprzez dwa czy trzy wiązania.

● **2D INADEQUATE** – *2D Incredible natural abundance double quantum transfer experiment*

Dostarcza danych o powiązaniach między sąsiadującymi węglami, wskazując m.in. na obecność wiązań podwójnych. Technika ta ma jednak ograniczone zastosowanie ze względu na niską czułość.

Coraz większą popularność zdobywają techniki zaliczane do tzw. *Inverse–detected 2D–NMR methods*, charakteryzujące się wyższą niż wyżej wymienione czułością. Są to przede wszystkim:

● **HMQC** – *Heteronuclear multiple quantum coherence*

która umożliwia identyfikację par węgiel–wodór, pozwalając określić chemiczne przesunięcia dla protonów i protonowanych węgli

● **HMBC** – *Heteronuclear multiple bond correlation*

dostarcza informacji o sprzężeniach H–C dalekiego zasięgu, pozwala też przypisać sygnały węgli nieprotonowanych.

Jednym z podstawowych ograniczeń analizy saponozydów przy użyciu wyżej wymienionych dwukierunkowych technik jest duża wielkość próbki wymaganej dla uzyskania interpretowalnego widma, czas i związane z nim koszty pomiaru [239,168,66,89,122,261].

Poza technikami spektralnymi w analizie strukturalnej saponozydów wykorzystuje się czasem krystalografię (X–ray). Metoda ta nie ma większego zastosowania głównie ze względu na trudności z uzyskaniem odpowiednio dużego kryształu saponozydu. Związki z tej grupy uzyskuje się bowiem z reguły w postaci amorficznej.

1.6 Aktywność farmakologiczna

Saponozydy triterpenowe stanowią grupę metabolitów wtórnych obdarzonych niezwykle szerokim i ciekawym spektrum aktywności farmakologicznej. Wiele roślin bogatych w saponiny było cenionymi surowcami leczniczymi już w starożytnych Chinach, Indiach i Japonii, a także krajach tradycji śródziemnomorskiej. Współcześnie wiele z nich nadal jest artykułami farmakopealnymi.

Fitochemiczna analiza olbrzymiej liczby gatunków, częstokroć poparta tradycyjnym leczniczym wykorzystaniem rośliny, pozwoliła na wyodrębnienie wielu ciekawych struktur umożliwiając ich wieloaspektowe przebadanie w eksperymentach farmakologicznych. Ich wyniki dają nadzieję na szersze wykorzystanie saponozydów przez współczesną medycynę.

Obecnie saponozydy triterpenowe uznawane są przede wszystkim jako niekwestionowane środki o wyraźnym działaniu przeciwzapalnym i przeciwwysiękowym, wykrztuśnym, hipocholesteremicznym oraz przeciwgrzybiczym. Dla szeregu z nich farmakolodzy potwierdzili w eksperymentach *in vitro*, a także *in vivo*, aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwięczakową, cytotoksyczną, immunostymulującą, analgetyczną czy plemnikobójczą. Ponadto udowodniono działanie hepatoprotective, wpływ na układ krążenia, centralny system nerwowy, metabolizm, układ enzymatyczny, układ hormonalny, i in.

Modelowymi związkami saponozydowymi, do których odnosi się praktycznie każdy z wyżej wymienionych kierunków działania, są izolowane z *Panax ginseng* (rodz. *Araliaceae*) pochodne dammaranu – panaksozydy czy ginsenozydy. Skuteczność żeńszenia potwierdza nie tylko współczesna farmakologia lecz przede wszystkim wielowiekowa praktyka medyczna.

Ponieważ zaprezentowanie pełnego obrazu potencjału terapeutycznego saponozydów jest w zasadzie niemożliwe, zasygnalizowane zostaną tylko wybrane przykłady.

● *działanie wykrztuśne*

Zdecydowanie najpopularniejszym w kategoriach ilości obecnych na rynku preparatów zastosowaniem surowców saponinowych jest użycie ich jako środków wykrztuśnych. Saponozydy triterpenowe drażniąc zakończenia nerwowe w błonie śluzowej żołądka powodują odruchową reakcję drzewa oskrzelowego stymulując sekrecję śluzu, przy równoczesnym pobudzeniu rdzeniowych ośrodków oddechowego i kaszlowego. Wśród surowców o ugruntowanej pozycji jako *remedia expectorantia* można wymienić *Rx. Saponariae*, *Rx. Glycyrrhizae*, *Rx. Senegae*, *Flos Verbasci*, *Rx.* i *Flos Primulae* (preparaty: **Pectosol**, **Tussipect**, **Bronchicum**, **Makatusin**, **Azarina**, **Intr. Primulae** i in)

● *działanie przeciwzapalne*

Wiele saponozydów triterpenowych wykazuje działanie przeciwzapalne. Są one aktywne zwłaszcza w pierwszych stadiach rozwoju procesu zapalnego, gdyż normalizują zwiększoną

przepuszczalność ścian drobnych naczyń kapilarnych. Szeroko stosowana w leczeniu m.in. w terapii zakrzepowego zapalenia żył czy pourazowych i pooperacyjnych obrzęków jest escyna – kompleks saponozydów estrowych z *Aesculus hippocastanum* (preparaty **Reparil, Aesculan, Aescin, Veinotonyl, Fitoven, Venescin** i wiele innych). Do uznanych surowców o właściwościach przeciwwysiękowych należą m.in. *Hydrocotyle vulgaris, Polemonium coeruleum, Thea sinensis, Bupleurum sp., Calendula officinalis* [100,19,256,316].

Innym istotnym wskazaniem do stosowania saponin aktywnych przeciwzapalnie są schorzenia błon śluzowych przewodu pokarmowego oraz stany alergiczne. W terapii choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy wykorzystuje się przede wszystkim preparaty z lukrecji gładkiej, samą glicyryzynę i rozmaite półsyntetyczne pochodne kwasu glicyretynowego (**Uldenol, Ulventrol, Biogastron, Bioral, Rowagastrin** i in.). Wyraźną aktywność przeciwwrzodową posiada ponadto kalendulozyd B z *Calendula officinalis*, związek pozbawiony działania drażniącego, o stosunkowo niewielkim indeksie hemolitycznym i toksyczności [103]. Własności antyalergiczne przypisuje się saponozynom *Achyranthes fauriei, Ilex crenata* i in. [104,124].

Opisano kilka mechanizmów działania przeciwzapalnego glikozydów triterpenowych. Niektóre z nich hamują aktywność enzymów zaangażowanych w tworzenie prostaglandyn i leukotrienów, przede wszystkim cyklooksigenazy, rzadziej lipoksygenazy czy fosfolipazy A₂ (np. ginsenozydy Rc,Re,Rb₂, saikosaponina a, kwas glicyretynowy, saponiny *Silene jensseensis*) [19,155,109]. Inne, jak saponiny *Bupleurum chinense, Panax japonicum*, czy wolny kwas oleanolowy, stabilizują mastocyty zapobiegając uwalnianiu histaminy [19,52]. Większość jednak wywiera działanie przeciwzapalne wskutek modyfikacji funkcjonowania sytemu adrenokortykotropowego. Odbywa się to albo na drodze bezpośredniej, kiedy saponozyd wiąże się ze specyficznym wątrobowym receptorem glikokortykoidowym (np.saikosaponina d), albo pośrednio poprzez wpływ na uwalnianie ACTH z przysadki, co w efekcie prowadzi do zwiększenia poziomu glikokortykosteroidów w osoczu (m.in saikosaponiny a i d, ginsenozyd Rb₁) [239,19,196,43]. Należy też wspomnieć o ingerencji w wątrobowy metabolizm kortykoidów, co zaobserwowano m.in. w przypadku glicyryzyny czy papyriogenin A i C [266,19]. Glicyryzyna, jak wykazał Akamatsu [8], wywiera działanie przeciwzapalne również na skutek zahamowania wytwarzania przez neutrofile tzw. reaktywnych czynników tlenowych (ROS – reactive oxygen species) jak H₂O₂, OH⁻ oraz O⁻², które uznawane są za najsilniejsze mediatory stanu zapalnego [8].

W badaniach zmierzających do ustalenia zależności między strukturą a aktywnością, przeprowadzonych przez Recio *et al.* [224] na wybranych triterpenach z grupy oleananu, lupanu i ursanu okazało się, iż istotnym elementem budowy jest obecność grupy karboksylowej przy węglach C–28 lub C–30, względnie hydroksylowej w pozycji C–28. Spośród saikosaponin najsilniejszą aktywność wykazują te z mostkiem 13β,28–epoksydowym [19].

● wpływ na metabolizm i enzymy

Saponozydy triterpenowe modyfikują w rozmaity sposób aktywność wielu biokatalizatorów. U podstaw omówionego wyżej działania przeciwzapalnego leży np. ich hamujący wpływ na kluczowe dla powstawania mediatorów stanu zapalnego lipoksygenazę i cykooksygenazę. Z kolei glicyryzyna i kwas glicyretynowy spowalniają metabolizm wątrobowy glikokortykoidów, progesteronu i aldosteronu poprzez zahamowanie $\Delta^4-5-\beta$ -reduktazy [256].

Izolowane z *Hedera helix* hederakozydy C i B oraz α -hederyna posiadają wyraźną aktywność anty-hyaluronidazyjną. Saponozydy te przebadano klinicznie w kierunku potencjalnej skuteczności w leczeniu cellulitis. Po 30 dniach stosowania zewnętrznie, zaobserwowano znaczną poprawę u 90% pacjentek, co stanowiło lepszy rezultat niż ten osiągnięty przy użyciu tradycyjnych preparatów z escyną (80%) [64].

Saponozydy *Ardisia crenata* silnie hamują fosfodiesterazę cAMP, wartości IC_{50} są zbliżone do papaweryny [120], natomiast lablab saponina I z *Dolichos lablab* posiada aktywność typu dysmutazy nadtlenkowej (superoxide dismutaze), która przewyższa siłą glutation [318].

Guinea *et al.* badali frakcję saponozydową z korzeni *Bupleurum fruticosum* w kierunku interakcji z aminopeptydazą leucynową (LAP). Jest to kluczowy w patogenezie szeregu schorzeń enzym, zlokalizowany na powierzchni komórek. W stężeniu 0.1 mg/ml kompleks saponinowy hamował aktywność LAP w 60% [79].

Saponozydy *Panax ginseng* stymulują syntezę RNA i białek w komórkach wątroby szczura [256], natomiast astragalusaponina I przyspiesza metabolizm białek [239].

● działanie przeciwbólowe

Saponozydy o działaniu przeciwbólowym izolowano m.in. z *Aster yunnanensis* – surowca stosowanego w chińskiej medycynie ludowej w przypadku ukąszeń owadów i węży [255]. Analgetykami o sile porównywalnej do aminopiryny i kwasu acetylosalicylowego są glikozydy triterpenowe z *Dianthus superbus*, *Dolichos falcatus*, *Maesa chisia*, *Bupleurum falcatum*, *Platycodon grandiflorum* czy *Panax ginseng* [100,239,256]. Saponozydy czerwonego żeńszenia hamują rozwój tolerancji morfinowej poprzez wpływ na układ cholinergiczny, zwiększając tym samym efekt działania przeciwbólowego alkaloidu [239].

● wpływ na układ sercowo–naczyniowy

Pewne podobieństwo struktury saponozydów i glikozydów nasercowych skłoniło badaczy do poszukiwań, także w obrębie tej grupy, związków o potencjalnej aktywności kardi tonicznej. Dodatkowo działanie inotropowe zaobserwowane w przypadku licznej grupy hemolitycznie czynnych glikozydów triterpenowych wydaje się być rezultatem ich oddziaływania na kanały wapniowe. Badania na izolowanych komórkach sercowych psa wykazały, iż dochodzi do stymulacji wymiany jonów sodu i wapnia, a także do nasilonego

wplywu wapnia z siateczki endoplazmatycznej. Saponozydy *Panax quinquefolium* wykazały natomiast dualistyczne działanie blokując kanały wapniowe, były też skuteczne w indukowanej ouabainą arytmii świnek morskich [239,311].

W badaniach *in vivo* na szczurach izolowany z *Symphytum officinale* symfytoksyd A wywołał spadek ciśnienia krwi oraz bradykardię. Efekt ten był znoszony przez atropinę. Wyniki testów na izolowanych fragmentach tkanki aorty, mięśni gładkich jelita i mięśni szkieletowych świnki morskiej potwierdziły, iż saponozyd ten jest niespecyficznym agonistą muskarynowych i nikotynowych receptorów cholinergicznym, i działa w sposób zależny od dawki, jakkolwiek słabiej niż sama acetylocholina [74].

Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Czarneckiego [51] stwierdzono, iż kwas prymulowy (w postaci soli sodowej) działa na ciśnienie tętnicze krwi dwufazowo, po początkowej krótkotrwałej hipotensji następuje długotrwała hipertensja. Ponadto związek ten podany szczurom w dawce 1 mg/kg i.v. chronił je w 100% przed wystąpieniem arytmii adrenergicznej; jednocześnie wykazywał działanie kardioprotekcyjne [50].

● działanie hipocholesteremiczne

Glikozydy triterpenowe, podobnie jak steroidowe, obniżają poziom cholesterolu w surowicy i z tego względu mogą być wykorzystywane w profilaktyce miażdżycy, nadciśnienia czy leczeniu kamicy. Efekt ten wiąże się m.in. ze wzrostem eliminacji kwasów żółciowych z przewodu pokarmowego, co pociąga za sobą wzmożoną mobilizację endogennego cholesterolu do ich produkcji, przyspieszeniem wychwytu przez wątrobę LDL i VLDL, zahamowaniem tworzenia nadtlenków lipidowych. Tak działają np. saponozydy *Saponaria officinalis*, *Glycine max*, *Panax ginseng*, *Calendula officinalis* [239].

● działanie przeciwgrzybicze

Saponozydy wykazują wyraźne działanie fungistatyczne skierowane nie tylko przeciwko grzybom patogennym dla roślin lecz także dla człowieka. Ponieważ gromadzą się one przede wszystkim w organach najbardziej narażonych na zakażenie grzybicze (nasiona, korzenie) wysunięto hipotezę, iż funkcja ochronna jest ich podstawowym zadaniem w roślinie. U podstaw aktywności przeciwgrzybiczej saponozydów leży ich zdolność tworzenia kompleksów ze sterolami, naruszając bowiem prawidłowy skład błon czy ścian komórkowych hamują funkcje życiowe komórki [100].

Izolowane z *Camellia japonica* kamellidyny I i II zaburzają rozwój mikroorganizmów odpowiedzialnych za infekcje grzybicze liści herbaty, a mianowicie *Gloeosporium theae-sinensis* i *Pestalotia longisetata*. Są one również aktywne w stosunku do wielu innych roślinnych fitopatogenów [239]. Awenacyny chronią owies przed atakiem *Ophiobolus graminis*, a także *Gaeumannomyces graminis*. Oba grzyby, trudne do wytopienia przy pomocy syntetycznych fungicydów, są przyczyną niszczenia plonów m.in. nieopornych na nie pszenicy, gryki i ryżu [284,100,239]. Glikozydy kwasu medykanowego, obecne m.in. w korzeniach *Dolichos kilimandscharicus* i *Medicago sativa*, są skuteczne przeciwko różnym szczepom grzybiczym m.in. *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum*,

Aspergillus niger, *Trichoderma viride*, hamując prawie całkowicie ich wzrost przy stężeniu 40 $\mu\text{g/ml}$ [100,239].

Aktywność fungistatyczną wykazują ponadto pochodne hederageniny z *Cephalaria transylvanica* i *Pometia eximia* [135,117] oraz pochodne kwasu serjanowego z *Phytolacca octandra* [183]. Wysoko cenione przez medycynę starożytną i współczesną saponozydy żeńszenia dodane w ilości 5% do kultury *Aspergillus parasiticus* całkowicie hamują wytwarzanie przez niego aflatoksyn [239].

Aktywność glikozydów triterpenowych wobec ludzkich grzybów chorobotwórczych, potwierdzona w badaniach *in vitro*. Budzi ona pewne nadzieje szczególnie w leczeniu kandydoz. Ciekawe są zwłaszcza wyniki uzyskane dla virgaureasaponiny I z nawłoci, która hamuje wzrost *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, a także *Cryptococcus neoformans* [239,20]. Szczepy te są też wrażliwe na działanie saponin z *Polemonium caeruleum* [98]. Natomiast monodesmozydowa α -hederyna z bluszczu w dawce 100 mg/kg/10 dni okazała się równie skuteczna w leczeniu infekcji *Candida albicans* u myszy jak amfoterycyna B (dawka 2.5 mg/kg/6 dni) [19].

W przypadku rzędu *Primulales* potwierdzono eksperymentalnie działanie fungistatyczne kilku przedstawicieli rodzin *Myrsinaceae* i *Primulaceae*. Izolowany z liści *Maesa ramentacea* kompleks saponozydów hamował wzrost 10 szczepów odpowiedzialnych za schorzenia roślin uprawnych (MIC ok. 10 $\mu\text{g/ml}$) [210]. Sakurasosaponina, zidentyfikowana w *Primula sieboldi* i *Rapanea melanophloeos*, wykazuje działanie fungistatyczne wobec *Cladosporium cucumerinum* [205], natomiast kwas prymulowy (*Primula sp.*) działa na groźny dla ryżu grzyb *Pyricularia oryzae*, a ponadto *Trichothecium roseum* [301,300]. Kompleks saponozydów z *Primula acaulis* jest aktywny wobec szczepów *Candida*, a jego skuteczność zbliżoną do nystatyny, potwierdzono w testach klinicznych [19,170].

Nieliczne badania, w których podjęto próbę uchwycenia zależności między aktywnością fungistatyczną a elementami budowy chemicznej, sugerują iż istotną rolę może odgrywać obecność grupy hydroksylowej w pozycji 16 α (saponozydy *Solidago*), acetylacja grupy 18 β -hydroksylowej (saponozydy *Camellia*) czy mostek 13 β ,28-epoksydowy (saponozydy *Rapanea*). Siłę działania zwiększa obecność reszty kwasu uronowego w części cukrowej [239,205], a w przypadku pochodnych hederageniny – ramnoarabinozy [65]. Z reguły aktywne są jedynie monodesmozydy, jakkolwiek istnieją wyjątki np. bidesmozydowa virgaureasaponina I.

● działanie przeciwmięczakowe

Poszukiwania roślinnych związków o działaniu przeciwmięczakowym ukierunkowane są przede wszystkim na ich potencjalną skuteczność w leczeniu schistosomatoz. Schorzenia te są jednym z najpoważniejszych problemów parazytologicznych nękających ludność tropików, zwłaszcza na kontynencie afrykańskim i południowoamerykańskim. Cykl życiowy przywr wywołujących schistosomatozę jest ściśle związany z bytującymi w słodkowodnych zbiornikach ślimakami z rodzaju *Biomphalaria*, *Bulinus* i *Oncomelania*, w których namnażają się larwy [156].

Wiele saponozydów triterpenowych posiada aktywność przeciwmięczakową, przy czym

zainteresowanie skupia się na tych, które są dostępne na terenach zagrożonych i mogą być wyodrębnione przy zaangażowaniu niewielu środków. Jednym z najbardziej obiecujących surowców jest uprawiana w Zimbabwie a pochodząca z Etiopii *Phytolacca dodecandra*. Wyodrębniony z owoców tej rośliny i najbardziej aktywny galaktoglukozyd kwasu 2 β -hydroksyoleanolowego zabija wszystkie ślimaki przy stężeniu 10 ppm [276]. Równie silnie działa monodesmozyd kwasu oleanolowego (LC_{50} = 3 ppm) izolowany z owoców sudańskiego krzewu *Catunaregam nilotica*, rosnącego ponadto w Kamerunie, Nigerii i krajach wschodnioafrykańskich [159]. Także drugi gatunek – *C. spinosa* (syn. *Xeromphis spinosa*) zawiera aktywne saponozydy (dawka letalna od 15–20 ppm) [167]. Toksycznymi dla *Biomphalaria glabrata* surowcami saponozydowymi są też egipska *Gypsophila capillaris*, *Swartzia madagascariensis*, *Aesculus indica*, *Dodonea viscosa*, *Cussonia spicata* [100,167,61,239].

Literatura donosi o przeciwmączakowym działaniu kilku przedstawicieli rzędu *Primulales*. Izolowany z liści środkowoafrykańskiego drzewka *Rapanea melanophloeos* saponozyd, identyczny z sakurasaponiną korzeni *Primula sieboldi*, działa przeciwmączakowo przy 3 ppm [205]. Zbliżony do niego strukturą lysikokianozyd (z *Lysimachia sikokiana*), będący pochodną protoprymulageniny A, wykazuje aktywność przeciw *Oncomelania nosophora* już w stężeniu 2 ppm [142].

W badaniach *in vitro* na promastygotach *Leishmania brasiliensis* przeprowadzonych przez Lavaud *et al.* [158] aktywny w stężeniu 50 μ g/ml okazał się zespół saponozydów z boliwijskiej rośliny *Myrsine pellucida*.

Jak się wydaje, działanie przeciwmączakowe posiadają jedynie monodesmozydy, aktywność jest najwyższa dla pochodnych kwasu oleanolowego i hederageniny. Ważną rolę odgrywa ponadto obecność układu 13 β ,28-epoksydowego dla pochodnych oleananu, oraz kwasu glukuronowego w części cukrowej [205,159,100].

Wyniki badań wpływu subletalnych dawek saponozydów z *Tetrapleura tetraptera* (aridanina i bajluscyd) na zawartość glikogenu i białek ślimaka *Biomphalaria glabrata* wskazują, iż mechanizm działania przeciwmączakowego może polegać na zaburzeniu metabolizmu węglowodanów [3].

● działanie plemnikobójcze i antykoncepcyjne

Aktywność plemnikobójcza saponozydów triterpenowych oraz ich wpływ na wydzielanie żeńskich hormonów płciowych budzi zainteresowanie ze względu na potencjalne zastosowanie w antykoncepcji. Znamienny jest fakt, iż w wielu krajach medycyna ludowa korzysta nadal z surowców saponinowych w celu kontroli urodzeń. Z kory afrykańskiej rośliny *Petersianthus macrocarpus*, stosowanej przez miejscowych jako środek zapobiegający ciąży i wczesnoporonny, wyizolowano zespół glikozydów triterpenowych, które stymulowały *in vitro* uwalnianie hormonu luteinizującego (LH) i gonadotropiny przez kulturę komórek przysadkowych. Najwyższą aktywność stwierdzono w przypadku petersaponiny 1, która działała proporcjonalnie do dawki. Sugerowany mechanizm polega na zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej dla białek [114].

Z kolei działanie plemnikobójcze tłumaczy się jako skutek zniszczenia pierwotnej struktury błony plazmatycznej plemników, a jego siła jest w pewnym stopniu związana z hydrofobowością cząsteczki. Literatura podaje m.in. dane o aktywności saponozydów *Bolbostemma paniculatum*, *Pentapanax leschenaultii*, *Gypsophila paniculata*, *Mussaenda pubescens*, *Pittosporum neelgherense*, *Acacia concinna* [239,322,100]. Mono-, di- i trisacharydy hederageniny z *Hedera nepalensis* całkowicie immobilizowały ludzkie plemniki (stężenie 0.5 – 1.125%) [239].

Bidesmozydy są zazwyczaj nieaktywne jakkolwiek stwierdzono, iż frakcja saponinowa z owoców rosnącej w Indiach *Acacia auriculiformis*, zawierająca właśnie takie dwułańcuchowe triterpenowe glikozydy, posiada silne działanie plemnikobójcze [164]. Monodesmozydowe prosapogeniny, otrzymane po hydrolizie saponin *Phytolacca dodecandra* i *Polygala chamaebuxus*, a mianowicie odpowiednio lemmatoksyna i tenuifolina, niszczyły ludzkie spermatozoidy w przeciągu 3 minut, przy stężeniach 0.05 i 4 mg/ml. Zbliżoną aktywność (1 mg/ml) zarejestrowano dla disacharydu kwasu oleanolowego izolowanego z *Sesbania sesban* [239]. Sam aglikon badano na szczurach testując jego wpływ na plenność zwierząt. Po 60 dniach zaobserwowano znaczne zahamowanie spermatogenezy przy jednoczesnym braku efektów ubocznych na komórki Leydiga, Sertoliego i komórki tworzące plemniki [221].

Wśród roślin należących do *Primulales* aktywność plemnikobójczą stwierdzono m.in. dla pochodnych cyklamiretyny A z *Ardisia crenata* oraz saponozydów *Primula vulgaris* Huds. i *Cyclamen persicum*, które w przeciągu zaledwie 20 sekund immobilizują ludzkie plemniki już w rozcieńczeniu 1:1000 [296,239]. Inny gatunek pierwiosnkowatych *Androsace septentrionalis* zawiera glikozydy triterpenowe o potencjalnym działaniu antykoncepcyjnym. Zmieniają one poziom LH i LSH w przysadce i osoczu, a ED₅₀ zapobiegające ciąży u szczurów wynosi 100 mg/kg [239].

● działanie przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne

O działaniu przeciwbakteryjnym saponozydów triterpenowych wspominał m.in. Tschesche w swoim opracowaniu dotyczącym roślinnych substancji antybiotycznych [284]. Aktywność poszczególnych związków jest w pewnym stopniu zależna od ich własności hemolitycznych. Utrata zdolności do hemolizy, np. w wyniku hydrolizy estrowo związanych z geniną kwasów, pociąga za sobą zanik aktywności antybiotycznej. Escyna hamuje narastanie szczepu *Staphylococcus aureus*, podobnie jak izolowane z roślin rodziny *Primulaceae* kwas prymulowy i cyklamina, które są aktywne także wobec *Escherichia coli* i *Pseudomonas pyocyaneus* [303]. Znanymi przeciwbakteryjnie działającymi glikozydami triterpenowymi są też np. spinasaponiny A i B ze *Spinacia oleracea* oraz inne saponozydy też izolowane z *Chenopodiaceae* [100]. We wstępnych badaniach wyciągów metanolowych z *Pometia eximia* [117] a także *Cephalaria transsylvanica* [135] wykazano ich aktywność przeciwbakteryjną. Ten drugi gatunek stosowano w medycynie ludowej (Turcja) do zwalczania rozmaitych chorób infekcyjnych. Saponiny *Hydrocotyle asiatica* są aktywne w salmonellozach [239].

Roślinnych związków o działaniu przeciwwirusowym, podobnie jak i syntetycznych, jest

stosunkowo niewiele. Spośród roślin saponinowych wyróżniają się należące do pierwiosnkowatych *Primula veris*, działająca przeciw wirusowi grypy typu A₂ [19], oraz *Anagallis arvensis*. Amoros [11] stwierdził, iż wyciąg alkoholowy z całej rośliny jest aktywny wobec wirusa **Herpes simplex typ 1** (HSV-1) oraz **Polio**. W późniejszych badaniach potwierdzono te wyniki testując główny saponozyd kurczyślądu, a mianowicie glikozyd anagalligeniny B. Okazał on się jednak nieskuteczny przeciw adenowirusowi typ 6, wirusom **vaccinia** i **vesicular stomatitis (VSV)** [239]. Natomiast holoturynozydy wyodrębnione z należącego do morskich bezkręgowców *Holothuria forskalii* w stężeniu 20 µg/ml w 20% ograniczały rozwój VSV oraz wirusa nerki chomika BHK [229].

Glicyryzyna, saponozyd obecny w szeroko stosowanej w medycynie lukrecji gładkiej (*Glycyrrhiza glabra*), hamuje *in vitro* replikację niektórych wirusów DNA i RNA, m.in. wirusa grypy typ A, HSV-1, **varicella-zoster (VZV)** i HIV, podobnie jak sojasaponiny. Jest też skuteczna w profilaktyce i leczeniu wirusowego zapalenia wątroby [289,280,19]. Mechanizm działania glicyryzyny nie jest do końca wyjaśniony, wiadomo że nie inaktywuje ona bezpośrednio komórek wirusa, nie stymuluje też produkcji interferonu. Wyższą niż glicyryzyna aktywnością charakteryzują się saponozydy pochodne kwasu oleanolowego z nagietka *Calendula arvensis* [280]. W badaniach na dwóch wirusach RNA tj. **vesicular stomatitis virus (VSV)** i **rhinovirus typ 1B (HRV 1B)**, którymi zakażono komórki CER i HeLa okazało się, że saponozydy hamują zwłaszcza replikację VSV czyli wirusa otoczkowego, przy stężeniach nie przekraczających stężenia cytotoksycznego. Podobne wyniki zaobserwowano dla glicyryzyny, która również była nieaktywna wobec bezotoczkowych wirusów (np. polio typ 1), natomiast w 100% hamowała wzrost VSV (stężenie 5.33 mg/ml).

Ushio [289] badając wpływ saikosaponiny d (ssd), izolowanej z korzeni *Bupleurum falcatum*, na bezotoczkowy wirus polio oraz osłonięte glikoproteidową otoczką wirusy RNA (measles virus) i DNA (**herpes virus**) stwierdził, że jest ona aktywna jedynie wobec tych ostatnich. Autor sugeruje, iż mechanizm działania polega na interakcji ssd z resztami kwasu siałowego glikoprotein wirusowej otoczki prowadząc do jej zniszczenia. Zaobserwowano jednocześnie, iż aktywność przeciwwirusowa jest silnie skorelowana z wpływem cytotoksycznym na zakażone komórki Vero. Wynika stąd, że ssd w przeciwieństwie np. do saponin kurczyślądu, nie działa poprzez interakcję z błoną komórek gospodarza, co uniemożliwiałoby dalsze wnikanie do niej wirusa.

Stwierdzoną *in vitro* aktywność przeciwwirusową posiadają też m.in. giganteazyd D i flacydyna B z *Anemone flaccida*, pochodne protoprymulageniny A i prymulageniny A z nowozelandzkich gatunków *Myrsine*, rosalmultyna i kajiiichigozyd F1 z pochodzącego z Chin surowca leczniczego – *Sargentodoxa cuneata* [239,233,27].

Glikozydy triterpenowe z *Gymnocladus chinensis*, *Gleditsia japonica*, *Bolbostemma paniculata*, *Wistaria brachybotrys*, glicyryzyna, a także wolne kwasy oleanolowy i ursolowy, hamują aktywację wczesnego antygeny onkogenego wirusa Epstein–Barra (EBV–EA) wywołaną octanem 12–O–tetradekanyloforbolu (TPA) i teleocydyną B–4 [239,278,201, 19,178]. Jak się uważa, substancje o takim działaniu mają również zdolność hamowania rozwoju nowotworów *in vivo*, z tego względu badania wpływu na EBV–EA traktowane mogą być jako wstępny test potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej [107,106]. Istotnym dla działania elementem budowy strukturalnej jest obecność grupy ketonowej

lub hydroksylowej w pozycji C–22, oraz glikozydacja grupy OH przy węglu C–3 [19].

● *działanie cytotoksyczne*

Jak podaje Sadowska [235] saponozydy triterpenowe stanowią jedną z wyselekcjonowanych grup metabolitów roślinnych, w obrębie których poszukuje się związków o potencjalnej aktywności kancerostatycznej. Od dawna znane jest działanie cytotoksyczne, np. wobec raka Walkera, cyklaminy, seneginy, kwasu prymulowego czy escyny, jednak wysoka toksyczność tych związków uniemożliwia ich praktyczne wykorzystanie [100,284]. Większe nadzieje wiąże się z estrowymi saponozydami klonu jesionolistnego *Acer negundo*, których toksyczność jest relatywnie niska [100,19].

W ostatnich latach obiecujące wyniki testów *in vitro* na doświadczalnych liniach nowotworowych uzyskano m.in. dla ginsenozydów Rg₁, Rh₂ i Rf, glicyryzyny, α -hederyny, pfafozydów A i F (*Pfaffia paniculata*), fetozydu C i talikozydu A (*Thalictrum sp.*), holoturyny A i B oraz holoturynozydu A i C (*Holothuria sp.*), giganteazydu D i flacydyny B (*Anemone flaccida*), saponin z *Entada phaseloides*, *Collubrina elliptica*, *Sideroxylon cubense*, *Dolichos falcatus*, *Myrsine sp.* czy *Bupleurum sp.* Aktywne są też same geniny jak np. kwas glicyretynowy czy hipoeskulina (*Aesculus hippocastanum*) [239,19,227,163,27,229,53,206,121].

Badania te prowadzono na komórkach raka Walkera, KB (ludzki rak jamy ustnej), raka Ehrlicha, HeLa (ludzki rak szyjki macicy), sarkoma 180, B–16 melanoma (czerniak barwnikowy myszy), oraz liniach białaczek limfatycznych mysich L1210, P-388, HL–60, Skringowe testy przeprowadzone przez Danloy *et al.* [53] wykazały, iż silnym środkiem hamującym proliferację B–16 jest α -hederyna (w stężeniu poniżej 5 μ g/ml, po 8 h). Równie aktywny (2 μ g/ml, wobec HL–60) jest ginsenozyd Rh₂, tetrasacharyd protoprymulageniny A z *Myrsine australis* (0.85 μ g/ml wobec P–388) czy cykliczny tubeimozyd 1 [239,27,321]. Ten ostatni hamował narastanie komórek ludzkich nowotworów złośliwych A–172, GOTO, PANC–1, COLO320DM, HeLa i HGC–27 przy stężeniu IC₅₀ odp. 0.15; 0.24; 0.27; 0.43; 0.79 i 0.80 μ mol/l. Interesujący jest fakt, iż surowiec *Bolbostemma paniculatum* był stosowany w leczeniu raka piersi przez medycynę chińską już w okresie dynastii Qing.

Jak stwierdzono, saponozydy *Panax ginseng* i *Hedera helix* oprócz działania cytotoksycznego wykazują też działanie demutagenne, hamując transformację komórek w złośliwe formy nowotworowe poprzez stymulację reparacyjnego DNA [227,53].

Mechanizmów leżących u podstaw aktywności przeciwnowotworowej saponozydów jest kilka. Działają one albo wprost: zaburzając przebieg mitozy (glicyryzyna), hamując syntezę DNA czy RNA (tubeimozyd, holoturynozydy, ginsenozydy), powodując wakuolizację cytoplazmy i uszkodzenie powierzchni komórek co doprowadza w końcowym efekcie do ich śmierci (α -hederyna); lub też na drodze pośredniej: poprzez inaktywację wirusów onkogennych (gymnokladusaponina G), wzrost produkcji interferonu i interleukiny 2 (ginsenozydy), stymulację komórek NKC – *natural killer cells* (sojasaponiny) czy wpływ na układ immunologiczny (astragalusaponina I) [239,19,53,321,227].

Quetin-Leclercq *et al.* [219] w badaniach *in vitro* na czterech liniach nowotworowych (m.in. HeLa, B16) kilkunastu saponozydów i sapogenin, izolowanych z *Hedera helix*, *Sapindus mukorossi*, *Calendula officinalis* i *C. arvensis*, ustalił pewne zależności między stopniem aktywności a budową chemiczną. Zdecydowanie silniej działały monodesmozydy (ok. 10 $\mu\text{g/ml}$). Bidesmozydy, choć nie powodowały efektu cytotoksycznego *in vitro* w stężeniach aż do 200 $\mu\text{g/ml}$, okazały wyższą skuteczność w testach *in vivo*. Jak sugerują inni autorzy [121], również rodzaj i skład łańcucha cukrowego może odgrywać istotną rolę. Dla aglikonów trudno wysnuć jakieś jednoznaczne wnioski, np. kwas glicyretynowy działa silniej, a hederagenina słabiej niż odpowiednie saponozydy [219]. Obecność grupy ketonowej czy hydroksylowej przy węglu C-28 w sapogeninach typu protoprymulageniny wydaje się być odpowiedzialna za spadek aktywności cytotoksycznej glikozydów [27].

W literaturze można ponadto znaleźć dane o pozytywnych efektach prób *in vivo* na zwierzętach z implantowanymi nowotworami jak również testów klinicznych np. z użyciem ginsenozydów czy sojasaponin [19].

● *działanie immunostymulujące*

Saponozydy działają immunostymulująco zwiększając zarówno odporność humoralną jak i komórkową. Po podaniu doustnym aktywują komórki T i B oraz wzmagają fagocytozę makrofagów. Wyraźną stymulację proliferacji komórek T i B zaobserwowano po podaniu myszom saponozydów *Quillaja saponaria*, *Bupleurum falcatum*, czy *Glycyrrhiza glabra* [239,307]. W teście fagocytozy granulocytów *in vitro* kompleks saponozydów z *Bupleurum fruticosum* w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ wywołał 57% stymulację. Izolowane z *B. falcatum* saikosaponiny a i d znacznie wzmagają zdolności fagocytarne makrofagów, a także podnosiły poziom komórkowego enzymu lizosomalnego (kwaśnej fosfatazy) oraz ekspresję antygeny Ia na powierzchni komórki. Siła tego działania była porównywalna z lipopolisacharydem i znacznie silniejsza niż aktywność glicyryzyny czy ginsenozydu Rg1 [152]. Zdolności ochronne saikosaponin potwierdzono badając wzrost niespecyficznej odporności u myszy zainfekowanych *Pseudomonas aeruginosa* i *Listeria monocytogenes* [151]. Aktywność jest ściśle uzależniona od obecności mostka 13 β ,28-epoksydowego oraz grupy hydroksylowej w położeniu 16 β [79].

Poza saponozydami *Bupleurum*, korzystny wpływ na efektywność komórek fagocytujących wywierają również saponozydy *Panax sp.*, *Dodonea viscosa*, *Astragalus membranaceus* czy *Aralia mandshurica* [239,19,297].

W 1993 roku opublikowano informacje o pierwszym przypadku saponozydu wywołującego zależny od dawki efekt immunomodulujący. Bidesmozyd gipsogeniny – skwarrozyd A, izolowany z *Acantophyllum squarrosum*, w teście Wagnera mierzącym proliferację limfocytów *in vitro*, wykazywał działanie immunostymulujące w stężeniu 10 pg/ml , a w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ działanie immunosupresyjne [154].

● *inne kierunki działań*

Wśród wielu innych efektów farmakologicznych zaobserwowanych w badaniach saponozydów zwraca uwagę ich aktywność antyhepatotoksyczna. Główny saponozyd lukrecji gładkiej glicyryzyna redukuje toksyczne działanie czterochlorku węgla i D-galaktozaminy wobec hepatocytów szczura *in vitro*. Silniejsze działanie protekcyjne posiada sam aglikon – kwas glicyretynowy, który mocniej adsorbuje się na powierzchni komórek. Hamował on ucieczkę transaminazy z uszkodzonych hepatocytów już w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$. Podobnie, w badaniach *in vivo* po podaniu doustnym znacznie (70%) obniżał podniesiony po D-galaktozaminie poziom enzymu [195]. Takeshita *et al.* [273] stwierdził, iż w eksperymentalnym uszkodzeniu komórek wątroby skuteczna jest sojasaponina I, oraz inne pochodne oleananowe posiadające podstawnik metylowy przy węglu C-17 i liczne funkcje tlenowe w pierścieniu E. Równie znaczące wyniki uzyskano w testach hepatotoksyczności przeprowadzonych z użyciem papyriozydów i papyriogenu *Tetrapanax papyriferum* [97].

Prewencyjne podawanie szczurom saikosaponiny-d wpływało natomiast korzystnie na stopień indukowanej czterochlorkiem węgla marskości wątroby [2]. Inny saponozyd izolowany z *Bupleurum falcatum* – saikosaponina a, okazała się skuteczna w leczeniu zmian hepatotoksycznych wywołanych D-galaktozaminą. Hepatoochronne działanie posiada też budlejasaponina IV z *Bupleurum fruticosum*, która w dawce 1 mg/ml działała silniej niż sylibina (badania prowadzono na izolowanych hepatocytach) [79].

Warto wspomnieć, iż saikosaponiny a i d (5 mg/kg i.p.) redukowały również zmiany histopatologiczne w uszkodzonych nerkach szczurów i zmniejszały ucieczkę białka z moczem [87].

Wyciąg z korzeni *Ardisia crispa* – surowca stosowanego w tradycyjnej medycynie tajskiej w leczeniu bóli menstruacyjnych, kurczył mięśnie gładkie izolowanej szczurzej tkanki macicy. Za działanie to w głównej mierze są odpowiedzialne glikozydy cyklamiretyny A, ardisiakrispina A i B, które w stężeniu 8 $\mu\text{g/ml}$ wywołują reakcję zbliżoną do acetylocholinę (0.2 $\mu\text{g/ml}$) [116]. Podobny efekt stwierdzono również w przypadku saponozydów z *Achyranthes bidentata* [239]. Z kolei glikozydy triterpenowe izolowane z *Hydrocotyle asiatica* czy *Hedera helix* działały spazmolitycznie [4].

Należąca do rodziny *Apiaceae* *Centella asiatica* była stosowana przez medycynę ludową jako środek zblizniający. W badaniach *in vitro* na ludzkich fibroblastach stwierdzono, iż zawarte w roślinie kwas azjatykowy i azjatykozyd stymulują syntezę kolagenu I (w stężeniu 4.5 $\mu\text{g/ml}$) [28].

Warte uwagi jest bardzo silne działanie miejscowo znieczulające kwasu prymulowego (stężenie 0.0001%), przewyższające siłą znany anestetyk lokalny – lignokainę [51].

Znany jest wpływ psychotropowy saponozydów zwłaszcza roślin należących do rodziny *Araliaceae*, lecz także wielu innych. Działają one sedatywnie i neurotrankwilizująco (np. ginsenozyd Rb₁, saponozydy *Cussonia barteri*, *Aster batangensis*) lub wzmagają aktywność, działając psychoenergizująco (np. aralozydy A,B,C) [256,239,100,251].

1.6.1 Elementy biofarmacji i farmakokinetyki saponozydów

Saponozydy z reguły ułatwiają wchłanianie z przewodu pokarmowego słabo absorbujących się substancji zwiększając tym samym ich biodostępność. Czasem jednak ich podanie prowadzi do wręcz odwrotnych skutków. I tak, silny wpływ hamujący wchłanianie etanolu stwierdzono w przypadku glikozydów z korzenia *Polygala senega var. latifolia*. Najbardziej aktywne były senegasaponiny a i b oraz senegina II, podane w dawce 100 mg/kg *p.o.*. Wyniki badań wskazują, iż dla działania niezbędna jest obecność zestryfikowanego kwasem metoksycynamonowym łańcucha cukrowego przy węglu C-28 [317]. Saponozydy z *Gypsophila paniculata* zmniejszają wchłanianie żelaza, z kolei te izolowane z *Acanthopanax chiisanensis*, *Momordica cochinchinensis* czy *Gymnema inodorum*, a także *Glycine soja* i *Panax ginseng*, hamują absorpcję glukozy z przewodu pokarmowego, obniżając tym samym poziom cukru we krwi. Predestynuje to w/w surowce do stosowania w leczeniu wspomagającym niektórych postaci cukrzycy [239,17,294].

Saponozydy wiążą się z białkami krwi w różnym stopniu. Zależy to przede wszystkim od proporcji pomiędzy hydrofilnym glikonem i stopniem hydrofobowości geniny. W badaniach farmakokinetycznych ginsenozydów okazało się na przykład, iż saponozydy typu protopanaxadiolu silniej wiążą się z białkami, ich klirens nerkowy jest niższy niż bardziej hydrofilnych związków z grupy protopanaxatriolu [42].

1.7 Rozpowszechnienie

Saponozydy rozpowszechnione są przede wszystkim wśród roślin wyższych, choć stwierdzono je także u *Basidiomycetes* (hebewinozydy). Stanowią jedną z najczęściej syntetyzowanych grup tzw. metabolitów wtórnych. Z reguły gatunki należące do klasy Jednoliściennych wytwarzają saponozydy steroidowe (choć wyjątkiem jest np. rodzaj *Digitalis* czy *Trigonella* zaliczany do *Dicotyledones*), natomiast wśród Dwuliściennych spotyka się głównie triterpenowe (tu przykładem odstępstwa są triterpenowe krokosmiozydy i desacylomasoniozydy izolowane z roślin rodzaju *Crocoshia* *fam. Iridaceae*). Glikoalkaloidy są w zasadzie ograniczone do Psiankowatych. Ogółem szacuje się, iż saponozydy produkuje ponad 75 % rodzin, obejmujących łącznie kilkaset gatunków [256,100,16].

Mimo, iż są to związki charakterystyczne dla świata roślin, zidentyfikowano je także u zwierząt, a mianowicie w kilku gatunkach morskich bezkręgowców należących do *Echinodermata/Holothuroidea* i *Dendrochirota/Cucumariidae*. Jest to raczej wśród fauny przypadek odosobniony, jakkolwiek ciekawy ze względu na rzadką strukturę występujących tu saponozydów (odp. typ norlanostanu i holostanu) [239].

Glikozydy triterpenowe w obrębie *Dicotyledones* rozpowszechnione są głównie wśród *Magnoliatae*, obfitują w nie zwłaszcza rodziny *Araliaceae*, *Caryophyllaceae*, *Hippocastanaceae*, *Leguminosae*, *Polygalaceae*, *Primulaceae*, *Umbelliferae*, *Sapindaceae*. Z kolei wśród gatunków należących do *Lamiaceae* spotykane są niezmiernie rzadko [100]. W ostatnich latach wyizolowano kilka bidesmozydów kwasu echinocystowego z należącego do tej rodziny gatunku *Stachys riederi* [309].

W niektórych przypadkach obecność saponin traktowana jest jako charakterystyczny element chemotaksonomiczny jak np. u Pierwiosnkowatych czy w rodzinie *Myrsinaceae* [92]. Czasem badanie ich obecności i składu w jakimś rodzaju pozwala na prześledzenie kierunków geograficznego rozprzestrzeniania się obejmowanych przez niego gatunków. Takie chemotaksonomiczne badania prowadzono np. na afrykańskich i południowo-amerykańskich roślinach rodzaju *Combretum* [230].

W ostatnich latach saponozydy podobnie jak inne związki o interesujących właściwościach farmakologicznych próbuje się pozyskiwać z kultur komórkowych, jakkolwiek z niewielkim powodzeniem. Jedną z pierwszych udanych prób jest izolacja eskulentozydów A, B, S i H z hodowli korzeni transformowanych *Phytolacca acinosa* (Strauss, 1995), ich zawartość, około 6%, zbliżona jest do obserwowanej w normalnie hodowanym surowcu. Wydajność w przeliczeniu na objętość pożywki dla dominującego eskulentozydu B wynosi 0.12 g/l [264].

1.7.1 Lokalizacja, zawartość i rola w roślinie

Saponozydy zlokalizowane mogą być we wszystkich częściach rośliny jak w *Anagallis arvensis* [76] lub ograniczone do jakiegoś wybranego organu. Spinasoniny A i B ze *Spinacea oleracea* L. występują np. praktycznie jedynie w korzeniach [284], natomiast w *Glycyrrhiza glabra* L. rozkład saponin jest nierównomierny. Glicyryzynę stwierdzono tylko w zdrewniałych częściach starszych korzeni, a sojasaponiny w całej roślinie [90].

Saponozydy często występują w surowcu jako mieszaniny kilku, kilkunastu lub więcej glikozydów np. w żeńszenu (ok.10), kasztanowcu (około 30) [256]. Mogą być one oligosacharydami zarówno tego samego jak i różnych typów aglikonu, przykładowo w *Thalictrum sp.* (rodz. *Ranunculaceae*) stwierdzono obok siebie glikozydy cykloartanu i oleananu [319]. Zdarza się też, że w roślinie współobecne są zarówno pochodne triterpenowe jak i sterydowe. Taką sytuację zaobserwowano m.in. w *Avena sativa*, gdzie w liściach i nasionach zidentyfikowano steroidowe awenakozydy, a w korzeniach triterpenową awenacynę [284].

Skład frakcji saponozydowej może się też wahać zależnie od lokalizacji geograficznej. Rosnące w Afryce gatunki *Phytolacca dodecandra* klasyfikowane są do dwóch głównych typów. W jednym, spotykanym zwłaszcza na obszarze Etiopii, procentowy udział glikozydów kwasu oleanolowego jest niezmiernie wysoki (>82%) podczas gdy w drugim, z rejonu Zimbabwe, niski [276].

Zawartość saponozydów w surowcu, choć może sięgać od ok. 0.0003% (korjoginsenozyd – R₁ z *Panax ginseng* [130]) aż do 30% (escyna [99]), mieści się średnio w granicach od 0.1 do 10% [100,284]. Jest ona jednak różna w poszczególnych organach, a ponadto ulega znacznym fluktuacjom zależnie od okresu wegetacyjnego, pory roku, a nawet pory dnia. I tak ilość sojasaponin w nasionach i młodych korzeniach lukrecji gładkiej (odp. 0.35% i 0.82%) wielokrotnie przekracza ich zawartość w liściach czy łodygach (odp. 0.001%, 0.001%) [90]. W przypadku bluszczu (*Hedera helix* L.) natomiast, liście są dwukrotnie bogatsze w glikozydy hederageniny niż łodygi, a owoce aż czterokrotnie, podobnie kształtują się różnice w zawartości, też tu obecnych, pochodnych kwasu oleanolowego. Przeprowadzone przez Mansouri obserwacje ontogenetyczne wykazały istotne wahania w ilości saponozydów między pędami wegetatywnymi a progresywnymi. Te pierwsze zawierają bowiem 5–10 krotnie więcej glikozydów kwasu oleanolowego, a drugie z kolei więcej pochodnych hederageniny i jakkolwiek w przypadku pędów progresywnych praktycznie nie ma różnic w zawartości saponozydów w roślinach zebranych w poszczególnych porach roku, to dla pędów wegetatywnych najwyższą ich ilość stwierdzono jesienią [169].

Wyraźną korelację między zawartością saponin a ontogenezą zaobserwowano też m.in. w *Medicago sp.* czy *Ilex opaca*. Ilość glikozydów osiąga tu najwyższy poziom w młodych liściach, a w miarę starzenia się rośliny spada [192]. Z kolei escyny jest tym więcej im starszy jest okaz kasztanowca.

Literatura podaje wiele danych dotyczących sezonowości występowania różnic w procentowej zawartości tych związków. Zaobserwowano na przykład, iż owoce *Phytolacca dodecandra* zebrane w porze suchej są znacznie bogatsze w saponozydy niż te zbierane

w porze deszczowej. Odwrotnie w *Medicago sativa*, gdzie ich produkcja wzrasta w miesiącach deszczowych wraz ze wzrostem rośliny. Z drugiej strony w kilkunastu przebadanych gatunkach *Cyclamen sp.* zawartość saponozydów jak i ich wzajemny stosunek jest zasadniczo niezależny od fazy wegetacyjnej [226].

Stosunkowo niewiele jest informacji dotyczących wahań dobowych notowanych często w przypadku innych metabolitów wtórnych jak np. alkaloidy. Dla *Phytolacca dodecandra* stwierdzono pewną tendencję do wzmożonej produkcji saponozydów pomiędzy godziną 12tą a 16tą po południu [192].

Prawdopodobnie zmiany ontogenetyczne oraz sezonowe, a także charakterystyczny rozkład saponin w poszczególnych częściach rośliny, są wynikiem zarówno aktualnie dominujących warunków klimatycznych jak i stopnia zagrożenia przez rozmaite czynniki. Metabolity te nie są bowiem jedynie ubocznymi produktami przemiany materii lecz spełniają w roślinie konkretną funkcję, broniąc ją przed patogennymi grzybami i bakteriami, termitami czy nawet ptakami i gryzoniami. W związku z tym ich ilość podlega bardzo elastycznej kontroli.

W przypadku w/w *I. opaca*, wysoka zawartość saponozydów w młodych, bogatych w składniki odżywcze liściach chroni je przed potencjalnymi roślinożercami. Równie nieatrakcyjne są niedojrzałe owoce *Phytolacca dodecandra*. Poziom saponin spada w nich dopiero po wykształceniu nasion, co sprzyja ich rozsiewaniu przez ptaki [192].

Awenacyna gromadząc się w korzeniach owsa zapobiega ich zaatakowaniu i zniszczeniu przez grzyba *Ophiobolus graminis*, a zimowa kumulacja saponin *Betula papyrifera* czy *Ternstroemia japonica* zabezpiecza te drzewa przed termitami [100,284,192]. Funke w swoich badaniach wykazał, że wszystkie elementy drewniane w świątyniach pochodzących z epoki Majów i Azteków, które zachowały się do dnia dzisiejszego, oparły się termitom właśnie dzięki wysokiej zawartości saponin [284].

Z reguły mniej aktywne biologicznie lecz lepiej rozpuszczalne w wodzie formy bidesmozydowe traktowane są jako transportowe czy "spoczynkowe". Dopiero w momencie zaatakowania rośliny np. przez patogenne grzyby, zostają one "zmobilizowane" i przetransportowane do zagrożonych organów, a następnie przekształcone pod wpływem enzymów uwolnionych z uszkodzonych tkanek w odpowiednie, wysoce aktywne monodesmozydy [100,284]. Tak się dzieje np. w *Hedera helix*, gdzie z hederasaponiny C, która normalnie dominuje w surowcu, tworzy się aktywna przeciwgrzybiczo α -hederyna [100].

1.8 Saponozydy w rodzinie *Primulaceae*

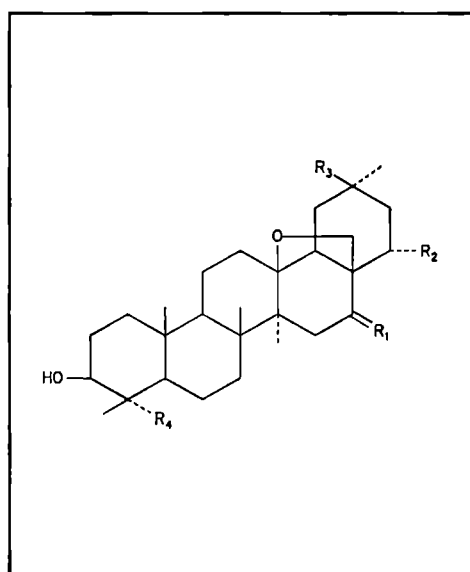
Według Hegnauera [92] obecność saponozydów wydaje się być wspólną cechą Pierwiosnkowatych. W latach dwudziestych i trzydziestych przebadano pod kątem ich występowania przedstawicieli rodzajów *Anagallis*, *Androsace*, *Bryocarpum*, *Cortusa*, *Cyclamen*, *Dionysia*, *Dodecatheon*, *Douglasia*, *Hottonia*, *Lysimachia*, *Pelletiera*, *Pomatosace*, *Primula*, *Samolus*, *Soldanella*, *Trientalis*. Dla ponad 60 gatunków *Primula* określono też indeks hemolityczny.

Pomimo to, dokładna budowa większości saponozydów z *Primulaceae* jest do tej pory nieznana. Zaledwie z kilkunastu gatunków izolowano tzw. surową frakcję saponinową. Jej zawartość może się wahać od 0.4% (*Primula denticulata* – cała roślina [291]) do 16% (*Primula sieboldi* – korzenie [137]). W większości przypadków określono jedynie budowę aglikonu, pierwszą pełną strukturę podał w 1976 roku Kitagawa (sakuraso–saponina z *P. sieboldi* [138]). Od tej pory opracowano związki izolowane zaledwie z kilkunastu gatunków. Są to prawie wyłącznie monodesmozydowe glikozydy triterpenowe, pochodne oleananu z niezwykle charakterystycznym mostkiem tlenowym pomiędzy węglami C–13 a C–28, lub też pozbawione go układy z wiązaniem podwójnym Δ^{12} .

Łańcuch cukrowy, złożony zazwyczaj z kilku monosacharydów (do 5), prosty lub rozgałęziony, tworzą z reguły glukoza, galaktoza, arabinoza, ksyloza, ramnoza i kwas glukuronowy, który często jest ogniwem łączącym glikon z saponiną.

Spośród zidentyfikowanych do tej pory aglikonów saponin izolowanych z roślin należących do *Primulaceae* [140,10,166,138,47] można wymienić:

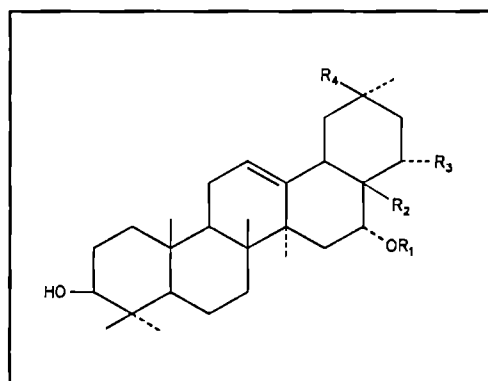
● struktury z mostkiem 13 β ,28–epoksydowym



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|------------------------------|--------------------------|----------------|----------------------|-----------------|
| cyklamiretyna A | α -OH, β -H | H | CHO | CH ₃ |
| cyklamigenina A ² | =O | H | H | CH ₃ |
| cyklamigenina B | =O | H | CHO | CH ₃ |
| cyklamigenina D' | =O | H | CH(OMe) ₂ | CH ₃ |
| prywerogenina B | α -OH, β -H | OH | CH ₃ | CH ₃ |
| prywerogeniny B | α -OH, β -H | OAc | CH ₃ | CH ₃ |
| anagalligenon B | =O | H | CH ₃ | CH ₃ |
| protoprymulagenina A | α -OH, β -H | H | CH ₃ | CH ₃ |
| anagalligenina B | α -OH, β -H | H | CH ₃ | OH |
| anagalligenina A (28-OH) | α -OH, β -H | OH | CH ₃ | CH ₃ |

Rys. 18 Aglikony *Primulaceae* - posiadające szkielet 13 β ,28-epoksydowy.

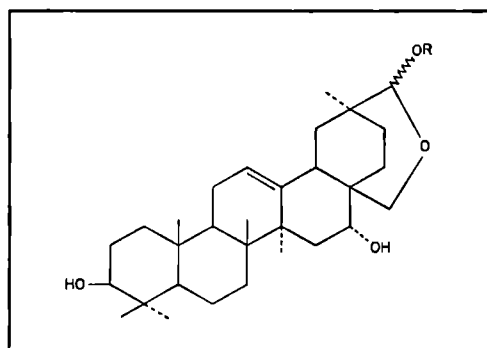
● układy z wiązaniem podwójnym Δ^{12}



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|----------------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|
| cyklamiretyna D | H | CH ₂ OH | H | CHO |
| prymulagenina A | H | CH ₂ OH | H | CH ₃ |
| 28-dehydro-prymulagenina A | H | CHO | H | CH ₃ |
| kwas echinocystowy | H | COOH | H | CH ₃ |
| prywerogenina A | H | CHO | OH | CH ₃ |
| kameliagenina A | H | CH ₂ OH | OH | CH ₃ |
| pridentigenina E | H | CH ₂ OH | H | CH ₂ OH |
| kameliagenina C (23-OH) | H | CH ₂ OH | OH | CH ₃ |
| kameliagenina B (23-CHO) | H | CH ₂ OH | OH | CH ₃ |

Rys. 19 Sapogeniny *Primulaceae* - z wiązaniem Δ^{12} .

● układy z wiązaniem podwójnym Δ^{12} i mostkiem 28,30-epoksydowym



| | | |
|------------------------------|-------------|---------|
| cyklamigenina A ¹ | 30 β | R=Etyl |
| cyklamigenina C | 30 α | R=Etyl |
| pridentigenina C | | R=Metyl |

Rys. 20 Sapogeniny *Primulaceae* cd.

Wyżej wymienione geniny opisane są też pod nazwami:

| | |
|-------------------------|---|
| pridentigenina E | = cyklamiretyna E |
| kameliagenina C | = teasapogenol C |
| kameliagenina B | = kameliasapogenol II |
| kameliagenina A | = barrigenol A ₂ , teasapogenol D, kameliasapogenol I, dihydroprywerogenina A, teasapogenina I |
| anagalligenina B | = 23-OH protoprymulagenina A |

Gatunkami należącymi do rodzaju *Primula* zajmował się przede wszystkim Tschesche *et al.* oraz Kitagawa *et al.* W latach 60-tych i 70-tych autorzy ci opublikowali szereg prac dotyczących identyfikacji oryginalnych sapogenin, zwracając uwagę na metodykę, dzięki której można uniknąć ewentualnego rozbicia mostka epoksydowego. W *Primula vulgaris* Huds. stwierdzono obecność prymulageniny A [286], w *P. veris* L. (= *P. officinalis* Hill) prywerogeniny B, prywerogeniny A i octanu prywerogeniny A [137,47], w *P. japonica* Thunb. dihydroprywerogeniny A [137,139,140], a w *P. elatior* L. Schreber – prymulageniny A, kwasu echinocystowego i 28-dehydroprymulageniny A [286,137].

W tym ostatnim gatunku Tschesche określił dokładnie budowę głównego saponozydu tzw. **kwasu prymulowego A**:

$3-O-\{[\beta-D\text{-glukopiranozylo-(1}\rightarrow\text{6)}-O-\beta-D\text{-galaktopiranozylo-(1}\rightarrow\text{4)}]-[O-\alpha-L\text{-ramnopiranozylo-(1}\rightarrow\text{2)}]-O-\beta-D\text{-glukuronopiranozylo}\}-\text{protoprymulagenina A [283,285].}$

Związkiem o bardzo podobnej strukturze jest izolowany z japońskiego pierwiosnka *P. sieboldi* E. Morren pentaglikozyd – **sakuraso-saponina**. Jest to także pochodna protoprymulageniny A połączona z glikonem poprzez kwas glukuronowy:

$3-O-\{4-O-[O-\alpha-L\text{-ramnopiranozylo(1}\rightarrow\text{2)}-O-\alpha-L\text{-ramnopiranozylo-(1}\rightarrow\text{2)}-O-\beta-D\text{-galaktopiranozylo-(1}\rightarrow\text{4)}]-2-O-\beta-D\text{-glukopiranozylo-(1}\rightarrow\text{2)}-O-\beta-D\text{-glukuronopiranozyd}\}-\text{protoprymulageniny A [138].}$ Ponadto, w surowcu zidentyfikowano po hydrolizie aglikon egicerynę [137,139].

Pod koniec lat osiemdziesiątych Viqar określił budowę głównych saponozydów *P. denticulata* Sm., rośliny spotykanej zwłaszcza w górskich partiach Pakistanu, a mianowicie **prymulaniny** i **saksifragifoliny B (=ardisiakrispina A)**. Są to pochodne cyklamiretyny A, łańcuch cukrowy składa się z ksylozy, glukozy i arabinozy [291].

Tetraglikozyd saksifragifoline B izolowano również z *Androsace saxifragifolia* oraz *Cyclamen europaeum*. Ten pierwszy gatunek zawiera ponadto bogatszą o jedną glukozę saksifragifolinę D oraz dwa inne saponozydy o identycznych łańcuchach cukrowych, pochodne androsacenolu, a mianowicie saksifragifolinę A i C [239].

Rodzaj *Cyclamen* obejmuje ogółem 19 gatunków. Reznicek przebadał kilkanaście z nich stwierdzając, iż *C. balearicum*, *C. repandum*, *C. rhodeum*, *C. creticum*, *C. persicum* i *C. graecum* zawierają w równych ilościach **cyklaminyę**, **desglukocyklaminyę I** i **izocyklaminyę**, w *C. pseudibericum*, *C. neapolitanum* i *C. purpureascens (=C. europaeum)* dominuje cyklamina, a w *C. mirabile*, *C. cilicicum*, *C. coum. subsp. coum*, *C. cypricum* i *C. africanum* głównym związkiem jest **desglukocyklamina I**. Saponozydy te są pochodnymi cyklamiretyny A [226].

Kolejnym przedstawicielem Pierwiosnkowatych, chyba najdokładniej przebadanym (m.in. Amoros, Glombitza, Mahato, Shoji) jest kurzyśląd polny *Anagallis arvensis*, szeroko rozpowszechniony w Europie, a spotykany także w dolinie Gangesu [10,76,166,260,259]. Z rośliny tej wyizolowano i określono strukturę kilkunastu saponozydów triterpenowych o wyraźnej aktywności przeciwwirusowej. Są to:

- pochodne anagalligeniny B
 - anagallozyd B**
 - desglukoanagallozyd B**
 - anagallisina A**
 - anagallisina E**
- pochodne 22-octanu anagalligeniny A
 - anagallozyd A**
 - desglukoanagallozyd A**
- pochodne prywerogeniny B
 - anaglosaponina VI**
 - anaglosaponina VII**

- pochodne 22-octanu prywerogeniny B
anallozyd C
- pochodne 22-octanu 23-hydroksy prywerogeniny B
anillosaponina VIII
anillosaponina IX
- pochodne anagalligenonu B
anagallisina B
anagallisina D
- pochodne cyklamiretyny A
cyklamina

Wśród roślin rodzaju *Lysimachia* przebadano częściowo kilka gatunków dalekowschodnich. Kitagawa [137,140,139] określił rodzaj aglikonów występujących we frakcji saponinowej z *L. mauritiana* (prywerogenina B), *L. japonica* (protoprymulagenina A) oraz *L. clethroides* (protoprymulagenina A i egiceryna). Autorzy chińscy określili pełną strukturę saponozydu z *L. paridiformis*. Jest to tetraglikozyd cyklamiretyny A – **paridiformozyd** [80].

Japoński gatunek "morokoshiso" czyli *L. sikokiana* zawiera zespół siedmiu saponozydów, z których określono strukturę jednego, dominującego ilościowo i zarazem najbardziej aktywnego. Aglikonem **lysikokianozydu I** jest protoprymulagenina A, a część cukrową budują glukoza, arabinoza i ksyloza w stosunku 2:1:1 [142].

2 Benzochinony

2.1 Wprowadzenie

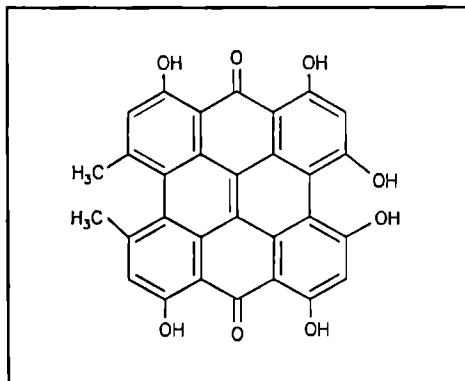
Benzochinony, w porównaniu z saponozydami, są zdecydowanie mniej reprezentatywną i zarazem znacznie uboższą strukturalnie grupą substancji naturalnych. Stanowią one najprostszą pod względem złożoności budowy chemicznej klasę tzw. naturalnych barwników chinonowych. Barwniki te są dość szeroko rozpowszechnione, jakkolwiek raczej asystematycznie, w świecie roślin; spotyka się je też wśród zwierząt. Mimo iż obejmują one związki o zróżnicowanej strukturze, wszystkie zawierają jednak ten sam podstawowy układ chromoforowy, który stanowi cykliczny, sześciowęglowy szkielet benzochinonu, o sprzężonych poprzez dwa wiązania podwójne karbonylach. W zdecydowanej większości występują one w konfiguracji *para*, rzadziej *orto*. Wraz ze wzrostem stopnia złożoności budowy cząsteczki i zarazem liczby sprzężonych wiązań tworzących układ chromoforowy, barwa związku pogłębia się przechodząc od żółtej poprzez pomarańczową do czerwonej, a czasem nawet niebieskozielonej czy czarnej. Niezależnie od jej intensywności, wpływ tych związków na pigmentację u roślin wyższych jest znikomy.

Chinony mogą oligomeryzować do di-, tri- i tetramerów. Często zawierają, obok innych, podstawniki hydroksylowe, które nadają im fenolowy charakter. Łatwo ulegają redukcji do bezbarwnych hydrochinonów i często zlokalizowane są w surowcu właśnie w takiej formie. Poza tym, znaczna ich liczba występuje w połączeniach z cukrami jako O lub C glikozydy [25,126,123,83].

Ponad 1200 zidentyfikowanych dotychczas barwników chinonowych klasyfikowanych jest do pięciu podstawowych grup [83]. Są to poczynając od najbardziej złożonych:

● Chinony wyższe (ang. extended quinones)

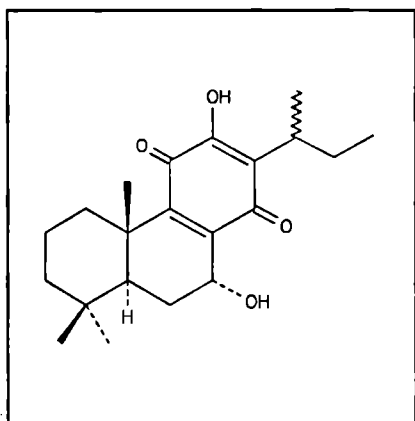
Grupa ta spotykana jest stosunkowo rzadko. Zaliczane są tutaj zarówno barwniki tetracenowe (np. piromycyna) i fenantrenowe (pilochinon) jak i policykliczne struktury typu hyperycyny (np. stentoryna, gymnochrom, fagopyryna). Izolowanej z dziurawca (*Hypericum perforatum*) hyperycynie przypisuje się m.in. działanie neurotrankwilizujące oraz aktywność przeciw-wirusową, szczególnie wobec retrowirusów. W niektórych krajach stosowana jest ona do dekontaminacji krwi pobieranej od dawców.



Rys. 21 Hyperycyna.

Związek ten ze względu na własności fotosensybilizujące wykorzystywano też w leczeniu bielactwa. Bardzo podobną do hyperycyny strukturę posiada fryngelit, zidentyfikowany w skałach osadowych ery jurajskiej, uznawany za jeden z najstarszych barwników organicznych na kuli ziemskiej.

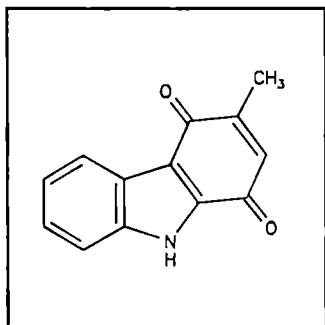
Niezwykle interesującą klasą chinonów wyższych są tzw. koleony biogenetycznie związane z terpenoidami i częściowo także do nich zaliczane. Te diterpeny typu abietanu zawierają człon *p*- lub *o*-benzochinonowy tworzący pierścień C, względnie połączony wraz z pierścieniem B w układ chinono-metinowy. Zidentyfikowano je w kilku rodzajach wargowych np. *Coleus*, *Plecranthus*, *Fuerstia*. Należący do koleonów **horminon** wykazuje aktywność wobec wirusa Herpes simplex typ II, a także bakterii *Staphylococcus aureus* czy *Vibrio cholerae* [83,25,23]. Do chinonów wyższych zaliczane są ponadto barwniki charakterystyczne dla rodzaju *Cyperus* jak cyperachinon [83].



Rys. 22 Horminon.

● Karbazolochinony

Te unikalne związki, ze względu na obecność heterocyklicznego azotu, zaliczane są jednocześnie do alkaloidów. Ich przedstawicielami są przede wszystkim murrachinony A-D izolowane po raz pierwszy w 1985 roku przez Furukawę z należących do rodziny *Rutaceae* południowoazjatyckich krzewów rodzaju *Murraya* [71]. Jak stwierdzono, związki te wykazały dodatnią aktywność inotropową w badaniach na izolowanych włóknach sercowych świnki morskiej [113].



Rys. 23 Murrachinon.

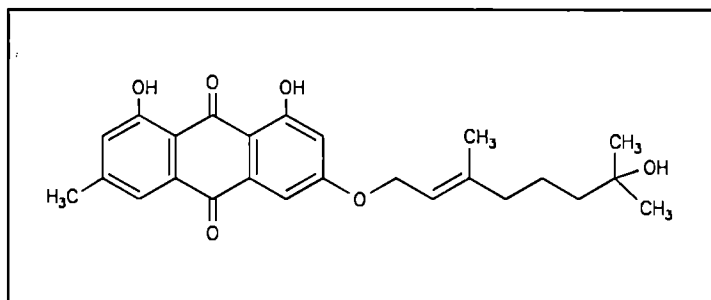
● Antrachinony

Barwniki oparte na szkielecie antracenu stanowią dominującą ilościowo grupę pigmentów chinoidowych. Występują w roślinach często obok odpowiednich form zredukowanych czyli antranoli, w połączeniach z cukrami lub jako wolne. Są stosunkowo szeroko rozpowszechnione przede wszystkim wśród *Angiospermae* zwłaszcza w rodzinach *Polygonaceae*, *Rhamnaceae*, *Rubiaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, *Verbenaceae*, z tym że w ich obrębie gromadzą się w gatunkach należących do zaledwie kilku rodzajów.

Związki należące do tej grupy, jak i zawierające je surowce, są od lat wykorzystywane w lecznictwie jako *laxantia* (rzewień, kruszyna, aloes), a ponadto w terapii kamicy dróg

moczowych (marzanna barwierska) czy schorzeń skórnych typu łuszczycowego (chryzarobina). W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o aktywności cytotoksycznej i przeciwbakteryjnej struktur tego typu [172,304], aczkolwiek aflatoksyny będące również

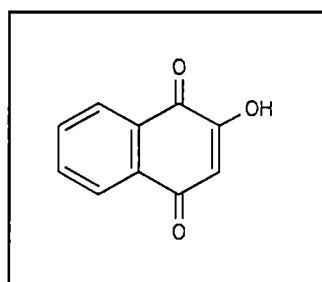
po pochodnymi antralowymi są czynnikami kancerogennymi [123]. Związki antralowe często działają jako fitoaleksyny skierowane przeciwgrzybiczo [299].



Rys. 24 Cytotoksyczny antrachinon z *Psorospermum febrifugum* Spach.

● Naftochinony

Te skondensowane dwupierścieniowe żółte barwniki o raczej ograniczonym występowaniu, charakterystyczne dla rodzaju *Plumbago*, *Diospyros*, *Juglans*, *Bignonia*, *Lithospermum* czy *Aristea*, są często traktowane jako ich chemotaksonomiczne markery. Większość z nich jest *p*-chinonami (lawson, juglon, plumbagina, lapachol), wyjątkowo *o*-chinonami (dunnion) [268,83,25]. Znana jest ich aktywność przeciwgrzybicza, własności ichtiotoksyczne i termitoochronne [298]. Wykorzystywane są jako barwniki (alkanina czy lawson w proszku *henna*), a od niedawna budzą nadzieję jako potencjalne czynniki hamujące rozwój nowotworów. Lapachol i plumbagina działają bowiem cytotoksycznie, a w bardzo niskich stężeniach rzędu 10^{-3} mg/ml także immunostymulująco [293,171]. Stwierdzono także pewną aktywność przeciwwirusową lapacholu czy bardziej złożonych struktur jak np. toddakumachinon [112].



Rys. 25 Lawson.

Do pochodnych naftochinonu zaliczyć można także witaminy grupy K czyli filochinon i menachinony, spotykane we wszystkich organizmach fotosyntezujących i niektórych bakteriach. U człowieka stanowią one element systemu regulującego krzepliwość krwi [171,123,25].

● Benzochinony

Są to najprostsze chinony, dokładniej omówione w kolejnych rozdziałach.

Barwniki chinonowe spełniają prawdopodobnie funkcję ochronną, zapobiegając m.in. niszczeniu tkanki roślinnej przez grzyby patogenne czy owady (np. tektochinon). Niektóre, wydzielane przez korzenie, hamują kiełkowanie sąsiadujących z gospodarzem roślin (np. juglon). Jednak wiele danych skłania do przyjęcia hipotezy iż chinony, istniejąc obok siebie w formie utlenionej i zredukowanej, mogą tworzyć część komórkowego układu redox zaangażowanego w wychwyt wolnych rodników [25,83].

2.2 Budowa, biogeneza i właściwości fizykochemiczne

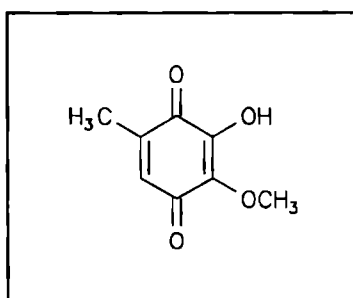
Barwniki benzochinonowe charakteryzują się stosunkowo nieskomplikowaną budową. Stanowiący trzon całego związku benzochinon, o grupach karbonylowych ułożonych zawsze w konfiguracji *para*, nie jest, w przeciwieństwie do omówionych w punkcie 2.1 chinonów wyższych, skondensowany z żadnym układem aromatycznym, aczkolwiek może zawierać, obok innych, podstawniki o takim charakterze.

Od rodzaju i układu tych ostatnich zależy aktywność optyczna, a także intensywność zabarwienia od żółtego (2,6–dimetoksychinon) poprzez pomarańczowy (mesachinon) do brunatnego i fioletowobrunatnego (kwas poliporowy).

Benzochinony z reguły występują w stanie wolnym, jakkolwiek odpowiadające im zredukowane hydrochinony mogą być związane glikozydowo. Zazwyczaj lipofilne, dobrze rozpuszczają się w eterze naftowym, chloroformie, benzenie. Są to ciała stałe, krystalizujące najczęściej w postaci płytek lub igieł, wyjątkowo oleiste ciecze – np. dihydrosargachinon [268,126,25,198]. Benzochinony są silnymi dienofilami, łatwo kondensują z aldehydami [222], funkcjonują w układach oksydo-redukcyjnych. Z alkaliami dają charakterystyczne fioletowo-czerwone zabarwienie, jest to jednak reakcja niespecyficzna. W przypadku związków posiadających w sąsiedztwie grup karbonylowych łatwo tworzący wiązanie wodorowe atom wodoru stosowany bywa tzw. test Cravena, gdzie wynikiem reakcji są barwne, zielononiebieskie pochodne [88].

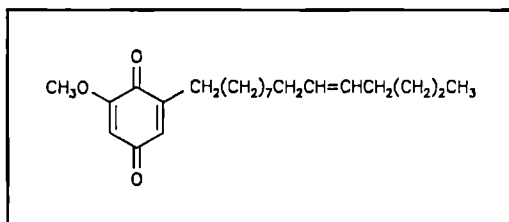
Wśród benzochinonów wyróżnia się, w zależności od rodzaju podstawników, kilka typów strukturalnych, a mianowicie:

● **Benzochinony proste**, podstawione w miarę równocennymi (jeśli chodzi o ciężar) ugrupowaniami jak grupy hydroksylowe, metylowe czy metoksyłowe. Są to np. fumigatyna, spinulozyna, aurantiogliokladyna [94]



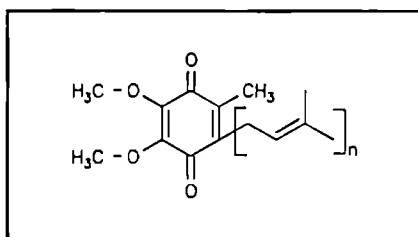
Rys. 26 Fumigatyna.

● **Benzochinony alifatyczne**, podstawione kilku lub kilkunastowęglowym alifatycznym nasyconym lub nienasyconym łańcuchem np. embelina, perezon, irisochin, ardisianon A [69], czasem z funkcjami tlenowymi – kornudentanon [25].



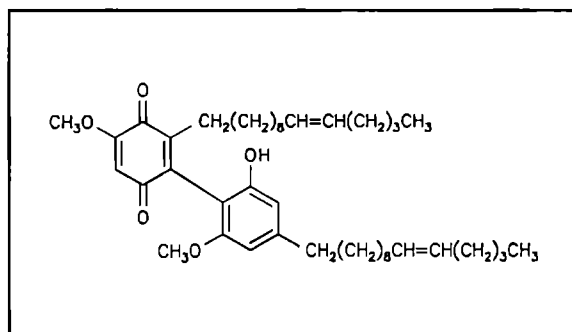
Rys. 27 Ardisianon A.

● **Benzochinony terpenowe**, gdzie podstawnik jest albo terpenem alicyklicznym np. ubichinony, senkjunon [189], albo cyklicznym np. seskwiterpenowy epi-ilimachinon [228].



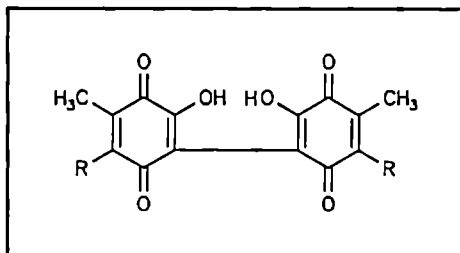
Rys. 28 Ubichinon ($n=5-10$).

● **Benzochinony z podstawnikami cyklicznymi**, alifatycznymi np. heliobazydyna [123] lub aromatycznymi np. kwas poliporowy, atromentyna, belamkandachinon A [69].



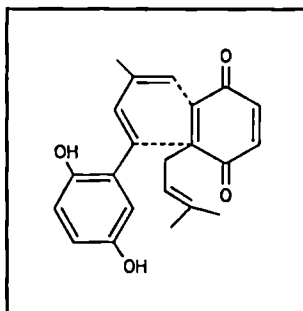
Rys. 29 Belamkandachinon A.

● Benzochinony dimeryczne np. oosporeina, fenicyna, vilangina [222], ardisiachinon A [67].



Rys. 30 Oosporeina (R=OH), fenicyna (R=H).

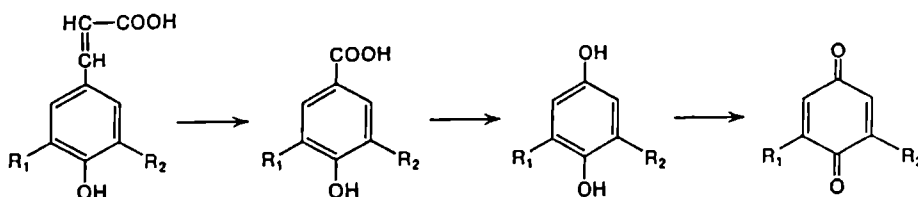
● Benzochinony skondensowane np. mikrofillon [310].



Rys. 31 Mikrofillon.

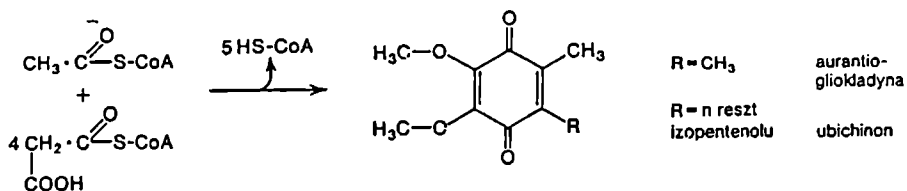
Biogenetycznie benzochinony, podobnie jak i pozostałe barwniki chinonowe, nie stanowią jednolitej grupy. Kączkowski [123] podaje trzy potwierdzone badaniami izotopowymi drogi ich biosyntezy, sugerując jednocześnie możliwość jeszcze innych sposobów budowy poszczególnych struktur.

Część związków, jak np. 2,6-dimetoksy-*p*-benzochinon, powstaje w wyniku przemian kwasu cynamonowego.



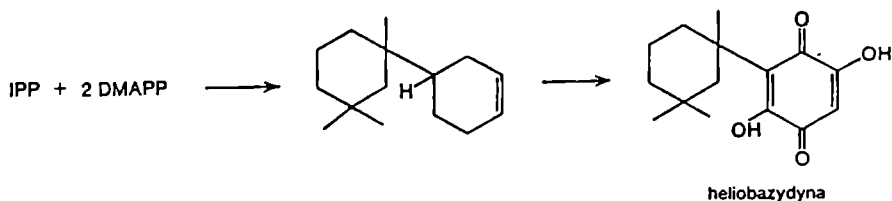
Rys. 32 Powstawanie benzochinonów z kwasów cynamonowych.

Z kolei barwniki typu aurantiogliokładyny syntetyzowane są za pośrednictwem tzw. drogi poliketydowej.



Rys. 33 Tworzenie się benzochinonów drogą poliketydową.

Wreszcie tymochinon, perezon czy heliobazydyna, zaliczane do chinonów izopentenolowych, wywodzą się biogenetycznie podobnie jak wszystkie terpenoidy od difosforanu izopentenu i dimetyloallilu.



Rys. 34 Tworzenie się benzochinonów drogą terpenową.

2.3 Metody izolacji z elementami badań strukturalnych

Izolacja benzochinonów z materiału roślinnego opiera się na wykorzystaniu ich lipofilności. Ekstrakcja prowadzona jest więc najczęściej eterem naftowym, heksanem, benzenem czy chloroformem, względnie ich mieszaninami. Dalsze oczyszczanie i rozdział wymaga zastosowania chromatografii kolumnowej, przy czym do kontroli frakcji w TLC na żelu krzemionkowym wykorzystuje się test Cravena, lub obserwuje plamy barwników w świetle widzialnym. W przypadku hydroksypochodnych wskazana jest uprzednia impregnacja płytek żelowych 3% roztworem kwasu szczawowego [200]. Jako fazy ruchome służą benzen, heksan i ich mieszaniny z octanem etylu.

Czyste krystaliczne związki poddaje się analizom spektralnym UV, IR, NMR, EIMS, wykorzystując do określenia struktury charakterystyczny obraz pasm absorbcyjnych w nadfiolecie i podczerwieni, związany ze sprzężonymi resztami karbonyłowymi, a także układ jonów fragmentacyjnych w widmie masowym. Interpretacja tych ostatnich pozwala często na rozróżnienie dihydroksy i dimetoksypochodnych [200]. Dodatkowych danych dostarcza analiza pochodnych acetylowych czy metylowych.

W poprzednich latach, gdy nie korzystano na szerszą skalę z technik MS czy NMR, częstą praktyką było przekształcanie związku z utworzeniem charakterystycznych pochodnych np. karbazonowych, względnie potwierdzanie założonej struktury poprzez przeprowadzenie jej pełnej syntezy i porównanie danych fizykochemicznych. Tak postępowano m.in. opracowując budowę tymochinonu (rok 1963) [60] czy ardisiachinonów (rok 1968) [199].

W przypadku benzochinonów z alifatycznym łańcuchem bocznym przydatna jest analiza zmetylowanych kwasów tłuszczowych powstałych wskutek utlenienia całego związku (np. nadmanganianem potasu) metodą chromatografii gazowej [191,200,199]. Pozwala ona dodatkowo określić wzajemny stosunek ilościowy poszczególnych homologów. Benzochinony bowiem niezmiernie często (np. w *Myrsinaceae*) obecne są w surowcu w postaci mieszanin blisko spokrewnionych związków, różniących się jedynie liczbą węgli tworzących łańcuch boczny. Mieszaniny te na chromatogramach (TLC) uwidaczniają się w postaci zwartej plamy, posiadają ostry punkt topnienia, i w zasadzie jedynie obraz fragmentacji w widmie masowym wskazuje na niejednorodność substancji [200,129].

Do rozdziału homologów alkilowych z grzyba *Sarcodontia setosa*, po uprzednim przekształceniu ich w metylowe pochodne, wykorzystano HPLC. Podejmowano także próby zastosowania w analizie *p*-benzochinonów chromatografii gazowej, przy użyciu kolumn wypełnionych dimetylopolisiloksanem (SE-30) lub metylofenylopolisiloksanem (OV-17), nie ma jednak zbyt wielu danych na temat skuteczności tych metod [25].

2.4 Aktywność farmakologiczna i właściwości biologiczne

Związki zaliczane do benzochinonów ze względu na swoje zdolności do funkcjonowania w systemach oksydacyjno–redukcyjnych odgrywają często istotną funkcję fizjologiczną, a ponadto obdarzone są potencjalnymi własnościami terapeutycznymi.

Zlokalizowane w chloroplastach organizmów fotosyntetyzujących plastoquinony uczestniczą w transporcie elektronowym. Przypuszcza się, że podobną rolę spełniają również α –tokoferolochinony, izolowane z wielu glonów i roślin wyższych (m.in. *Psoralea plicata*) [171,123,223].

Równie niezbędne dla komórki są ubichinony, określane często mianem **koenzymu Q**. Związki te wykryto praktycznie we wszystkich organizmach żywych, aczkolwiek w śladowych ilościach. Zlokalizowane są w mitochondriach lecz również w cytoplaźmie i przede wszystkim odgrywają rolę przenośnika elektronów w łańcuchu oddechowym. Ich niedobór prowadzi do poważnych zaburzeń funkcjonalnych komórki, a w krańcowych przypadkach także do jej śmierci [123,171,36]. W ostatnich latach do lecznictwa wprowadzono szereg preparatów (m.in. duński KOENZYM Q₁₀ VITA CARE) zawierających jeden z ubichinonów o łańcuchu bocznym zbudowanym z 10 jednostek izoprenowych czyli tzw. koenzym Q₁₀. Stosowany jest on wspomagająco w stanach, gdzie dochodzi do jego niedoboru, a więc w terapii schorzeń krążenia jak niewydolność mięśnia sercowego czy nadciśnienie, a także jako środek stymulujący układ immunologiczny, przemianę materii, procesy reparacyjne i regeneracyjne.

Jak dotychczas, nie znaleziono natomiast jednoznacznego wytłumaczenia dla uzasadnienia stosunkowo wysokiej zawartości innych barwników benzochinonowych w roślinie. Wiele z nich przebadano jednak farmakologicznie uzyskując ciekawe rezultaty. Jak się okazało, 2,6–dimetoksy–*p*–benzochinon oraz tymochinon są silnymi bakteriostatykami, izolowany z grzybów kwas teleforowy posiada pewne właściwości przeciwbiałaczkowe, a atromentyna przeciwwzkrzepowe [94,143]. Agregacji płytek zapobiega też chinon otrzymany z kultur mycelialnych *Lentinus adhaerens* będący inhibitorem receptorów tromboksanowych A₂ [157].

Bogate w mesaninę owoce wschodnioafrykańskiej rośliny *Maesa lanceolata* stosowane przez miejscowych lekarzy jako swoista "szczepionka" przeciw cholerze wykazały znaczną aktywność przeciwbakteryjną. Co więcej, sama mesanina w badaniach na myszach, już w pojedynczej dawce 5 mg/kg, powodowała widoczną poprawę u zwierząt zainfekowanych *Escherichia coli*. Związek ten działa także przeciwwzapalnie, silnie hamując 5-lipoksygenazę [150,149]. Podobną aktywność przeciwenzymatyczną wykazały inne benzochinony alkilowe jak kornudentanon, ardisianon A, belamkandol czy ardisiachinon A, izolowane z roślin rodzaju *Ardisia* stosowanych w chińskiej medycynie tradycyjnej jako skuteczne *antiphlogistica* [277,67,68]. Z kolei dimeryczny belamkandachinon A z *Belamcanda chinensis* jest specyficznym inhibitorem cyklooksygenazy [69], inny dimer –mikrofillon działa antyalergicznie [310]. Innym prostym benzochinonem o silnym działaniu hamującym zarówno 5–lipoksygenazę (w stęż. 1 $\mu\text{g/ml}$) jak i cyklooksygenazę (3.5 $\mu\text{g/ml}$) jest tymochinon, obecny w olejku eterycznym czarnuszki *Nigella sativa*. Olejek z nasion tej rośliny jest popularnym środkiem stosowanym na Bliskim Wschodzie w leczeniu zapalenia stawów i astmy oskrzelowej [101].

Ciekawą aktywność posiada embelina, barwnik charakterystyczny dla *Myrsinaceae*. Działa on przeciwrobaczo, a ponadto, co stwierdzono w szeregu badaniach przeprowadzonych na zwierzętach, hamuje płodność. Długoterminowe testy na psach wykazały, iż embelina jest silnym odwracalnym inhibitorem spermatogenezy, obniża też poziom testosteronu. Z kolei u samic zapobiega implantacji zapłodnionej komórki. Jeden z bogatych w ten barwnik surowców, a mianowicie owoce *Embelia ribes*, stosowany jest w preparatach medycyny ayurwedyjskiej w celu zapobiegania ciąży [125,92].

W ostatnich latach duże nadzieje wiąże się z odkrytą aktywnością cytotoksyczną chinonów. Grupa ta jest zresztą uznana za potencjalne źródło substancji przeciwnowotworowych. W ramach badań nadzorowanych przez National Cancer Institute w USA, w *Jacaranda caucana*, surowcu stosowanym w Brazylii w leczeniu raka skóry, zidentyfikowano aktywny wobec białaczki P-388 chinoidowy związek – jakaranon [203,202].

Cytotoksyczne działanie stwierdzone w testach *in vitro* na liniach komórkowych KB ($ED_{50}=1.8 \mu\text{g/ml}$) i P-388 ($ED_{50}=0.03 \mu\text{g/ml}$) wykazuje też irisochinon. Benzochinon ten izolowano z nasion *Iris pallasi var. chinensis*, surowca stosowanego w terapii schorzeń nowotworowych, a także z *I. missouriensis* [247,302]. Zbliżoną aktywnością charakteryzują się seskwiterpenowe chinony morskich gąbek [228], barwniki glonów jak np. dihydrosargachinon [198], oraz izolowany z kory *Plumeria rubra* 2,5-dimetoksy-p-benzochinon [125]. Natomiast wspomniana wyżej mesanina z *Maesa lanceolata*, oraz mesachinon, hamują namnażanie komórek raka szyjki macicy oraz HeLa ($IC_{50}=2.05 \mu\text{g/ml}$) [148].

Wyniki badań aktywności cytotoksycznej chinonów wskazują, iż istotnymi dla takiego działania elementami strukturalnymi są: obecność *para* podstawionego pierścienia chinonowego, podstawnik hydroksylowy w pozycji C-2 oraz co najmniej pięciowęglowy łańcuch boczny przy węglu C-5 [228,302,14].

W profilaktyce i terapii schorzeń nowotworowych pewne nadzieje można wiązać także z embeliną. Według Chitra i Shyamala Devi [44] obserwowany, korzystny wpływ tego związku na czas przeżycia i zahamowanie rozwoju fibrosarcoma u szczurów wynika ze stymulacji układu enzymów antyoksydacyjnych. Enzymy te tworzą swoistą barierę eliminującą wolne rodniki, jak np. $\cdot\text{OH}$ czy $\text{O}_2^{\cdot-}$, odpowiedzialne za uszkodzenia DNA, utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych błon biologicznych *etc.* Zmiany te często leżą u podłoża nowotworów stąd pośrednie, ochronne działanie embeliny wydaje się mieć istotną przyszłość [44].

Jak wykazały badania przeprowadzone przez Kinoshita *et al.* [132] wiele chinonów, a wśród nich embelina, ardisiachinon A, hamuje aktywność polimorfonuklearnych leukocytów (PMN) odpowiedzialnych m.in. za uszkodzenie tkanek w procesach zapalnych. Związki te są także aktywnymi wymiataczami wolnych rodników.

Na koniec należy wspomnieć o niekorzystnych, drażniących i alergizujących własnościach niektórych benzochinonów. Odnotowano wiele przypadków zapalenia skóry, wywołanego kontaktem z pierwiastkami. Jest to jedno z najczęstszych skórnych dolegliwości pochodzenia "odroślinnego", stanowiące w niektórych krajach, zwłaszcza w

Danii i Wielkiej Brytanii, poważny problem. Czynnikiem uczulającym okazała się primina czyli 2-metoksy-6-pentylo-p-benzochinon, obecna we włoskach gruczołowych *Primula obconica* i ponad dwudziestu innych gatunków pierwiosnkowatych [88]. W badaniach alkilowych analogów priminy okazało się, że siła działania drażniącego wzrasta wraz z długością łańcucha bocznego, osiągając maksimum przy 11 atomach węgla [144]. Kontaktowymi alergenami są ponadto 2,6-dimetoksy-p-benzochinon, izoprenylowy benzochinon z *Phagalon saxatile*, 4-metoksydalbergion z *Dalbergia nigra*, z tym że ich działanie jest zdecydowanie słabsze w porównaniu z priminą, a wiele benzochinonów jak np. rapanon (homolog embeliny) pozbawionych jest tego wpływu [128].



2.5 Rozpowszechnienie

Pod względem rozpowszechnienia benzochinony można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Jedną stanowią związki obecne z racji swej funkcji praktycznie we wszystkich organizmach, aczkolwiek w ilościach śladowych, takie jak ubiquinony, zaangażowane w proces oddychania komórkowego, czy też plastochinony, składniki mitochondrialne roślin zielonych. Drugą, pozostałe tzw. typowe barwniki benzochinonowe spotykane zwłaszcza wśród roślin niższych np. grzybów, glonów, porostów lecz również u przedstawicieli wyższych szczebli systematycznych.

Ich zawartość w surowcu sięgać może kilku procent (3.96% embeliny w *Rapanea neurophylla* [92]), mimo to fizjologiczna rola jaką odgrywają nadal nie jest wyjaśniona. W każdym razie u grzybów czy porostów odpowiedzialne są one za charakterystyczną pigmentację.

Jednym z przykładów benzochinonów glonowych jest dihydrosargachinon izolowany z brązowych alg morskich *Sargassum tortile* [198]. Wśród grzybów związki te zidentyfikowano m.in. w rodzajach *Coprinus*, *Gliocladium*, *Lentinus*, *Aspergillus*, *Hydnellum*, *Polyporus*, *Penicillium*, *Thelephora*. Dla *Oospora* czy *Chaetomium* charakterystyczne wydają się być formy dimeryczne, natomiast u podstawczaków dominują struktury wielocykliczne (np. kwas teleforowy w jadalnych grzybach rodzaju *Hydnum*, *Sarcodon* czy muskarufina w muchomorze *Amanita muscaria*) [94,143,83,77,157].

Jeśli chodzi o rośliny wyższe trudno przedstawić jakiś jednolity obraz ich rozmieszczenia w poszczególnych gałęziach drzewa systematycznego. Spotyka się je zarówno wśród Jednoliściennych, jak i Dwuliściennych z tym, że występują one sporadycznie. W obrębie **Dicotyledones** barwniki benzochinonowe stwierdzono m.in. u przedstawicieli rodzin *Boraginaceae* (mikrofillon w *Ehretia microphylla* [310]), *Ranunculaceae* (tymochinon z *Nigella sativa* [60]), *Leguminosae* (tokoferolochinon z *Psoralea plicata* [223]), *Umbelliferae* (senkjunon z *Ligusticum chuangxiong* [189]), *Compositae* (perezon z *Perezia adnata* [268], a także *Oxalidaceae*, *Protaceae*, *Meliaceae* [92,93]. Wśród **Monocotyledones** przykładami mogą być polygonachinon z *Polygonatum falcatum*, *Liliaceae* [191] czy irisochin, belamkandachinony A,B i belamkandole A,B odpowiednio z *Iris sp*, *Belamcanda sp*. *Iridaceae* [302,68,69].

Ze względu na rozmieszczenie barwników benzochinonowych w tak nie powiązanych ze sobą filogenetycznie rodzinach nie mają one jak dotąd żadnego większego znaczenia chemotaksonomicznego. Pewną, w miarę uchwytą, korelację pomiędzy ich zawartością a przynależnością do danej rodziny zaobserwowano zaledwie w kilku przypadkach. Jak podaje Hegnauer, dla rodziny *Simaroubaceae*, charakterystyczna jest obecność 2,6-dimetoksy-p-benzochinonu. Ostatnio jednak uważa się, iż związek ten prawdopodobnie występuje u większości roślin w zdrewniałych tkankach, tworząc się w procesie degradacji drzewnika. Zidentyfikowano go m.in. w *Caesalpinia pulcherrima* (*Leguminosae*), *Peddiea fischeri* (*Thymelaeaceae*), *Populus balsamifera* (*Salicaceae*), *Adonis vernalis* (*Ranunculaceae*), *Diospyros eriantha* (*Ebenaceae*) [93,25,268,310,213,41].

Z kolei w większości gatunków należących do rodzaju *Dalbergia* i *Machaerium* (fam. *Leguminosae*) stwierdzono obecność dalbergionu i jego pochodnych. Rośliny te bytują w Afryce i na kontynencie południowoamerykańskim, wysunięto więc hipotezę, iż mają one wspólne korzenie [83].

Prawdopodobnie najbogatszą w barwniki benzochinonowe rodziną, w obrębie której związki te traktowane mogą być jako chemotaksonomiczne markery, jest należąca do rzędu Pierwiosnkowców rodzina *Myrsinaceae*. Badania roślin dalekowschodnich prowadzone przez Ogawa, Natori i in. [200,199], a także afrykańskich, które badał głównie Midiwo [176,177,129], wykazały ich obecność u kilkudziesięciu przedstawicieli tej rodziny. Dane te mają jednak nadal charakter fragmentaryczny gdyż *Myrsinaceae* obejmuje ponad tysiąc gatunków. W należących do rodziny rodzajach *Ardisia*, *Bladhia*, *Myrsine*, *Maesa*, *Rapanea*, *Embelia* i *Aegiceras* zidentyfikowano przede wszystkim 2,5–dihydrokso (metokso)–3–alkilo–p–benzochinony jak: embelina, rapanon, mesachinon i ich homologi, mesanina, kornudentanon, ardisianony A i B, dimery jak vilangina, ardisiachinony A – C, melanflon, 6,6–biembelina, a ponadto 2,3–dihydrokso–5–undecylo–p–benzochinon [92,200,274,176,177,148,199,222,149,24,67,70,277,129, 175,174].

Związki te często występują obok siebie, a ich zawartość i wzajemne proporcje podlegają znacznym wahaniom zależnie od części rośliny jak i charakteru stanowiska. Zazwyczaj kompleks chinonowy stanowi od 1–5% w przeliczeniu na suchą masę surowca [200,92,129].

Hegnauer zwracał uwagę na duże prawdopodobieństwo obecności chinonów w blisko spokrewnionych botanicznie z *Myrsinaceae* rodzinach, a więc na przykład u Pierwiosnkowatych. Okazało się, że z przebadanych przez Hausena [88] 82 gatunków, należących do rodzaju *Primula*, *Anagallis*, *Cortusa*, *Lysimachia*, jedynie u 12 nie wykazano żadnych śladów ich obecności. W części roślin (20 gatunków) zidentyfikowano priminę, prosty benzochinon po raz pierwszy wyizolowany z *Primula obconica*, innych związków nie badano jednak fitochemicznie. Zaobserwowano natomiast, iż zawartość chinoidów jest ściśle uzależniona od rodzaju stanowiska, wilgotności gleby i jej pH, a także od pory roku. Przykładowo *Lysimachia nemorum* dawała pozytywną reakcję jedynie w czerwcu.

W roślinach wyższych benzochinony gromadzą się przede wszystkim w częściach podziemnych jak korzenie i kłącza, lecz także w korze, owocach, nasionach czy we włoskach gruczołowych liści jak np. primina. Mogą także stanowić składniki olejku eterycznego (np. tymochinon w *Nigella sativa* [60]).

Na marginesie należy wspomnieć, iż sam benzochinon jest częstym składnikiem wydzielin owadów m.in. chrząszczy [83]. Poza tym, związki oparte na szkielecie benzochinonu zidentyfikowano też u bardziej prymitywnych przedstawicieli fauny, a mianowicie u gąbek rodzaju *Dactylospongia* i *Smenospongia*, żyjących w okolicach Fidżi i Tajlandii [228].

3 *Lysimachia vulgaris* L.

3.1 Etymologia

Źródłosłów nazwy *Lysimachia vulgaris* L., podobnie jak wielu innych euroazjatyckich gatunków, został zaczerpnięty z łaciny i greki. Odzwierciedla on szerokie rozpowszechnienie rośliny wskazując zarazem na jej wartość leczniczą. Nazwa rodzajowa wg. Dioskuridesa [91] wywodzi się bowiem od greckiego λυσιμάχειος ("lysimacheios"), co w wolnym tłumaczeniu oznacza "kojący", "o właściwościach kojących", natomiast nazwa gatunkowa "vulgaris" z łacińskiego znaczy po prostu – pospolity.

Z kolei Pliniusz podaje, iż *lysimachia* nazwę swą zawdzięcza najprawdopodobniej Lysimachosowi, synowi króla Sycylii czy, wg. innych źródeł, kapitanowi armii Aleksandra Macedońskiego [91,197,217].

Ze względu na to, że identyfikacji rośliny obok Linneusza dokonywało wielu innych botaników, w literaturze można spotkać szereg łacińskich synonimów różniących się drugim członem nazwy. Są to m.in.:

- Lysimachia davurica* Ledeb
- L. elata* Slisb
- L. fauriei* Leveille
- L. glauca* Adams
- L. Guestphalica* Weihe
- L. westphalica* Weihe
- L. lutea* Jiraseck
- L. paludosa* Baumg.
- L. paniculata* Gilib
- L. thyriflora* Geners
- L. tomentosa* Presl. [217,91]

W krajach na obszarach których występuje, *Lysimachia vulgaris* L. znana jest potocznie raczej pod nazwami zwyczajowymi w językach narodowych. Często odnoszą się one bądź do wyglądu rośliny czy złocistożółtej barwy jej kwiatów, jak np. angielska **Yellow loosestrife**, niemiecka **Quirlstern**, względnie charakteru stanowisk na których bytuje np. słoweńska **Navadne pijavnica**, bądź też do pewnych właściwości leczniczych. I tak, francuska nazwa **Chasse bosse** oznacza "przedziurawiająca, wypędzająca guzy".

Inne synonimy to między innymi:

- | | |
|---------------------|---|
| w języku angielskim | – Loosestrife, Common loosestrife; |
| niemieckim | – Felberich, Gemeiner Felberich, Gold–Gilberweiderich; |
| francuskim | – Lysimaque ordinaire, Grande lysimaque, Casse bosse, Souci d'eau, Lis des teinturiers, herbe aux corneilles; |
| włoskim | – Mazza d'oro. [217,91,288] |



Rys. 35 Kwitnące okazy *Lysimachia vulgaris* L. (fot. własna).

Obowiązującą w języku polskim nazwą botaniczną *Lysimachia vulgaris* L. jest **tojeść pospolita**. Drugi trzon tej nazwy jest tłumaczeniem wprost z łacińskiego *vulgaris*, natomiast etymologia słowa tojeść pozostaje nadal kwestią otwartą. Według Brücknera jest to wynik połączenia słów "to jest" [34]. Podobne przypuszczenie wyraża Rostafiński powołując się na piętnastowieczny zabytek piśmiennictwa tzw. rękopis Stanki, w którym to pojawia się jedna z wcześniejszych adnotacji o gatunku zapisanym pod niemieckim określeniem "das ist". Prawdopodobnie z przetłumaczenia tych słów powstała nazwa tojeść.

Roślina znana jest pod wieloma synonimami. W nazewnictwie ludowym utrwaliły się zwłaszcza określenia: bażanowiec, różanowiec, baranowiec, trojeść, szelężnik czy wilczy ogon [91,92,231,232].

3.2 Systematyka

Lysimachia vulgaris L. zaklasyfikowana jest do:

| | | |
|--------------|--|-------------------|
| królestwa | <i>Eucaryota</i> | – Jądrowe |
| podkrólestwa | <i>Plantae</i> | – Rośliny |
| gromady | <i>Spermatophyta</i> | – Nasienne |
| podgromady | <i>Angiospermophytina (Angiospermae)</i> | – Okrytozalążkowe |
| klasy | <i>Dicotyledonopsida (Dicotyledones)</i> | – Dwuliścienne |
| podklasy | <i>Sympetalidae (Sympetalae)</i> | – Zrosłopłatkowe |
| rzędu | <i>Primulales</i> | – Pierwiosnkowce |
| rodziny | <i>Primulaceae</i> | – Pierwiosnkowate |
| plemienia | <i>Lysimachieae</i> | |
| podplemienia | <i>Lysimachiinae</i> | |
| rodzaju | <i>Lysimachia</i> L. [187,33] | |

Punktem wyjścia dla rozwoju linii ewolucyjnej, do której należy rząd *Primulales*, jest prymitywny rząd Ukęśłowców *Dilleniales*, związany z Magnoliowcami [270]. Przodkami zaliczanych tu gatunków (jak również tych należących do *Ebenales* i *Ericales*) były rośliny o cechach herbatowców *Theales* (= *Guttiferales*) [91]. Obecnie Pierwiosnkowce klasyfikuje się do sztucznej podklasy Zrosłopłatkowych [270].

Z zaliczanych do *Primulales* rodzin (*Primulaceae*, *Myrsinaceae*, *Theophrastaceae*) rodzina *Primulaceae* uważana jest wspólnie za jedynego krajowego przedstawiciela tego rzędu [92]. Spośród około 1000 gatunków Pierwiosnkowatych większość zamieszkuje strefę umiarkowaną półkuli północnej. Są to jednoroczne rośliny zielne oraz wieloletnie byliny, najczęściej o dużych, promienistych, zrosłopłatkowych kwiatach z jednym słupkiem, o pojedynczej szyjce i jednym okółkiem pręcików, pokryte gęsto włoskami okrywającymi i gruczołowymi [92,188]. W Polsce spotyka się niespełna 30 reprezentantów tej rodziny.

Rodzina *Primulaceae* obejmuje ogółem 28 rodzajów zaklasyfikowanych wg. Hegnauera [92] do pięciu plemion, a mianowicie:

Cyclameae,
Corideae,
Primuleae,
Samoleae,
Lysimachieae.

Z tego ostatniego wyodrębnia się [217,63] dwa podplemiona – *Anagallidinae* oraz *Lysimachiinae*, do którego zaliczane są rodzaje:

Asterolinum,
Glaux,
Lysimachia,
Pelletiera,
i *Trientalis*.

Jak podaje Hegi [91] rodzaj *Lysimachia* L. obejmuje ok. 110 gatunków i jest najliczniej reprezentowany w Azji. Tam rośnie ponad połowa znanych gatunków tojeści, z czego zaledwie kilka na obszarach subtropikalnych, a zdecydowana większość w obrębie strefy umiarkowanej, zwłaszcza w centralnych Chinach. Z pozostałych, dwanaście znaleziono w Ameryce Północnej, siedem w Afryce (w Abisynii i na Madagaskarze), pięć na Hawajach, tylko jeden zidentyfikowano w Australii i Ameryce Południowej (Chile).

Są to między innymi:

- Lysimachia foenum-graecum* Hance
- Lysimachia mauritiana* Lam.
- Lysimachia japonica* Thunb.
- Lysimachia media* Willd.
- Lysimachia christinae* Hance
- Lysimachia nutans* Nees.
- Lysimachia pyramidalis* Wall.
- Lysimachia sikokiana* Miq.
- Lysimachia uliginosa* Blume.
- Lysimachia Websteri* H.St.John
- Lysimachia ambigua* C.Y.Wu.
- Lysimachia sumatranica* C.M.Hu.
- Lysimachia clethroides* Duby
- Lysimachia barystachys* Bunge.
- Lysimachia fortunei* Maxim.

W latach osiemdziesiątych naszego stulecia opisano kilka kolejnych gatunków np.

- Lysimachia fletcherii* C.M.Hu.,
- Lysimachia chenii* C.M.Hu.,
- Lysimachia filiper* C.Z.Gao,

pochodzących z krajów Dalekiego Wschodu, odpowiednio z Burmy, Wietnamu i Chin [108].

W Europie spotyka się przedstawicieli siedmiu z 16 sekcji na jakie Pax i Knuth, podzielili rodzaj *Lysimachia* L. Jest to razem 8 gatunków. Dwa reprezentujące sekcję **Ephemerum** (Rchb.) Endl., a mianowicie *L. ephemerum* L. i *L. atropurpurea* L., są roślinami endemicznymi występującymi odpowiednio w Pirenejach i na Bałkanach. Kolejny – *L. ciliata* L. Sekt. **Steironema** (Raf.) Klatt, którego nieliczne stanowiska zidentyfikowano na pograniczu belgijsko-niemieckim i w Turyngii, jest zdziczałym gatunkiem ogrodowym, zawleczonym z Ameryki Północnej, gdzie rośliny zaliczane do tej sekcji spotyka się w stanie naturalnym. Pozostałe gatunki rodzaju *Lysimachia* bytują zwłaszcza w Europie środkowej i są jedynymi przedstawicielami obejmujących je sekcji na tym kontynencie. Są to:

- | | |
|--|---|
| <i>L. nummularia</i> L. (Tojeść rozesłana) | – Sectio Nummularia (Gilib) Klatt |
| <i>L. vulgaris</i> L. (T. pospolita) | – Sectio Lysimastrum Endl. |
| <i>L. nemorum</i> L. (T. gajowa) | – Sectio Lerouxia (Merat) Endl. |
| <i>L. thyrsoiflora</i> L. (T. bukietowa) | – Sectio Naumburgia (Moench) Klatt |
| <i>L. punctata</i> L. (T. kropkowana) | – Sectio Verticillatae Knuth. [91,217] |

Pięć powyższych spotyka się w Polsce [38].

Najbardziej rozpowszechnione są *Lysimachia vulgaris* L. i *L. nummularia* L. Naturalne stanowiska pozostałych występują niemiernie rzadko, np. dla *L. punctata* L. udokumentowano na terenie kraju zaledwie kilka. Roślina ta, podobnie jak *L. ciliata* L., zyskała sobie wszak uznanie jako ozdobna, ogrodowa. Dla tego celu pozyskuje się ją jednak wyłącznie z upraw.

3.3 Opis morfologiczny z elementami budowy anatomicznej

Jeden z pierwszych opisów botanicznych *Lysimachia vulgaris* znaleźć można już w **Hortus Eystettensis** z 1597 roku [91]. Tojeść pospolita jest wieloletnią byliną, silnie osadzoną w podłożu dzięki mocno rozgałęzionemu kłączu, z długimi (nawet do 1.5 m), czerwono nabiegłymi rozłogami biegnącymi w różnych kierunkach, w przekroju okrągłymi o grubej kutikuli [147]. $2n=28, 56, 84$ [32].



Rys. 36 Części podziemne *Lysimachia vulgaris* L.: kłącze wraz z korzeniami i rozłogami (fot. własna).

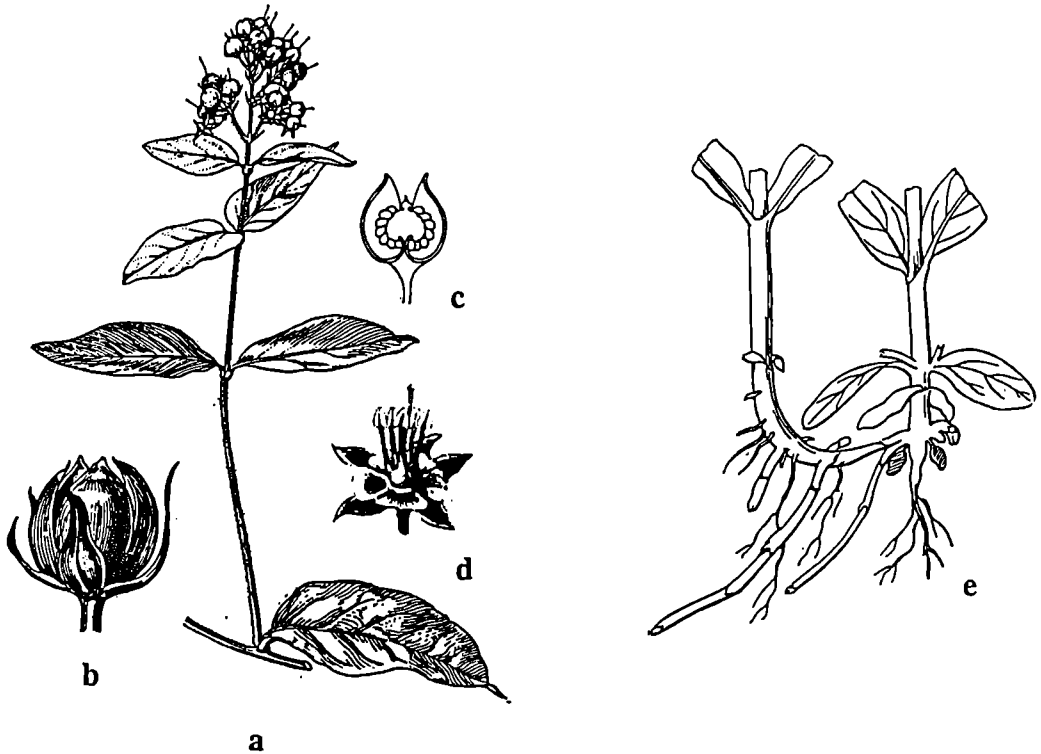
Łodyga jest prosta, pojedyncza lub w górze rozgałęziona, obła względnie tępo czterograniasta, górą omszona, dołem czerwono nabiegła. Jej wysokość waha się od 60 do 150 cm, zależnie od warunków glebowo–klimatycznych [45,91,237,147].

Krótkoogonkowe liście, podługowato–jajowate względnie podługowato–lancetowate, ostre i całobrzegie, pokryte są włoskami gruczołowymi i biczykowatymi okrywającymi. Ułożone są najczęściej naprzeciwlegle, rzadziej skrętologle, lub skupione w okółki, po 3–4. Spodem są bladozielone, czasem czarno kropkowane, osiągają długość do 14 cm, szerokość około 3.5 cm.

Z kątów górnych liści wyrastają obfite, wiechowate kwiatostany. Szypułki kwiatowe są najczęściej tak długie jak kwiaty, a przysadki kwiatowe równowąskie. Kwiaty są dość duże, o średnicy 1 cm, promieniste, żółcistożółte. Mają 1 słupek z zalążnią górną oraz 5 pręcików zrosłych nitkami do połowy, z których dwa są dłuższe od pozostałych. Nitki pręcików ogruczołone. Kielich składa się z lancetowatych, zaostzonych działek, na

brzegach ciemnobrunatnych i orzęsionych. Płatków korony jest 5, są one nieco dłuższe od działek kielicha (7–12 mm), jajowate, lekko zaostrome, zrośnięte u nasady i na brzegu nagie.

Owoce jest jasnobrunatna, pękająca kłapkami torebka o długości 4–5 mm, zawierająca liczne, białawe, pokryte brodawkami, trójgraniaste nasiona, długości 1.5 mm [45,91,237,188,147,209,185].



Rys. 37 *Lysimachia vulgaris*: a - owocujący pęd, b - owoc, c - przekrój owocu, d - kwiat, e - kłącze z korzeniami [91].

Zależnie od warunków glebowo–klimatycznych i charakteru stanowiska roślina może występować w rozmaitych odmianach i formach.

Knuth [91] rozróżnia trzy:

- | | |
|----------------------------|---|
| <i>f. aprica</i> Knuth | spotykana zwłaszcza na słonecznych stanowiskach, o dużej, złotożółtej koronie (płatki 12mm), powierzchniowo czerwonych nitkach pręcika; |
| <i>f. umbrosa</i> Knuth | rosnąca w miejscach ocienionych, o mniejszej (10 mm) ciemnożółtej koronie i zielonawożółtych nitkach pręcika; |
| <i>f. intermedia</i> Knuth | preferująca słoneczne ale wilgotne stanowiska. |

Hegi [91] natomiast wymienia:

- | | |
|--|---|
| <i>var. pubescens</i> Maisch i Vollman | odmiana o liściach pokrytych od spodu gęstymi, miękkimi włoskami; |
| <i>var. fissa</i> Boas. | odmiana mająca wolne, niezrośnięte pręciki; |

f. stolonifera Rouy
(= *f. paludosa* Baumg.)

f. submersa Glück.

f. Klinggraeffii Abromeit.

f. Guestphalica Weihe.

f. rotundifolia Cap.

f. rubropunctulata Beauv.

f. stenophylla Boiss.

forma z długimi rozłogami o licznych rozgałęzieniach oraz szerokich, skąpo owłosionych liściach. Spotykana na obszarach będących często w zasięgu działania wód powodziowych, stąd nazywana jest półwodną; forma hodowana, bardzo rzadka w stanie naturalnym, o cylindrycznej, nagiej łodydze i gładkich liściach;

forma o koronie u podstawy nakrapianej brązowo–czerwono, ku górze przechodzącej w barwę żółtą, spotykana w Polsce na Pomorzu [209];

roślina z charakterystycznym krzaczastym kwiatostanem, zebrany dołem, a u podstawy ulistnionym;

forma o okrągło–jajowatych liściach;

forma pośrednia między okazami bytującymi na stanowiskach cienistych i słonecznych;

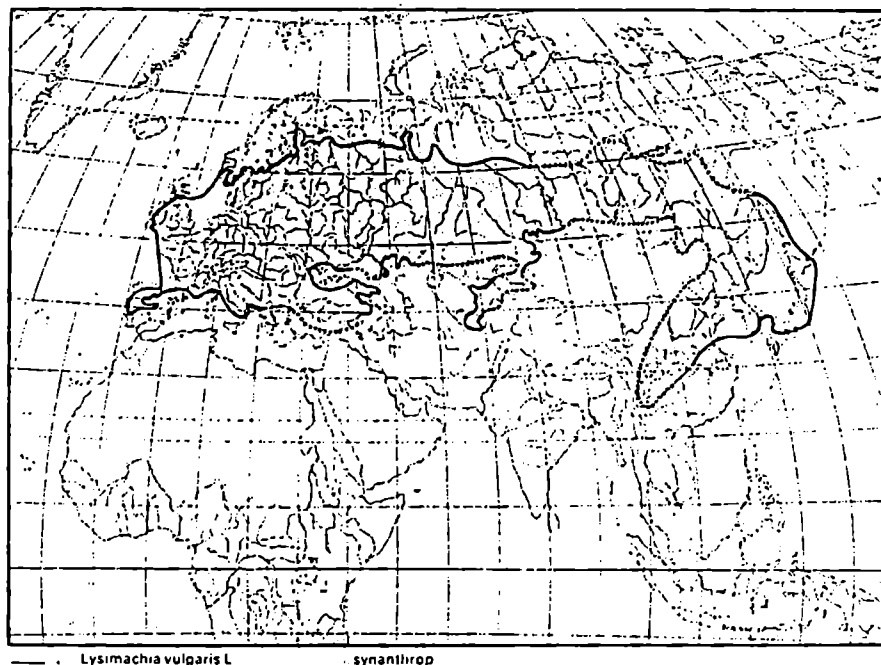
forma o liściach wąskolancetowatych.

Lysimachia vulgaris L. kwitnie od czerwca do sierpnia. Zapyłana jest przede wszystkim przez muchy *Syrphiden* oraz przez pszczoły gatunku *Macropis labiata* Prz. Rozmnaża się zarówno wegetatywnie jak i z nasion. Kiełkowanie nawet przy udziale światła zachodzi bardzo nieregularnie i powoli. Mróz prawdopodobnie jest czynnikiem sprzyjającym; w niskich temperaturach bowiem nasiona są zdolne rozwijać się nawet w ciemności [91]. Liścienie pozostają przez pewien czas w glebie wytwarzając rozłogi, o kilku międzywęźlach. Dopiero wiosną (zazwyczaj w początkach maja) naginają się one ku górze i wychodzą na powierzchnię wytwarzając nowe pędy nadziemne. Z tego względu gatunek zaliczany jest raczej do geofitów niż do hemikryptofitów.

W budowie anatomicznej *Lysimachia vulgaris* L. można zauważyć elementy charakterystyczne dla rodziny *Primulaceae*, a mianowicie włoski okrywające jednokomórkowe, jednorzędowe lub rozgałęzione oraz włoski gruczołowe o jednorzędowym trzonku i jedno– rzadziej dwu– czy czterekomórkowej główce, komórki palisadowo–ramienne w mezofilu oraz aparat szparkowy typu *ranunculaceus*. W częściach podziemnych występuje bardzo charakterystyczna dla gatunku tkanka typu aerenchymy gdzie obecne są liczne sklereidy [217,92], a w epidermie i parenchymie łodygi i kłączy idioblasty o brunatnoczerwonym zabarwieniu [92] oraz ziarna skrobi [147]. Komórki endodermy w przekroju mają kształt litery U, natomiast parenchymalne charakteryzują się znacznie zgrubiałymi ścianami [147]. Ponadto obserwuje się schizogeniczne komórki gruczołowe z czerwono-brązową wydzieliną, często krystalizującą.

3.4 Występowanie

Lysimachia vulgaris L. jest gatunkiem euroazjatyckim, szeroko rozpowszechnionym zwłaszcza w obrębie strefy umiarkowanej, jakkolwiek obejmuje swoim zasięgiem jedynie tereny do 64 równoleżnika w regionie północnym. Występuje w Europie, Ameryce Północnej i Azji, od Kaukazu aż po Japonię. Opisano też stanowiska w Australii, północnej Afryce (Algieria) i na Madagaskarze. We florze południowych krańców Hiszpanii, Włoch i Grecji, uważana jest natomiast za bardzo rzadki gatunek, prawdopodobnie ze względu na niekorzystny, suchy klimat tych terenów [91].



Rys. 38 Mapka zasięgu występowania *Lysimachia vulgaris* na półkuli północnej.

W Polsce występuje pospolicie, praktycznie na obszarze całego kraju. Większość stanowisk opisano na niżu i w niższych położeniach górskich (do 1200 m n.p.m) m.in. na Babiej Górze i Policy, w Tatrach, Sudetach i na Wzniesieniu Gubałowskim [186].

Tojeść pospolita jest chamefitem rosnącym dobrze na glebach ilastych i torfowo-glejowych z wodą gruntową tuż pod powierzchnią. Jej stanowiska obserwuje się najczęściej na brzegach rzek, stawów, w rowach, błotnistych zaroślach i na podmokłych polach. Może rosnąć w głębokim cieniu ale w takich warunkach rzadko dochodzi do kwitnienia. Tojeść jest gatunkiem charakterystycznym dla tzw. łąk okresowo wilgotnych z rzędu *Molinietalia* oraz rośliną typową dla lasów bagiennych, przede wszystkim olsów i olszyn górskich, bagiennych borów świerkowych, liściastych lasów rosnących nad potokami w zasięgu wód powodziowych czyli łągu olchowo–jesionowego a także torfowisk niskich, wysokich i przejściowych [38,91,269,186,45,212].



Rys. 39 Fotografia naturalnego stanowiska tojeści pospolitej (Sułów koło Wieliczki).

3.5 Aktywność farmakologiczna

Rośliny rodzaju *Lysimachia* L. dzięki swoim interesującym właściwościom, a także łatwej dostępności surowca, zyskały uznanie lekarzy starożytnych, a później medycyny ludowej będąc wykorzystywane nie tylko jako *remedia medica*. Współcześnie rozmaite gatunki tojeści są źródłem badań fitochemicznych i farmakologicznych mających na celu zweryfikowanie wiedzy o ich działaniu, opartej na wieloletnich obserwacjach i doświadczeniach minionych wieków jak również próbie identyfikacji związków odpowiedzialnych za to działanie.

Szczególnym zainteresowaniem cieszą się gatunki dalekowschodnie związane z tradycyjnym lecnictwem Chin i Japonii. *Lysimachia sikokiana* Miquel, będąca ludowym środkiem przeciwbólowym oraz repelentem komarów (stosowanym w rejonie wysp Loochoo), została poddana wszechstronnym badaniom farmakologicznym. W ich wyniku okazało się, że roślina wykazuje wyraźną aktywność przeciwmięczakową, szczególnie wobec ślimaka *Oncomelania nosophora* żywiciela pośredniego przywry *Schistosoma japonicum*. Związkiem aktywnym jest saponozyd triterpenowy – lysikokianozyd 1 [91,142].

Rosnąca dziko w górzystych rejonach Japonii *Lysimachia japonica* Thunb. jest tradycyjnym lekiem przeciwbrzękowym oraz środkiem pomocnym w leczeniu czyraków i wysypek skórnych. Arisawa i wsp. [14] wyizolowali z rośliny pochodną rezorcynolu aktywną cytotoksycznie w badaniach *in vitro* wobec linii nowotworowych KB, PC-13 i B-16. Związek ten, noszący nazwę grewillol, jest ponadto inhibitorem $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -azy. Zdecydowanie silniej działa jednak jego prekursor – kwas 6-tridecylorezorcylowy, również wyodrębniony z tojeści japońskiej, a zidentyfikowany ponadto w niedojrzałych nasionach *Ginkgo biloba* L. W porównaniu do ouabainy hamuje on działanie tego enzymu dwunastokrotnie słabiej [258].

Medycyna ludowa tego regionu korzysta ponadto z gatunku *L. fortunei*, którego ziele jest skutecznym środkiem zablizniającym [314]. Pewne nadzieje wiąże się również z *Lysimachia clethroides* Duby. Obecne w tym surowcu flawonoidy charakteryzują się bowiem wyraźnym działaniem przeciwbiałaczkowym (typ L-615) [81]. Także izolowanej z *L. mauritiana* mauritianinie przypisuje się aktywność antynowotworową [314].

Kolejnym ciekawym gatunkiem Dalekiego Wschodu jest *Lysimachia christinae* Hance. Zawarte w niej związki polisacharydowe hamują krystalizację szczawianu wapnia, dzięki czemu surowiec stosowany jest w leczeniu kamicy nerek i dróg moczowych [161]. Literatura donosi także o aktywności przeciwzapalnej rośliny, co związane jest prawdopodobnie z flawonoidami i fenolokwasami [78]. *L. christinae* wchodzi w skład preparatu LIDAN TABLETS produkowanego przez Tsingtao Pharmaceutical Works, Chiny, polecanego w terapii stanów zapalnych dróg żółciowych.

W Europie wykorzystywano przede wszystkim tojeść rozeslaną i tojeść pospolitą. *Lysimachia nummularia* L. zwana czasem **pieniążkiem** była szczególnie ceniona przez medyków Średniowiecza traktujących roślinę niemal jako panaceum [197]. Obecnie stosowana jest przez medycynę ludową przy szkorbutcie, reumatyzmie, w leczeniu

biegunek i przy krwiopłuciu u gruźlików [215] oraz homeopatycznie jako środek zablizniający i w owrzodzeniach skóry [99]. Taki kierunek użycia wynika z zawartości w surowcu garbników, fenolokwasów, flawonoidów oraz krzemionki, czyli substancji determinujących aktywność przeciwzapalną, antybiotyczną, hemostatyczną i ułatwiającą zabliznianie [220,162,313,216]. Tojeść rozesłaną wykorzystuje się też w kosmetyce do produkcji szamponów (saponiny) oraz toników o lekkim działaniu przeciwgrzybiczym [59,26].

Gatunek *Lysimachia vulgaris* L. był znany i stosowany już przez medycynę antyczną. Jak podaje Matiolus w swoich komentarzach dzieł Dioskuridesa, tojeść pospolitą stosowano do tamowania krwotoków, w obfitej menstruacji oraz jako środek przeciw dezynтерии. Uważano, że palona, ze względu na nieprzyjemną, ostrą woń, odstrasza węże i insekty [217]. W Średniowieczu przetwory z kwiatów i liści tojeści ordynowano dla zahamowania uporczywych biegunek, przy krwawieniach, w leczeniu szkorbutu i gorączki oraz zewnętrznie w owrzodzeniach skóry. *Herba Lysimachiae vulgaris* było surowcem farmakopei francuskiej - wymienia go *Codex Medicamentarius Sive Pharmacopoea Gallica* wydany w Paryżu w 1818 roku [105].

Współcześnie roślina wykorzystywana bywa najczęściej poza lecnictwem np. do celów barwierskich (żółty barwnik ekstrahuje się z liści, a brązowy z kłączy) oraz w kosmetyce do pielęgnacji włosów [26,45]. Natomiast jedna z odmian – *varietes dahurica*, stosowana jest nadal przez tradycyjną medycynę chińską jako lek hipotensyjny oraz przeciwbólowy [91,312].

W latach siedemdziesiątych Prum [217], zasugerowana francuską ludową nazwą tojeści "chasse bosse" oznaczającą w wolnym tłumaczeniu "wypędzająca guzy", przeprowadziła badania farmakologiczne w kierunku potwierdzenia jej potencjalnej aktywności przeciwzapalnej i przeciwbólowej. W badaniach tych użyto zagęszczone, a następnie zliofilizowane wyciągi wodne i alkoholowe z całej rośliny. Aktywność analgetyczną testowano na królikach, po wywołaniu bólu przez elektryczną stymulację miazgi zębowej. Wykazano, że po podaniu wyciągu wodnego w dawce 50 mg/kg (co odpowiada 0.35 g surowca) ból ustępował całkowicie, a okres niewrażliwości na bodźce utrzymywał się do 45 minut. Wyraźną aktywność przeciwbólową potwierdzają wyniki badań na myszach. Objawy wywoływano stymulacją elektryczną oraz dootrzewnowym podaniem silnie drażniącego parabenzochinonu (PBQ). W obu przypadkach wyciągi z tojeści powodowały wyraźne ich ustąpienie. Szczególnie skuteczny okazał się ekstrakt wodny, który w dootrzewnowej dawce 250 mg/kg hamował reakcje zwierząt na bodźce drażniące aż w 95% w porównaniu do kontroli (klasycznego analgetyka – temoin).

Działanie przeciwzapalne badano na szczurach w teście karageninowym, serotoninowym i formolowym. Najwyższą aktywność przeciwobrzękową, rzędu 70%, zaobserwowano w przypadku wyciągów wodnych po podaniu drogą dootrzewnową w dawce 100 mg/kg. Zdecydowanie niższy efekt (ok. 30%) stwierdzono po podaniu *per os*. W innych eksperymentach przeprowadzonych dodatkowo przez Prum wykazano ponadto, iż tojeść posiada wyraźną aktywność hipotensyjną i przeciwgorączkową z tym, że obniża temperaturę nie tylko w sprowokowanej hipertermii lecz również w normalnych warunkach. Natomiast udokumentowane w praktyce medycznej działanie przeciwbiegunkowe potwierdzono wynikami badań *in vivo* i *in vitro* na izolowanych fragmentach

jelit.

We współpracy z amerykańskim National Cancer Institute w Bethesda, przeprowadzono wstępne badania wyciągu alkoholowego z części nadziemnych *Lysimachia vulgaris* na liniach nowotworowych białaczek L-1210, P 388 a także KB, nie uzyskano jednak znaczących wyników [217].

Podobnie jak wiele gatunków należących do *Primulaceae* (*Primula sp.*, *Anagallis sp.* [301,19,11]) tojeść pospolita działa hamująco na szereg drobnoustrojów. Przypuszcza się, że charakterystyczny chemizm rodziny, zwłaszcza współobecność saponozydów, fenolokwasów i flawonoidów, może w pewnym stopniu determinować tę aktywność [290,92]. Fuzi [72,73] donosi o działaniu antybiotycznym wyciągów z kwiatów i owoców tojeści wobec *Salmonella typhi*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella suipester*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* czy *Pseudomonas aeruginosa*, a także przeciw prątkom gruźlicy. Stwierdzono ponadto aktywność przeciw wirusowi grypy typ A oraz *Pseudomonas pyocyanea* [40].

3.5.1 Toksyczność

Jako jedna z nielicznych roślin tojeść została przebadana na ostrą toksyczność. Dootrzewnowe dawki rzędu 1000, 1500 mg/kg spowodowały śmierć 60% myszy po 24 godzinach. Zaobserwowano krótkotrwałe pobudzenie a następnie apatię. Sekcja wykazała zmiany w narządach wewnętrznych m.in. ogniska ropne w otrzewnej oraz krwotoczne w wątrobie [217].

Bardziej istotne z praktycznego punktu widzenia wydają się być wyniki testów na zdolność wywoływania kontaktowego, ostrego zapalenia skóry czym charakteryzuje się wiele roślin z rodziny *Primulaceae*. Substancją odpowiedzialną za to działanie jest zlokalizowany w krótkich włoskach pokrywających płatki korony, łodygę i liście barwnik chinoidowy – primina, izolowana po raz pierwszy przez Nestlera w 1904 roku z gatunku *Primula obconica* Hance.[88]. Jest to jeden z najsilniejszych kontaktowych alergenów, wywołujący reakcję już w stężeniu 1/5000 M [128]. Dermatozy, będące wynikiem “uczulenia typu pierwiosnki”, są w Wielkiej Brytanii i Danii najczęstszymi dolegliwościami skórnymi notowanymi jako wynik kontaktu dotykowego z roślinami.

Badania skringowe rodziny *Primulaceae* przy użyciu testu Cravena, przeprowadzone w 1978 roku przez Hausena, nie stwierdziły w *Lysimachia vulgaris* obecności priminy. Nie opisano też przypadku zapalenia skóry na skutek kontaktu z rośliną [88].

3.6 Skład chemiczny

Lysimachia vulgaris L. jest jak dotychczas jedynie częściowo przebadana pod kątem składu i zawartości substancji odpowiedzialnych za jej działanie farmakologiczne. Surowiec, podobnie jak inne gatunki należące do *Primulaceae* zawiera saponozydy i związki o charakterze fenoli będące chemicznym wyznacznikiem tej rodziny [92],

● związki fenolowe

W tej grupie najdokładniej opracowano **flawonoidy**. Obecność samego flawonu, jak i pewnych rzadkich jego pochodnych, jest cechą chemotaksonomiczną Pierwiosnkowatych [82]. Występują one w częściach nadziemnych rośliny, a ich zawartość zmienia się zależnie od fazy wzrostu osiągając najwyższy poziom tuż przed okresem kwitnienia [217]. Z pochodnych fenylobenzopirany w kwiatach, liściach i kłęczach stwierdzono leukocyjanidynę i leukodelfinidynę, natomiast w całym ziele antocyjanidyny: delfinidynę i cyjanidynę [218]. Z pochodnych fenylo benzo- γ -pironu zidentyfikowano: kemferol, kwercetynę, mirycetynę, syringetynę i izoramnetynę oraz ich glikozydy takie jak 3- β -D-glukopiranozyd kemferolu (=astragalina), 3- α -L-ramno- β -D-glukopiranozyd kemferolu, 3-O-(2,6-diramno)-galaktozyd kemferolu, 3- β -D-glukopiranozyd kwercetyny (izokwercytryna), 7- β -D-glukopiranozyd kwercetyny, rutozyd, 3- β -D-gluko-7- β -D-dwuglukozyd kwercetyny, 3-O-neohesperozyd kwercetyny, 3-O-(2,6-diramno)-galaktozyd kwercetyny, 3- α -L-ramno- β -D-glukopiranozyd mirycetyny, 3-O-arabinozyd mirycetyny, 3-O-ksylozyd syringetyny, 3-O-galaktozyd syringetyny, 3-O-galaktozyd izoramnetyny, 3-O-arabinozyd izoramnetyny, 3-O- β -D-glukopiranozyd izoramnetyny [216,234,312,218,313,217,82].

Jak podaje Korta [146] rutyna występuje we wszystkich częściach rośliny oprócz łodygi. Jest to ilościowo dominujący flawonoid, jego zawartość przekracza 1.5% [234]. Natomiast z punktu widzenia chemotaksonomii związkiem charakterystycznym dla rodzaju *Lysimachia* jest 7- β -D-glukopiranozyd kwercetyny obecny w kwiatach i liściach [217].

Spośród **fenolokwasów** Hegnauer [92] wymienia kwas kawowy; ponadto stwierdzono jako wolne kwas p-kumarowy (ok. 9%), wanilinowy, p-hydroksybenzoesowy, gentyzowy, syringowy, ferulowy, kawowy, synapowy, protokatechowy, homoprotekatechowy, a jako związane kwas p- i o-hydroksyfenylooctowy. W ziele obecny jest także depsyd kwasu kawowego i chinowego – kwas chlorogenowy [217,162,146].

W częściach nadziemnych występują **garbniki** [290,92]. Według Korty ich zawartość wynosi około 5.4% [146].

● saponozydy

Mimo, iż obecność saponozydów jest cechą chemotaksonomiczną rodziny *Primulaceae*, pionierzy badań tej grupy związków w gatunkach Pierwiosnkowatych metodą próby hemolitycznej, jak np. Hof (1927), nie stwierdzili ich w *Lysimachia vulgaris* L.[92]. Ten negatywny wynik, będący skutkiem zamaskowania obecności saponin przez garbniki i kompleks steroli, zrewidował w 1988 roku Umek powtarzając eksperyment przy użyciu

innej metodyki [288].

Poza tą wzmianką o występowaniu saponin w tojeści pospolitej, jak dotąd nie było doniesień o ich izolacji i określeniu struktury chemicznej.

● inne związki

Z innych związków zidentyfikowanych w tojeści można wymienić kwasy alifatyczne malonowy i bursztynowy [162], sterole takie jak β -sitosterol i stigmasterol [288], cukry –glukozę [146], primwerozę, sacharozę oraz oligosacharydowy glukofruktozyd w kwiatach i liściach. Stwierdzono ponadto witaminę C [92] oraz śladowe ilości acetylocholinę [146].

Z mikroelementów zwraca uwagę stosunkowo duża zawartość manganu, co stwierdzili Tolgyesi i Kozma badając skład mineralny większości roślin zielnych strefy umiarkowanej [279].

Na podstawie reakcji barwnej w teście Cravena na obecność benzochinonu priminy, Hausen wykazał, iż *Lysimachia vulgaris* L. zawiera inne nieznanne barwniki chinoidowe [88].

Ich struktura do tej pory nie została opisana.

II Założenia i cel pracy

Współczesna medycyna, wykorzystując bogactwo świata naturalnego często w oparciu o doświadczenia pokoleń, wymaga coraz dokładniejszych informacji na temat składu chemicznego surowców roślinnych, a także udokumentowanej farmakologicznie aktywności poszczególnych związków. W obliczu konkretnych oczekiwań ze strony nowoczesnego lecznictwa, darzącego nadal większym zaufaniem ściśle określony lek syntetyczny niż enigmatyczny kompleks szeregu substancji tworzących tzw. lek naturalny, uzasadnione jest uzupełnianie danych dotyczących struktury chemicznej związków roślinnych, poparte badaniami ich skuteczności terapeutycznej.

Jednym z zadań fitochemii jest ciągle korygowanie wiedzy o aktualnie stosowanych surowcach oraz uzupełnianie ich arsenału o nowe gatunki, wykorzystując, między innymi, doświadczenia etnomedycyny. Innym, poszukiwania w obrębie znanych typów strukturalnych nowych układów o potencjalnej aktywności biologicznej. Wreszcie kolejnym - poszukiwania nowych, wydajnych i łatwo dostępnych źródeł pozyskiwania związków o udokumentowanej wartości terapeutycznej czy użytkowej.

Założeniem niniejszej pracy było podjęcie badań, które w ramach dostępnych środków i możliwości badawczych odpowiadałyby w/w oczekiwaniom. Zostały one ukierunkowane na dwie grupy metabolitów wtórnych tj. saponozydy triterpenowe i benzochinony. Wybór taki uzasadniało szereg doniesień literaturowych potwierdzających niezmiernie interesujące i szerokie spektrum aktywności biologicznej, jaką charakteryzują się związki należące do obu grup strukturalnych.

Poszukiwania surowca do izolacji zarówno chinonów jak i saponin w obrębie gatunków flory krajowej skoncentrowano na rodzinie *Primulaceae* opierając się na wzmiankowanej ich obecności wśród przedstawicieli tej rodziny. Jako materiał do badań wytypowano tojeść pospolitą - *Lysimachia vulgaris* L., roślinę spotykaną powszechnie na obszarze Polski i w całej strefie umiarkowanej. Gatunek ten znany był już przez medycynę antyczną i średniowieczną i nadal cieszy się uznaniem medycyny ludowej.

Bogata tradycja lecznicza surowca i jego łatwa dostępność dodatkowo skłaniały do zainteresowania się tojeścią, tym bardziej, iż wiedza o składzie chemicznym rośliny jest nadal fragmentaryczna.

Celem podjętych przeze mnie badań była izolacja związków saponozydowych i benzochinonowych z tojeści pospolitej oraz ustalenie ich struktury chemicznej, a także wstępne przetestowanie tych związków w kierunku aktywności przeciwrzybiczej i przeciwnowotworowej.

III Dyskusja

1 Omówienie wyników badań

Przedmiotem badań były saponozydy i benzochinony w *Lysimachia vulgaris* L. Wyciągi metanolowy i chloroformowy z surowca poddano wstępnej analizie mającej na celu potwierdzenie wzmiankowanej przez literaturę obecności tych związków w badanym gatunku [288,88]. Pozytywne rezultaty przeprowadzonych prób wskazywały, iż surowiec zawiera saponozydy triterpenowe (reakcja z odczynnikiem Brieskorna–Brinera, test pienienia i hemolizy). Intensywne, pomarańczowoczerwone zabarwienie wyciągu chloroformowego oraz wyniki reakcji z FeCl_3 i z alkaliarni sugerowały obecność barwników chinonowych.

Porównawcze zestawienie chromatogramów wyciągów z części nadziemnych i podziemnych pozwoliło wytypować kłącza, wraz z korzeniami i rozłogami, jako najbardziej korzystny materiał do izolacji badanych związków. Stwierdzono bowiem, iż saponozydów praktycznie brak zarówno w niekwitnących częściach nadziemnych, owocach, jak i kwiatach, natomiast chinony, choć obecne w owocach i kwiatach, dominują ilościowo właśnie w częściach podziemnych.

Analiza chromatograficzna TLC wyciągów z części podziemnych zebranych w dwóch różnych okresach wegetacyjnych wykazała z kolei, że w fazie kwitnienia roślina syntetyzowała większą liczbę związków saponozydowych. Zawartość barwników chinonowych natomiast, kształtowała się na tym samym poziomie. Wobec powyższych danych do izolacji badanych związków użyto wysuszonych i rozdrobnionych części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. zebranych w okresie kwitnienia tj. na przełomie lipca i czerwca.

W wyciągu chloroformowym z surowca stwierdzono chromatograficznie (TLC) obecność żółtopomarańczowej (w świetle widzialnym) plamy o wartości R_f 0.61 (faza ruchoma S_{11}), którą oznaczono symbolem BQ (zob. rozdział IV, p. 2.3.1). Substancję BQ izolowano przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym silanizowanym, a po kilkukrotnym przekryształizowaniu z benzenu poddano analizie fizykochemicznej i spektralnej.

Substancja BQ, o intensywnie pomarańczowym zabarwieniu, topiła się w temp. 141–143 °C i była optycznie nieczynna. Jej dobra rozpuszczalność w benzenie, chloroformie i eterze naftowym wskazywała na lipofilny charakter. Na żelu

krzemionkowym oraz w reakcji z alkaliarni substancja BQ zmieniała barwę na fioletową, z chlorkiem żelaza na intensywnie czerwona. Wyniki analizy elementarnej oraz spektroskopii masowej (EIMS: m/z 350 [M^+]) wskazywały na wzór sumaryczny $C_{21}H_{34}O_4$.

Widoczny na widmie w nadfiolecie (rys. 50) układ dwóch pasm K λ_{max} 291 i R 419, wskazujący na układ chromoforowy o sprzężonych wiązaniach podwójnych, odpowiadał pasmom charakterystycznym dla opisanych dioksy podstawionych α,β -nienasyconych chinonów [148,200,149,199,150,70,261].

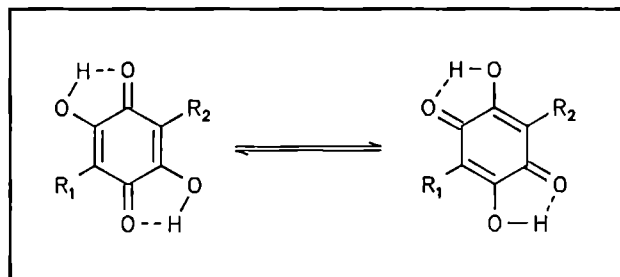
Powstanie barwnego produktu reakcji z $FeCl_3$ oraz zdolność tworzenia przez substancję BQ pochodnych acetylowej i metylowej sugerowało podstawienie pierścienia chinonowego grupami hydroksylowymi. Potwierdza to widoczne na widmie w podczerwieni pasmo drgań walencyjnych tzw. "wolnej grupy hydroksylowej" przy 3310 cm^{-1} , które zanika w widmie IR acetylowej i metylowej pochodnej (rys. 60 i 61).

W widmie w podczerwieni zwraca ponadto uwagę silne pasmo absorpcji przy 1615 cm^{-1} . Wiele doniesień w literaturze potwierdza, iż pojedyncze i nierozszczepione pasmo przy tej długości fali wskazuje na grupy karbonylowe silnie związane poprzez mostki wodorowe z sąsiadującymi hydroksylami, a więc na strukturę typu 2,5-dihydroksybenzochinonu [199,200,191]. W przypadku podstawienia typu 2,6-dihydroksy pojawiają się bowiem dwa wyraźne piki absorpcji karbonyli (z reguły ok. 1660 i 1641 cm^{-1}), co wynika z faktu, iż jedna z grup OH nie wytwarza silnego wiązania wodorowego. Podobna sytuacja ma miejsce jeśli podstawnikami są inne ugrupowania np. metoksyłowe, metylowe [302,150,261].

Układ podstawników hydroksylowych wpływa ponadto w istotny sposób na obserwowane przesunięcia sygnałów w nadfiolecie. W przypadku 2,5 i 2,6 dihydroksybenzochinonów pasmo K w widmie UV pojawia się przy dłuższych (λ 289, 292) długościach fali niż dla 2,3 dihydroksypochoodnych (λ 245) [191,308]. Tak więc pojedyncze pasmo przy 1615 cm^{-1} w obrazie IR substancji BQ, oraz przesunięte ku dłuższym falom w widmie UV pasmo K, wydaje się wskazywać na 2,5-dihydroksy-*p*-benzochinon.

Dalsze potwierdzenie tego założenia dostarcza obserwacja widma magnetycznego rezonansu jądrowego ^{13}C NMR. Jak podaje literatura [148], dla pochodnych podstawionych grupami hydroksylowymi w pozycji C-2 i C-5, jak np. mesachinon czy hydroksyperezon, widoczne są jedynie dwa z sześciu sygnałów węgla pierścienia chinonowego. Cztery węgle związane bezpośrednio z atomami tlenu (tj. C-1, C-2, C-4 i C-5) pojawiają się na widmie, zależnie od zastosowanego rozpuszczalnika, albo w postaci pojedynczego, szerokiego sygnału przy około $\delta=168\text{ ppm}$ (DMSO) lub też w

ogóle są niezauważalne ($CDCl_3$). Takie zachowanie wynika z nieustannej konwersji dwóch równocennych energetycznie tautomerów.



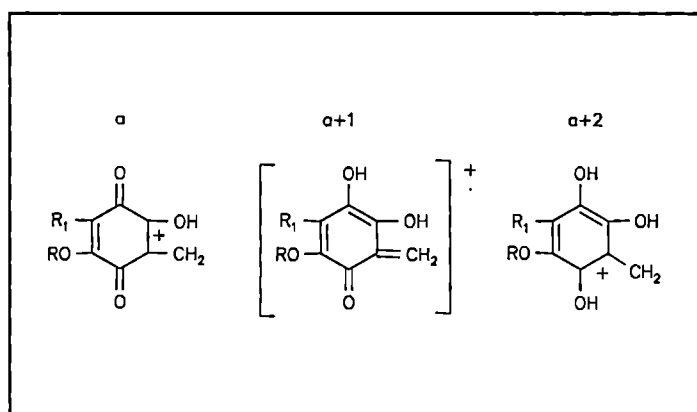
Rys. 40 Przejścia konformacyjne dihydroksy pochodnych *p*-benzochinonu.

W widmie ^{13}C NMR substancji BQ (rys. 56) zaobserwowano, przy dużym wzmocnieniu, pojedynczy, zniekształcony sygnał przy $\delta=169$ ppm pochodzący od węgla C-1, C-2, C-4 i C-5 pierścienia oraz dwa wyraźne sygnały węgla C-6 i C-3 (odpowiednio przy $\delta=102.2$ i $\delta=117.1$).

W widmie ^1H NMR singlet przy δ 5.9 ppm, który ze względu na charakterystyczne przesunięcie przypisano protonowi pierścienia chinonowego, wskazywał, iż tylko jeden jego węgiel jest niepodstawiony. Hipotezę tę potwierdza widoczne na widmie korelacyjnym $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ sprzężenie między w/w sygnałem a węglem C-6 pierścienia, przy jednoczesnym braku sprzężeń sygnału C-3 z jakimkolwiek protonem (rys. 57). W widmie ^1H NMR zaobserwowano ponadto dwuprotonowy sygnał przy $\delta=7.6$ ppm pochodzący od grup hydroksylowych oraz charakterystyczne sygnały wskazujące na obecność, jako trzeciego podstawnika, alifatycznego łańcucha bocznego (δ ppm): zniekształcony triplet przy 0.87 pochodzący od terminalnej grupy metylowej, singlet przy 1.26 oraz triplety przy 1.48 i 2.45 przypisane protonom grup metylenowych (rys. 55). Sygnały węgla łańcucha bocznego na widmie ^{13}C NMR stwierdzono w zakresie 14.0–31.9 ppm (rys. 56).

Powyższe dane (IR, UV, NMR) pozwalające założyć, iż substancja BQ jest *p*-benzochinonem podstawionym dwiema grupami hydroksylowymi i łańcuchem alifatycznym znajdują dalsze potwierdzenie w widmie masowym (rys. 58). Na strukturę o charakterze benzochinonu wskazuje pośrednio sama obecność pików jonu macierzystego M, ponieważ układ cykliczny i wiązania podwójne stabilizują ten jon [261].

Grupa trzech pików fragmentacyjnych przy m/z 153, 154, 155 odpowiada powstaniu tzw. jonów benzyliowych a, a+1, a+2, po odszczepieniu fragmentu łańcucha bocznego.



Rys. 41 Jony benzyliowe [200].

Jak podaje literatura [200,199,129] taka fragmentacja, jak również brak charakterystycznego dla innych benzochinonów sygnału $\text{M}^+ - \text{CO}$, jest typowa dla 2,5-dihydroksy-alkilo-benzochinonów.

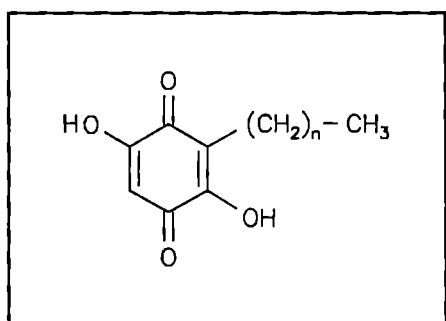
Fragment o masie 196 odpowiada oderwanej od jonu benzyliowego części łańcucha alifatycznego ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}$) co pozwalało przypuszczać, iż wyizolowana z kłączy *Lysimachia vulgaris* L. substancja BQ jest 2,5-dihydroksy-3-pentadecylo-*p*-benzochinonem [115a].

Według dostępnych danych literaturowych do tej pory zidentyfikowano cztery związki benzochinonowe podstawione w pozycji C-2 i C-5 grupami hydroksylowymi, a w pozycji C-3 nasyconym łańcuchem alifatycznym. Są to homoembelina (M 266), embelina (M 294), rapanon (M 322) i homorapanon (M 350), o długości łańcucha odpowiednio C₉, C₁₁, C₁₃ i C₁₅ [129,200].

Związki te występują w przyrodzie w mieszaninach i izolowane są zazwyczaj jako kompleks o różnej zawartości poszczególnych homologów, który mimo niejednorodności łatwo krystalizuje, ma ostry punkt topnienia, daje pojedynczą, zwartą plamę na TLC i identyczny obraz absorpcji w nadfiolecie. Jak podaje Ogawa [200] pewne różnice można zauważyć analizując widmo w podczerwieni w zakresie 800 – 1000 cm⁻¹, które różni się nieco w przypadku embeliny i rapanonu (rys. 53). Jednak wskazówką będącą podstawą identyfikacji poszczególnych homologów daje widmo masowe, gdzie powinny być widoczne piki macierzyste tych związków, jak również analiza HPLC, GLC, GC-MS.

Barwnik BQ posiadał identyczną temperaturę topnienia jak embelina [200,126], jego wartość R_f odpowiadała wzorcom embeliny i rapanonu (rys. 47), a widmo w podczerwieni w zakresie 800–1000 cm⁻¹ odpowiadało embelinie (rys. 54). Analizując widmo masowe stwierdzono, iż obok piku jonu macierzystego m/z 350, zawiera ono wyraźne sygnały przy m/z 294 i 322 wskazujące na obecność dwóch niższych homologów.

Analiza gazowa estrów metylowych kwasów tłuszczowych, powstałych wskutek utlenienia substancji BQ nadmanganianem potasu, (zob. rozdział IV, p. 4.1.3) wykazała obecność kwasu laurynowego, mirystycznego i palmitynowego (rys. 62), co dodatkowo potwierdziło, iż wyizolowany z *Lysimachia vulgaris* barwnik jest kompleksem benzochinonów alkilowych o piętnasto, trzynasto i jedenastowęglowym łańcuchu bocznym. W celu określenia ich procentowego udziału w mieszaninie zastosowano kapilarną chromatografię gazową (rys. 59), porównując czasy retencji z wzorcową embeliną i rapanonem. Wyniki analizy wskazują, że barwnik benzochinonowy oznaczony symbolem BQ jest kompleksem embeliny (73%), rapanonu (26%) i homorapanonu (< 1%).



Rys. 42 Substancja BQ: embelina n=10, rapanon n=12, homorapanon n=14

W wyciągu metanolowym z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. w wyniku analizy techniką chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono obecność trzech saponozydów, które oznaczono A, B i C wg. malejącej polarności (zob. rozdział IV, p. 2.3.2). Po wywołaniu chromatogramu zawiesiną erytrocytów okazało się, że aktywność hemolityczną wykazują jedynie saponozydy B i C (zob. rozdział IV, p. 2.2, rys. 46). Brak tej aktywności

w przypadku saponozydu A, jak również jego wysoka polarność (wartość R_f 0.08, faza S_1) sugerowały, iż może mieć on bidesmozydową strukturę.

Podjęto próbę izolacji w/w związków metodą chromatografii kolumnowej. Warunki rozdzielania dobierano na drodze eksperymentalnej. Ze względu na znaczne zanieczyszczenie ekstraktu innymi substancjami, konieczne było wielokrotne powtarzanie tego procesu. Dlatego też, w końcowym etapie nie udało się otrzymać saponozydów C i D w ilości umożliwiającej dalsze badania strukturalne. Obecność saponozydu D stwierdzono na jednym z późniejszych etapów oczyszczania (zob. rozdział IV, tab. 3, p. 3.3.2.2.4).

Badaniom zmierzającym do ustalenia budowy chemicznej poddano więc dwa wyizolowane związki tj. saponozyd A i B.

Saponozyd B (120 mg) otrzymany w postaci amorficznej (kryst, MeOH), topił się w temperaturze 265–270 °C, a jego skręcalność właściwa $[\alpha]_D$ wynosiła +2°. Intensywny pik masowy m/z 1045 w widmie FAB–MS (jony ujemne) wskazywał na ciężar cząsteczkowy 1046, co wraz z danymi ^{13}C NMR pozwoliło ustalić wzór sumaryczny $\text{C}_{52}\text{H}_{86}\text{O}_{21}$.

W wyniku wstępnej hydrolizy kwaśnej gazowym chlorowodorem (TLC) i ko-chromatografii z wzorcami zidentyfikowano monosacharydy tworzące część cukrową jako glukozę, arabinozę i ksylozę. Cukrom tym, obecnym w stosunku 2:1:1, odpowiadają zaobserwowane w widmie magnetycznego rezonansu jądrowego ^{13}C NMR sygnały anomerycznych węgli przy δ (ppm) odpowiednio 105.6, 104.8, 104.3 i 107.2 (zob. rozdział IV, p. 5.2, tab.6). Analiza wartości przesunięć wskazywała, iż poszczególne monosacharydy połączone są O–glikozydowo, a ponadto pozwoliła przyjąć typ wiązań: dla glukozy i ksylozy β natomiast dla arabinozy α , oraz ustalić, iż wszystkie cztery cukry występują w formie piranozy [5,58]. Absolutną konfigurację potwierdzono w oparciu o wartości przesunięć sygnałów protonów anomerycznych w widmie ^1H NMR oraz stałe sprzężenia spinowego. Dla ksylozy δ (ppm) 5.47 (d, $J=7.6$ Hz), dla glukozy 4.97 (d, $J=7.9$ Hz) i 4.88 (d, $J=6.5$ Hz), a dla arabinozy 4.76 (d, $J=5.4$ Hz).

Droga fragmentacji (MS) saponozydu B wskazywała na rozgałęzienie łańcucha cukrowego (rys. 64). W widmie FAB-MS (jony ujemne) zaobserwowano bowiem piki odpowiadające równoczesnemu odszczepieniu terminalnej pentozy (m/z 913) i terminalnej glukozy (m/z 883) oraz terminalnego disacharydu glukoza–pentoza (m/z 751). Widoczne są ponadto piki o masie m/z 132 (pentoza) i 162 (glukoza). Ze względu na brak sygnałów odpowiadających utracie fragmentu pentoza–pentoza czy heksoza–heksoza można przypuszczać, iż centrum rozgałęzienia stanowi jedna z pentoz (ksyloza lub arabinoza), do której przyłączona jest osobno glukoza oraz fragment glukoza–pentoza (ksyloza lub arabinoza).

Sekwencję cukrów ustalano opierając się na analizie powstałych podczas częściowej hydrolizy kwaśnej saponozydu B prosapogenin, które poddano następnie pełnej hydrolizie. W tych warunkach jedna z sapogenin uwolniła tylko arabinozę co pozwoliło zidentyfikować ten właśnie cukier jako pentozę bezpośrednio związaną z aglikonem (zob. rozdział IV, p. 4.2.3 i p. 5.2).

Miejsca glikozydacji w obrębie łańcucha ustalono w oparciu o analizę przesunięć

sygnałów pozostałych węgli poszczególnych cukrów, które dopasowano w oparciu o dane literaturowe związków o zbliżonej strukturze [166,119,142,27,259,260,226,120,291]. W przypadku arabinozy przesunięte w kierunku niższego pola sygnały węgli C-2 i C-4 świadczą o glikozydacji w tych pozycjach (odp. 80.2 i 79.5 ppm). Podobnie, pojawienie się sygnału C-2 jednej z cząsteczek glukozy przy 85.1 wskazuje, iż grupa hydroksylowa przy tym węglu jest zablokowana.

Wyniki te potwierdzono przeprowadzając pełną metylację saponozydu B metodą wg. Hakomori, a następnie analizując, po hydrolizie, zmetylowane cukry techniką TLC (zob. rozdział IV, p. 4.2.4 i p. 5.2). Porównanie wartości R_f wskazywało na obecność 2,3,4,6-tetra-O-metyloglukozy i 2,3,4-tri-O-metyloksylozy, dowodząc tym samym ich terminalnego położenia. Pozostałe plamy odpowiadały 3,4,6-tri-O-metylo glukozie i 3-O-metylo arabinozie [287].

W celu dokładnego określenia miejsc glikozydacji zmetylowane cukry przekształcono dalej w octany odpowiednich alditoli i analizowano metodą chromatografii gazowej. Z porównania czasów retencji badanych związków z wzorcami wynika, iż bezpośrednio związana z aglikonem (1→3) arabinoza stanowi centrum rozgałęzienia. Do grupy hydroksylowej przy węglu C-2 przyłączona jest wiązaniem (1→2) glukoza' (terminalna), a do grupy hydroksylowej przy węglu C-4 kolejna cząsteczka glukozy, do której z kolei wiązaniem (1→2) przyłączona jest terminalna ksyloza (rys. 43).

Wstępna analiza chromatograficzna produktów hydrolizy gazowym chlorowodorem saponozydu B w celu identyfikacji aglikonu nie dała rezultatów ze względu na ograniczoną liczbę wzorców (zob. rozdział IV, p. 4.2.1, tab. 4). Wobec tego przeprowadzono pełną hydrolizę kwaśną metanolowym roztworem chlorowodoru. Z hydrolizatu wyodrębniono aglikon, który, po oczyszczeniu na kolumnie i przekrystalizowaniu, poddano analizie fizykochemicznej i spektralnej (zob. rozdział IV, p. 4.2.2.1 i 5.2).

Masa cząsteczkowa aglikonu, otrzymanego po hydrolizie kwaśnej saponozydu B, ustalona techniką EIMS wynosi 458, skręcalność $[\alpha]_D +50^\circ$, a temperatura topnienia 230-234 °C. W widmie w podczerwieni stwierdzono m.in. pasma absorbcyjne wskazujące na obecność grup hydroksylowych (3450 cm^{-1}), metylowych (1468, 1374 cm^{-1}) oraz wiązania podwójnego (1628 cm^{-1}) - rys. 68.

Piki fragmentacji masowej *retro* Dielsa-Aldera przy m/z 219, 250, 440 (rys.69) sugerowały szkielet olean-12-enowy z dwoma podstawnikami hydroksylowymi w pierścieniach D i E [246]. Obecność wiązania podwójnego w pozycji Δ^{12} potwierdził sygnał protonu olefinowego w pozycji C-12 w widmie ^1H NMR (rys. 70) przy δ 5.31 (szeroki triplet) oraz przesunięcia sygnałów węgli C-12 i C-13: odpowiednio 122.6 i 142.9 ppm (^{13}C NMR - rys. 71).

Na widmie ^1H NMR zaobserwowano ponadto sygnały protonów H: w pozycji C-3 α przy 3.3 ppm, C-16 β przy 4.04 ppm, C-28 (dublety 3.20 i 3,24 J=5 Hz) oraz protonów siedmiu grup metylowych w zakresie 0.78-1.33 ppm.

W widmie ^{13}C NMR zwracają uwagę trzy sygnały przypisane węglom C-3, C-16 i C-28, których przesunięcia (odpowiednio δ 78.9, 74.9, 70.7 ppm) wskazują na

podstawienie grupami hydroksylowymi. Ponadto, w przypadku podstawnika przy węglu C-16, przesunięcie takie sugeruje konfigurację aksjalną, w przeciwnym przypadku bowiem sygnał ten pojawia się przy ok. 67 ppm (np. longispinogenina [168]).

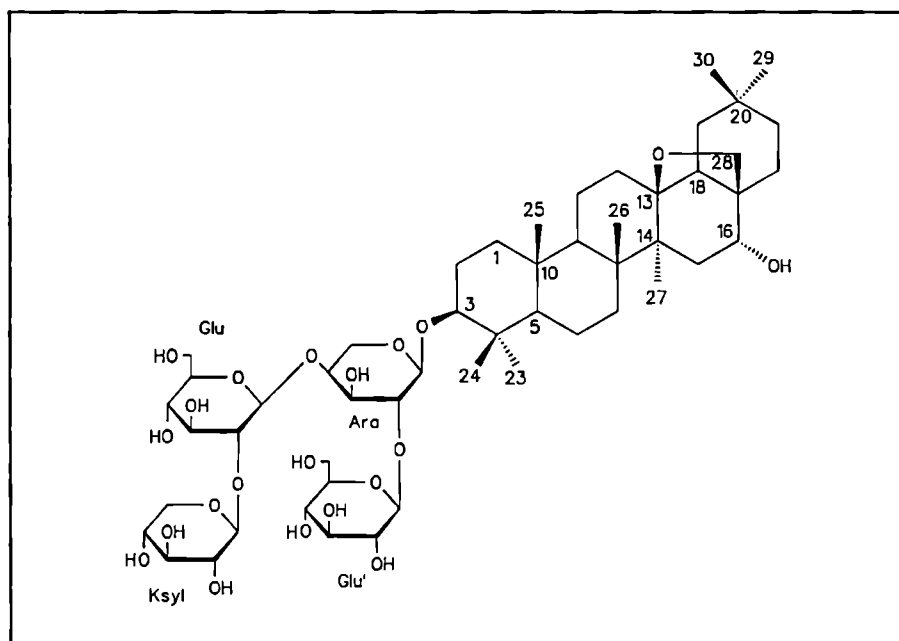
Powyższe dane okazały się zgodne z literaturowymi dla prymulageniny A [168,47,246].

Porównanie widm IR, ^1H i ^{13}C NMR otrzymanego aglikonu oraz saponozydu B wskazywało jednak, iż nie jest to oryginalna genina lecz artefakt. Z wielu doniesień wiadomo, że w warunkach prowadzenia hydrolizy kwaśnej prymulagenina tworzy się wtórnie z protoprymulageniny na skutek rozerwania mało trwałego mostka $13\beta,28$ -epoksydowego [246,137,285,27,138]. Fakt ten potwierdza m.in. brak w widmie ^{13}C NMR saponozydu B sygnałów węgla przy wiązaniu podwójnym, pojawienie się w obrazie IR pasma przy 890 cm^{-1} przypisywanego mostkowi eterowemu, brak sygnału protonu olefinowego (tzw. H-12) w pozycji C-12.

Porównanie przesunięć węgli saponozydu B przypisanych aglikonowi z danymi literaturowymi dla protoprymulageniny A wykazuje dużą zgodność [168,246,27,142]. Jak wynika z porównania widm ^{13}C NMR geniny i glikozydu łańcuch cukrowy przyłączony jest w pozycji C-3, o czym świadczy przesunięcie sygnału tego węgla o 12.4 ppm w kierunku niższego pola (zob. rozdział IV, p. 5.2, tab. 6).

Reasumując można stwierdzić, iż saponozyd B jest tetrasacharydem protoprymulageniny A. Uzyskane wyniki badań i analiz spektralnych pozwalają zaproponować jego strukturę jako:

$3\beta\text{-O-}[\beta\text{-D-ksylopiranozylo-(1}\rightarrow\text{2)-O-}\beta\text{-D-glukopiranozylo-(1}\rightarrow\text{4)]-}$
 $[\text{O-}\beta\text{-D-glukopiranozylo-(1}\rightarrow\text{2)]-O-\alpha\text{-L-arabinopiranozyd } 16\alpha\text{-hydroksy-}$
 $13\beta,28\text{-epoksy-oleananu (rys. 43)}$



Rys. 43 Saponozyd B - proponowana struktura.

Wyizolowany z części podziemnych *Lysimachia vulgaris*, obok saponozydu B, Saponozyd A (50 mg) otrzymano, po przekrystalizowaniu z nasyconego wodą butanolu, w postaci igieł (t.top. 220–223 °C, skręcalność $[\alpha]_D = -57^\circ$).

W oparciu o wyniki analizy masowej LSIMS (m/z 1382) oraz ^{13}C NMR ustalono wzór sumaryczny $\text{C}_{65}\text{H}_{105}\text{O}_{31}$.

W celu zidentyfikowania aglikonu oraz cukrów budujących glikon, saponozyd A poddano hydrolizie kwaśnej gazowym chlorowodorem na płytce chromatograficznej. Kochromatografia z wzorcami wykazała, iż część cukrowa składa się z glukozy, ramnozy i arabinozy, a geniną jest hederagenina.

W widmie ^{13}C NMR (125.77 MHz, pirydyna-*d*₅) zaobserwowano sześć sygnałów anomerycznych węgli cukrów, które przypisano trzem cząsteczkom glukozy (104.4, 104.8, 95.7 ppm), dwóm cząsteczkom ramnozy (102.7, 101.7 ppm) i jednej arabinozie (106.7 ppm). Wartości przesunięć wskazywały, że wszystkie monosacharydy znajdują się w formie piranozy. Sygnały pozostałych węgli cukrów, jak również 30 węgli pentacyklicznego aglikonu ustalono w oparciu o dane literaturowe dla związków o zbliżonej strukturze [168,315,275,131,238,173,295,168,250,262,182,254]. Zaobserwowano m.in. sygnały charakterystyczne dla nienasyconego wiązania pomiędzy węglami C–12 (123.0 ppm) i C–13 (144.2 ppm) hederageniny, sygnały węgli sześciu grup metylowych (zob. rozdział IV: p. 5.3, tab. 7; rys. 79) oraz węgla C–23, którego sygnał przesunięty jest w kierunku niższego pola ze względu na obecność w tym położeniu podstawnika hydroksylowego.

Dzięki technice DEPT określono liczbę węgli metylowych, metylenowych, metinowych i czwartorzędowych (zob. rozdział IV: p. 5.3, tab. 7; rys. 80).

Brak aktywności hemolitycznej pośrednio sugerował, iż saponozyd A może być bidesmozydem. Na widmie w podczerwieni obok pasma drgań grup hydroksylowych przy 3382 cm^{-1} obecne było także pasmo charakterystyczne dla estrów – 1733 cm^{-1} .

Na przyłączenie reszt cukrowych w dwóch różnych pozycjach aglikonu wskazywały charakterystyczne przesunięcia sygnałów węgli glikozydu w porównaniu z wolną hederageniną (^{13}C NMR) [168]. I tak, pojawienie się sygnału węgla C–3 w niższym polu przy δ 81.1 ppm (73.7 dla hederageniny), sugerowało glikozydację w tym położeniu, natomiast przesunięcia ku wyższemu polu sygnału karbonyłowego węgla C–28 do δ 176.7 (odp.węgiel hederageniny 180.1 [135]), estrowo związany drugi łańcuch.

Co więcej, przesunięcie sygnału węgla C–1 jednej z glukozy (95.7 ppm) wskazywało, iż to ona bezpośrednio wiąże się z grupą karboksylową hederageniny.

W widmie masowym (LSIMS–jony ujemne), obok jonu molekularnego m/z 1381 [M–H], zaobserwowano piki fragmentacyjne odpowiadające utracie kolejno cząsteczki ramnozy (m/z 1236), glukozy (m/z 1074) i glukozy (m/z 912). Znaczna intensywność jonu przy m/z 912 (będącego zarazem pikiem podstawowym) wskazywała, iż ta trójcukrowa reszta przyłączona jest do aglikonu wiązaniem estrowym [117]. Z kolei sekwencyjny charakter i kolejność odszczepiania monosacharydów sugerowały prosty łańcuch, którego terminalnym ogniwem jest ramnoza, a ponadto potwierdzały po raz kolejny, iż

cukrem bezpośrednio połączonym w pozycji C–28 jest glukoza.

W celu zweryfikowania założonej bidesmozydowej struktury związku oraz ustalenia, które monosacharydy tworzą poszczególne łańcuchy, saponozyd A poddano hydrolizie alkalicznej (zob. rozdział IV: p. 4.2.5). W fazie wodnej, zawierającej odszczepiony estrowo związany łańcuch cukrowy (określony jako oligosacharyd A), zidentyfikowano po hydrolizie kwaśnej (TLC) glukozę i ramnozę. Metylacja metodą wg. Hakomori i analiza zmetylowanych cukrów pozwoliła potwierdzić obecność terminalnej ramnozy (zob. rozdział IV: p.4.2.5.2.1 i p. 5.3).

Otrzymaną po oderwaniu estrowo związanego łańcucha prosapogeninę saponozydu A, po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej poddano dalszej analizie (t.top. 252–255 °C, $[\alpha]_D = +18^\circ$, wzór sumaryczny $C_{47}H_{74}O_{17}$, LSIMS m/z 935 $[M+Na]^+$).

W widmie w podczerwieni zwracał uwagę brak pasma absorpcji estrowej, obserwowany w przypadku saponozydu A. Obecny natomiast był silny sygnał pochodzący od wolnej grupy karboksylowej (1693 cm^{-1}) (zob. rys. 81).

W wyniku hydrolizy kwaśnej prosapogeniny saponozydu A w części cukrowej zidentyfikowano arabinozę, glukozę i ramnozę. Anomerycznym protonom tych cukrów przypisano w widmie ^1H NMR odpowiednio sygnały przy δ ppm: 4.48, 4.43, 5.21. Wartości stałych sprzężenia spinowego (zob. rozdział IV: p. 5.3; rys. 83) wskazywały na konfigurację β dla glukozy, natomiast α dla pozostałych [5,58].

Ze względu na minimalną ilość otrzymanego związku nie udało się wykonać widma ^{13}C NMR. Celem wstępnego ustalenia sekwencji monosacharydów tworzących glikon, prosapogeninę saponozydu A poddano więc metylacji metodą wg. Hakomori, a następnie zmetylowany produkt hydrolizowano gazowym chlorowodorem na płytce chromatograficznej (zob. rozdział IV: p. 4.2.5.1.2). Porównanie wartości R_f zmetylowanych cukrów [287], wskazywało na obecność 2,3,4,6–tetra–O–metyloglukozy, 2,3,4–tri–O–metyloramnozy oraz 4–metyloarabinozy, a więc na rozgałęzienie łańcucha. Centrum tego rozgałęzienia stanowi arabinoza bezpośrednio związana z aglikonem.

Potwierdzenie powyższych danych uzyskano analizując obraz fragmentacji masowej saponozydu A. Zidentyfikowano bowiem piki fragmentacyjne odpowiadające odszczepieniu od prosapogeniny A (m/z 912) jednocześnie ramnozy (m/z 766) i glukozy (m/z 750). Nie zaobserwowano natomiast sygnału wskazującego na utratę kolejno obu tych cukrów (zob. rys. 73).

W widmie masowym saponozydu A można ponadto zauważyć pik jonu geniny przy m/z 471 $[M-H]$ co odpowiada masie hederageniny [47].

W widmie magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H (metanol– d_4) bidesmozydu (zob. rys. 74), obok protonów anomerycznych cukrów zauważyć można kilka sygnałów charakterystycznych dla aglikonu. Sześć singletów przy δ (ppm) 1.16, 0.97, 0.94, 0.90, 0.79 i 0.70 pochodzi od protonów grup metylowych, dwa dublety przy δ 3.61 i 3.63 od H–3 α , nieostry singlet przy δ 4.62 można przypisać protonowi grupy hydroksylowej przy węglu C–23, a przy δ 5.24 obecny jest sygnał protonu olefinowego (triplet), charakterystyczny

dla pentacyklicznych triterpenów o wiązaniu podwójnym Δ^{12} [182,117,6,194].

Porównanie wartości przesunięć sygnałów protonów anomerycznych cukrów w widmach prosapogeniny saponozydu A i saponozydu A pozwoliło dla tego ostatniego przypisać monosacharydom tworzącym łańcuch przy węglu C-28 następujące dublety: δ ppm 5.34 ($J=9.9$ Hz, glukoza' związana estrowo), 4.83 ($J=1.4$ Hz, ramnoza' terminalna), 4.39 ($J=7.6$ Hz, glukoza'' wewnętrzna).

Natomiast sygnały H-1 arabinozy, glukozy i ramnozy, budujących drugi, połączony w pozycji C-3 hederageniny, łańcuch zaobserwowano odpowiednio przy δ ppm: 4.48 (d, $J=6.2$ Hz), 4.43 (d, $J=7.6$ Hz) i 5.21 (d, $J=1.4$ Hz). Wartości stałych sprzężenia spinowego J potwierdzają konfigurację α dla arabinozy i obu ramnoz (w przypadku tej pierwszej niska wartość J sugerowałaby typ β , odwrotnie niż dla ramnoz) oraz β dla cząsteczek glukozy. Ponadto, obecność dwóch ramnoz dodatkowo potwierdzają dublety przy δ 1.26 i 1.23 ($J=6.2$ Hz) pochodzące od protonów grup CH_3 .

W celu dokładniejszego przypisania sygnałów dla wszystkich protonów monosacharydów i obserwacji pozycji wiązań między nimi wykonano widma dwuwymiarowe HOHAHA, $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY oraz NOESY (zob. rys. 76, 77, 78). Ze względów technicznych (czas analizy, wielkość próbki) uzyskane widma nie pozwalają na absolutne przypisanie wszystkich sygnałów. Pomimo to, uzyskano kilka informacji istotnych dla wyjaśnienia struktury związku A.

W widmie NOESY zaobserwowano bowiem sprzężenia między H-1 arabinozy i H-3 aglikonu (tzn. proton w pozycji C-3), a także między H-2 arabinozy i H-1 ramnozy oraz H-3 arabinozy i H-1 glukozy co wskazywało na pozycję wiązań w obrębie łańcucha przy C-3 hederageniny (sygnały protonów H-2 i H-3 arabinozy ustalono w oparciu o HOHAHA i $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY).

Powyższe dane potwierdzono również za pomocą widma ^{13}C NMR. Pozycje wiązań między poszczególnymi monosacharydami ustalano porównując wartości przesunięć charakterystyczne dla wewnątrzglikozydowych połączeń [5]. Przesunięcie w kierunku niższego pola sygnałów węgla C-2 i C-3 arabinozy, o odpowiednio 3.3 ppm i 5.8 ppmw porównaniu do wartości literaturowych (wg.[117] odp.73.0,74.5), stanowiło dalsze potwierdzenie glikozydacji w tych pozycjach.

Z kolei w przypadku cukrów tworzących łańcuch estrowy, zaobserwowano charakterystyczne przesunięcie sygnału węgla C-6 glukozy' bezpośrednio związanej z grupą karboksylową geniny ku niższemu polu (do 69.8 ppm) w porównaniu z danymi literaturowymi wolnej glukopiranozy [120,184,193,305,173], przy jednoczesnym przesunięciu sygnału węgla C-5 ku wyższemu polu (78.1 ppm), co wskazuje na połączenie poprzez terminalną grupę hydroksylową cząsteczki glukozy'.

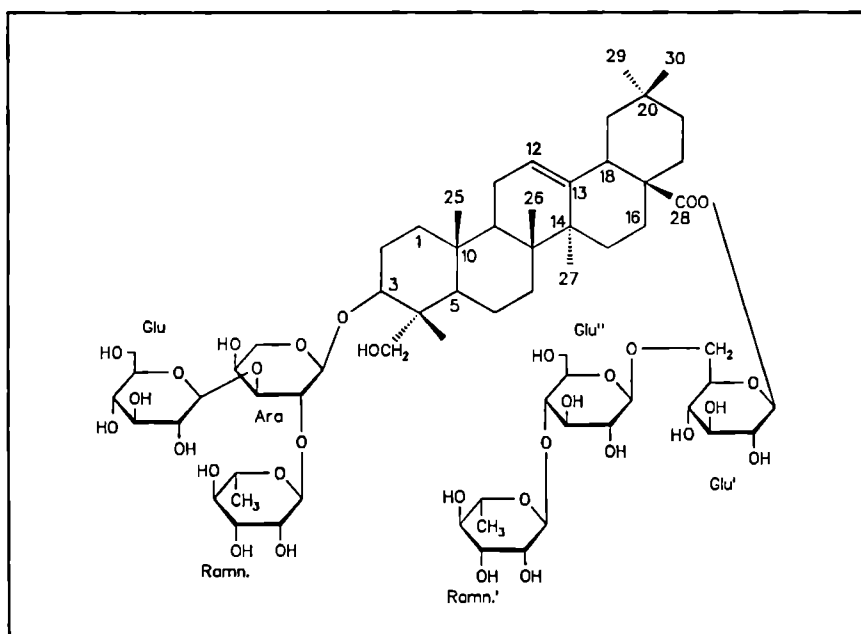
Ewentualność glikozydacji w położeniu C-2, C-3 lub C-4 wyeliminowano dzięki analizie porównawczej danych ^{13}C NMR dla tak związanego cukru [226,315,262,254,61, 173,319]. Zazwyczaj zablokowanie grupy OH w pozycji C-2 powoduje przesunięcie sygnału z ok. 75.3 aż do 83-84 ppm. Jednak w przypadku gdy cukier ten połączony jest estrowo w pozycji C-28 aglikonu, sygnał węgla C-2 monosacharydu jest, nawet przy

wolnej grupie OH, przesunięty z tego względu do ok. 73.9-74.1 ppm. Stąd też, w przypadku zglikozydowania w tej pozycji obserwuje się przesunięcie jedynie do 75.9-76.3 ppm, przy jednoczesnym charakterystycznym przesunięciu C-3 do 79.5 ppm. Z kolei połączenie glukozy z kolejnym cukrem poprzez grupę hydroksylową przy węglu C-3, pociąga za sobą pojawienie się sygnału tego węgla w niższym polu (przesunięcie z ok. 78.5 do 87.4 ppm).

Brak w/w sygnałów w widmie ^{13}C NMR saponozydu A stanowił podstawę przyjęcia koncepcji, iż druga z cząsteczek glukozy w łańcuchu estrowym wiąże się z pierwszą poprzez grupę hydroksylową przy węglu C-6 (zob. rys. 44). Z kolei po analizie sygnałów pozostałych monosacharydów wchodzących w skład łańcucha ustalono, iż terminalna ramnoza' związana jest glikozydowo z wewnętrzną glukozą" w pozycji C-4. Świadczyły o tym przesunięcia sygnału węgla C-4 glukozy" (78.4) o 8.4 ppm ku niższemu polu, a węgli C-3 (77.2) i C-5 (70.4) o odp. 1.0 i 7.4 ppm ku wyższemu polu [295,238,250,262, 135,182,254].

Uwzględniając wszystkie dane uzyskane dzięki przeprowadzonym badaniom oraz analizom fizykochemicznym i spektralnym, można zaproponować, iż wyizolowany z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* saponozyd A, będący bidesmozydem hederageniny jest:

28-O-[α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glukopiranozylo]-estrem 3-O-[[β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 3)]-[O- α -L-ramnopiranozylo-(1 \rightarrow 2)]]-O- α -L-arabinopiranozydu kwasu 3 β ,23-dihydroksy-olean-12-en-28-karboksylowego.



Rys. 44 Saponozyd A - proponowana struktura.

Liczne doniesienia w literaturze, potwierdzające szerokie spektrum aktywności biologicznej związków o zbliżonych strukturach, stały się przesłanką do podjęcia wstępnych badań farmakologicznych *in vitro* w kierunku przeżywalności komórek nowotworowych oraz działania fungistatycznego [203,202,148,228,125,44,239,163,229,206,135,117,210]. Do badań tych wytypowano barwnik BQ oraz saponozyd B.

Oceniając wyniki przeprowadzonych testów (zob. rozdział IV: p. 6, tab. 8, 9; rys. 84) można stwierdzić, iż w przebadanym zakresie stężeń fungistatycznie działał jedynie barwnik BQ. Hamował on namnażanie komórek *Candida albicans* wszystkich (30) badanych szczepów wyhodowanych z materiału pobranego od pacjentów, w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Minimalne stężenie hamujące dla aktualnie stosowanych leków grzybobójczych jak nystatyna czy ketokonazol waha się w granicach 1–2 $\mu\text{g/ml}$ [65].

Badania na komórkach nowotworowych wykazały natomiast, iż oba testowane związki są aktywne, przy czym saponozyd jest bardziej cytotoksyczny niż benzochinon. W przypadku tego pierwszego najwrażliwsze okazały się komórki ludzkiej melanomy. Z kolei ich wyjątkowa oporność na działanie benzochinonu, przy równoczesnej toksyczności tego związku dla komórek melanomy mysiej, wskazują na odmienny mechanizm działania.

1.1 Podsumowanie

W podsumowaniu można stwierdzić, iż przeprowadzone badania fitochemiczne nad saponozydami i barwnikami chinonowymi tejże pospolitej pozwoliły na poszerzenie wiedzy o tym interesującym z leczniczego punktu widzenia gatunku.

W oparciu o porównawczą analizę chromatograficzną wyciągów z poszczególnych części morfotycznych rośliny ustalono, iż obie grupy związków dominują w częściach podziemnych. Skład kompleksu saponozydów zmienia się w miarę dojrzewania fenologicznego rośliny, najbogatszy jest w fazie kwitnienia.

Z zespołu glikozydów triterpenowych wyizolowano dwa dominujące ilościowo, których wpływ na wartość leczniczą surowca być może nie jest bez znaczenia. Ich budowę zaproponowano w oparciu o omówione powyżej wyniki. Oba związki są pochodnymi oleananu lecz każdy przedstawia odmienny typ glikozydu.

Interesującym wynikiem jest, iż bidesmozydowy saponozyd A jest glikozydem hederageniny, aglikonu jak dotąd nie zidentyfikowanego wśród wyizolowanych z *Primulaceae* triterpenowych pochodnych. Co więcej, związek ten, jak wskazują dostępne dane, jest nową strukturą, dotychczas nie opisaną. Znamienne jest, że obok saponozydu A, także saponozyd C jest pochodną hederageniny (zob. rozdział IV, p. 4.2.1, tab.4), być może jest to jego monodesmozydowy prekursor.

Z kolei saponozyd B można zaliczyć do pochodnych jednego z trzech typów strukturalnych genin zidentyfikowanych dotychczas w gatunkach Pierwiosnkowatych (zob. rozdział I, p. 1.8, str. 40), a mianowicie układu z mostkiem $13\beta,28$ -epoksydowym. Jest to kolejny dowód potwierdzający hipotezę, iż glikozydy o takiej budowie są charakterystyczne dla *Primulaceae*.

Mimo, iż nie jest to całkowicie nowa struktura, opisano ją jak dotąd jedynie w dwóch gatunkach, zresztą należących do rzędu *Primulales*, a mianowicie *Lysimachia sikokiana* (lysikokianozyd 1 [Kohda, 1989]) oraz *Myrsine australis* (saponozyd 1 [Bloor, Qui, 1984]).

Potwierdzona w testach *in vitro* wyraźna aktywność cytotoksyczna saponozydu B stanowi przesłankę, iż wśród glikozydów triterpenowych warto poszukiwać potencjalnych czynników przeciwnowotworowych.

Wyizolowany obok saponozydów barwnik BQ, należy do grupy aktywnych biologicznie benzochinonów alkilowych i jest praktycznie identyczny z embeliną. Jego znaczna zawartość w surowcu (1.2% surowej frakcji chinonowej), jak również stosunkowo mało skomplikowany proces izolacji, w kontekście interesujących własności farmakologicznych (zob. p. 2.4) stwarza korzystne warunki do uwzględnienia możliwości wykorzystania tojeści jako wydajnego i łatwo dostępnego źródła pozyskiwania tego barwnika.

W rodzinie *Primulaceae* nie określono dotychczas struktury innych prócz priminy benzochinonów. Obecność embeliny i jej homologów, może potwierdzać sugerowany przez Hegnauera i innych autorów chemotaksonomiczny dowód bliskiego pokrewieństwa botanicznego z rodziną *Myrsinaceae*.

Warto zaznaczyć, iż homolog 2,5-dihydroksi-*p*-benzochinonu o piętnastowęglowym łańcuchu w pozycji C-3 zidentyfikowano dotychczas zaledwie w pięciu gatunkach należących do rodzin *Connaraceae* i *Myrsinaceae* (*Connarus monocarpus*) [129], *Maesa lanceolata* [177], *Ardisia corniculatum*, *Rapanca variabilis* i *Tapeino sperma pseudojambosa* [21]).

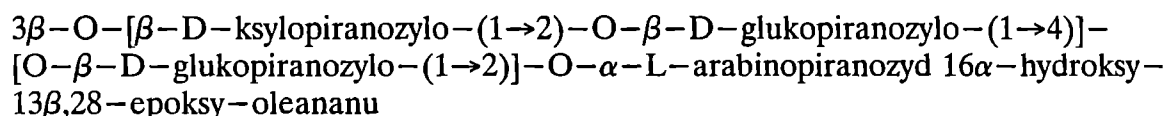
2 Wnioski

1. Przeprowadzone badania potwierdziły, iż krajowy gatunek tojeści *Lysimachia vulgaris* L. (*Primulaceae*) zawiera barwniki chinonowe oraz saponozydy triterpenowe.
2. Izolowany z wyciągu chloroformowego z części podziemnych tojeści pospolitej pomarańczowy barwnik chinonowy oznaczony symbolem BQ jest mieszaniną trzech homologów 2,5-dihydroksy-3-alkilo-*p*-benzochinonu, o alkilowym łańcuchu bocznym zbudowanym z 15, 13 i 11 atomów węgla.

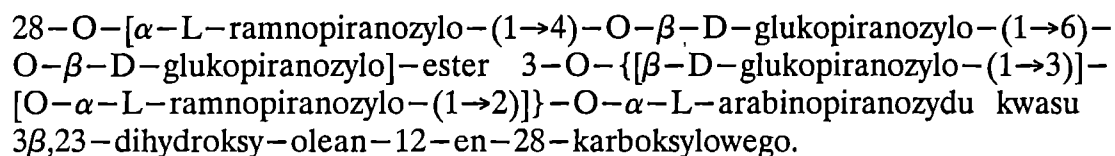
Ustalono, że związkiem dominującym w kompleksie jest embelina (C₁₁) - 73%, udział procentowy pozostałych wynosi 26% (C₁₃) i <1% (C₁₅).

Wszystkie trzy struktury zidentyfikowano w rodzinie *Primulaceae* po raz pierwszy.

3. Na podstawie przeprowadzonych badań i wyników analiz spektralnych zaproponowano budowę chemiczną dwóch wyizolowanych, dominujących w tojeści saponozydów triterpenowych tj. związku A i B.
4. Saponozyd B jest monodesmozydem protoprymulageniny A, a uzyskane wyniki badań uzasadniają przyjęcie jego pełnej struktury jako:



5. Saponozyd A jest bidesmozydowym glikozydem pochodnym hederageniny. Uzyskane dane eksperymentalne pozwalają zaproponować jego budowę jako:



Glikozydów hederageniny w rodzinie *Primulaceae* jak dotąd nie opisano. Obok saponozydu A również związek C posiada ten aglikon.

6. W badaniach aktywności biologicznej wykazano, iż barwnik BQ działa fungistatycznie wobec szczepów *Candida albicans*.
7. Wyniki testów *in vitro* na doświadczalnych liniach nowotworowych wskazały, że barwnik BQ i saponozyd B charakteryzują się wyraźną aktywnością cytotoksyczną. Najbardziej wrażliwe na saponozyd były komórki ludzkiej melanomy.

IV Badania własne

1 Aparatura i metody

1.1 Testy jakościowe

- saponozydy:
 - odczynnik Liebermanna–Burcharda (bezwodnik kwasu octowego kwas siarkowy stęż. w stosunku 1:1, w etanolu)
 - odczynnik Brieskorna–Brinera (70% roztwór kwasu chlorosulfonowego w butyrolaktonie)
- benzochinony:
 - 1n roztwór wodorotlenku sodowego
 - 1%metanolowy roztwór chlorku żelaza

1.2 Metody chromatograficzne

1.2.1 Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

płytki gotowe:

- pokryte żelem krzemionkowym, grubość warstwy 0.2 mm : *DC–Alufolien Kieselgel 60* (Merck) (saponozydy, sapogeniny, cukry)
- pokryte żelem krzemionkowym silanizowanym, grubość warstwy 0.25 mm : *DC–Fertigplatten Kieselgel 60 silanisiert* firmy Merck (benzochinony)
- pokryte żelem krzemionkowym, grubość warstwy 0.2 mm : *DC–Alufolien Kieselgel 60* (Merck), zwykle oraz impregnowane przez zanurzenie na 1 minutę w 3% kwasie szczawiowym [200] (benzochinony)

odczynniki wywołujące:

- kwas siarkowy stęż. (saponozydy)
- 10% zawiesina odwłóknionej krwi wołowej w buforze Sörensena (saponozydy)
- 1% n–butanolowy roztwór ftalanu aniliny (cukry)

fazy ruchome:

- chloroform–metanol–woda (23:12:2) S₁
- chloroform–metanol–woda (13: 8:2) S₂
- chloroform–metanol–woda (90:35:6) S₃
- chloroform–metanol–woda (8:7:1) S₄

| | | |
|----------------------------------|-----------|-----------------|
| – chloroform–metanol | (25:1) | S ₅ |
| – chloroform–octan etylu | (4:1) | S ₆ |
| – benzen–aceton | (4:2) | S ₇ |
| – benzen–aceton | (8:2) | S ₈ |
| – aceton | | S ₉ |
| – 7% etanol | | S ₁₀ |
| – benzen–octan etylu | (10:2) | S ₁₁ |
| – chloroform–kwas octowy–woda | (6:7:1) | S ₁₂ |
| – chloroform–metanol–aceton–woda | (3:3:3:1) | S ₁₃ |
| – eter diizopropylowy–metanol | (5:1) | S ₁₄ |

1.2.2 Chromatografia kolumnowa (CC)

Warunki analizy:

● saponozydów i ich pochodnych

wypełnienie:

- żel krzemionkowy: *Kieselgel 60 (230–400 mesh ASTM)* firmy Merck
- tlenek glinu: *MN-Aluminiumoxid, neutral; Brockmann-Activität Number I* firmy Macherey Nagel Co.

faza ruchoma:

- | | | |
|---------------------------|-----------|-----------------|
| – chloroform–metanol–woda | (23:12:2) | S ₁ |
| – chloroform–metanol–woda | (8:7:1) | S ₄ |
| – chloroform–metanol | (25:1) | S ₅ |
| – benzen–aceton | (8:2) | S ₈ |
| – chloroform-metanol-woda | (2:6:2) | S ₁₅ |

● benzochinonów i ich pochodnych

wypełnienie:

- żel krzemionkowy silanizowany: *Kieselgel 60 H silanisiert* firmy Merck
- żel krzemionkowy: *Kieselgel 60 (230–400 mesh ASTM)* firmy Merck

faza ruchoma:

- | | | |
|-----------------|-------|-----------------|
| – benzen–aceton | (8:2) | S ₈ |
| – aceton | | S ₉ |
| – benzen | | S ₁₆ |

1.2.3 Chromatografia gazowa (GC)

Warunki analizy:

- octanów alditoli częściowo zmetylowanych cukrów

aparat:

Chromatograf N-504 (Mara-Elwro Wrocław) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym PJD

- kolumna szklana (0.4 x 150 cm) wypełniona Chromosorbem W pokrytym fazą stacjonarną HIEFF-3BP (1.5%)
- temperatura kolumny: 200 °C,
- temperatura dozownika i detektora: 250 °C
- szybkość przepływu azotu: 40 ml/min.
wodoru: 20 ml/min.
powietrza: 400 ml/min.
- zakres pomiarowy: 4×10^{-11} (A)
- integrator CI-100: szybkość przesuwu taśmy 0.6 cm/min

- benzochinonów

aparat:

Pay-Unicam 104 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym PJD

- kwarcowa kolumna kapilarna (0.053 x 1000 cm) pokryta fazą HP-5 (2.65 μ m)
- temperatura kolumny: 285 °C
- temperatura dozownika: 280 °C
- temperatura detektora: 300 °C
- szybkość przepływu helu: 6 ml/min.

- estrów metylowych kwasów tłuszczowych

aparat:

Chromatograf N-504 (Mera-Elwro Wrocław) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym PJD

- kolumna szklana (0.4 x 150 cm) wypełniona Chromosorbem W pokrytym fazą stacjonarną HIEFF-3BP (1.5%)
- temperatura kolumny: 190 °C,
- temperatura dozownika i detektora: 250 °C
- szybkość przepływu azotu: 40 ml/min.
wodoru: 20 ml/min.
powietrza: 400 ml/min.
- zakres pomiarowy: 4×10^{-11} (A)
- integrator CI-100: szybkość przesuwu taśmy 0.6 cm/min

1.3 Metody spektralne

- Widma w podczerwieni (IR) wykonywano na spektrofotometrze FTS–B/D firmy Digital (pochodne metylowa i acetylowa substancji BQ) oraz FTS–15B firmy DIGILAB (saponozydy, benzochinony) w tabletkach KBr

- Widma w nadfiolecie (UV) wykonywano na spektrometrze Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer, Lambda 12

- Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR):
aparat AMX 500 firmy Bruker: ^1H 500.13 MHz, ^{13}C 125.77 MHz (substancja BQ, aglikon saponozydu B, saponozyd A, prosapogenina saponozydu A)

aparat firmy Bruker: ^1H 200.13 MHz, ^{13}C 50 MHz (saponozyd B)

analizy wykonano wobec wzorca wewnętrznego TMS

- Widma masowe:
EIMS – aparat Finnigan MAT Incos 500, potencjał jonizacji 70 eV (substancja BQ)
– aparat Finnigan, potencjał jonizacji 70 eV (aglikon saponozydu B)

FAB–MS – aparat Finnigan MAT 95, energia jonizacji 13 kV, matryca glicerolowa, bombardowanie jonami cezu (saponozyd B)

LSIMS – aparat Spektrometr AMD–604, energia jonizacji 8 kV, matryca glicerolowa (saponozyd A, prosapogenina saponozydu A)

1.4 Inne metody

Temperatury topnienia (niekorygowane) oznaczano w aparacie Koflera firmy REICHERT (Austria), skręcalność właściwą mierzono przy użyciu polarymetru Polamat-A, firmy Carl Zeiss (Jena).

2 Wstępna analiza fitochemiczna surowca

2.1 Próby jakościowe

Przedmiotem badań była tojeść pospolita *Lysimachia vulgaris* L. Zbioru surowca dokonano ze stanowiska naturalnego w rejonie Kosocic, na obrzeżach Krakowa, w latach 1993-1994. Egzemplarz zielnikowy oraz próbki surowca zdeponowane są w Katedrze Farmakognozji Collegium Medicum UJ.

Podstawowe próby jakościowe na obecność saponozydów i chinonów przeprowadzono na wyciągach chloroformowym (1:10) i metanolowym (1:10) z wysuszonych części nadziemnych i podziemnych rośliny oraz na skrawkach surowca.

W reakcji z FeCl_3 czerwonopomarańczowy wyciąg chloroformowy zmieniał barwę na brunatną, a z roztworem NaOH na fioletową, co wskazywało na obecność połączeń fenolowych. Charakterystyczne zabarwienie wyciągu sugerowało chinonowy charakter barwników.

Pozytywne wyniki wykonanych na skrawkach surowca prób: pienienia i hemolizy, oraz reakcji z odczynnikami Liebermanna-Burcharda i Brieskorna-Brinera (na wyciągu metanolowym z części podziemnych, zabarwienie odpowiednio brunatnoczerwone przechodzące w niebieskie oraz czerwono-fioletowe) potwierdzały obecność saponozydów triterpenowych.

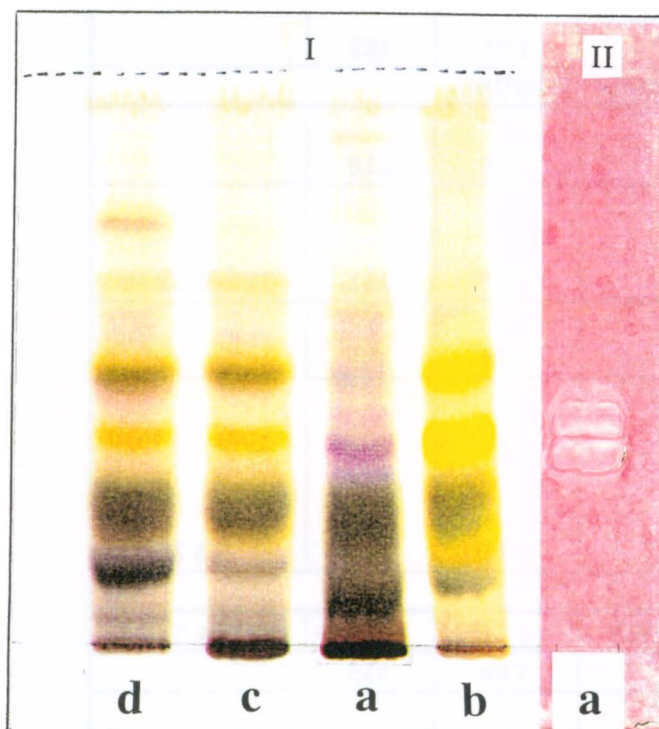
2.2 Badania chromatograficzne (TLC) poszczególnych części morfotycznych rośliny

Przy użyciu techniki TLC porównano chromatogramy wyciągów chloroformowych (1:10) i metanolowych (1:10) z wysuszonych i odpowiednio rozdrobnionych części morfotycznych rośliny tj. kwiatów, owoców, niekwitających części nadziemnych oraz części podziemnych, które stanowiły kłącza, korzenie i rozłogi. Wyciągi chloroformowe analizowano po rozwinięciu w fazie ruchomej S_{11} , natomiast metanolowe po rozwinięciu w fazie ruchomej S_1 i wywołaniu chromatogramu przez spryskanie stężonym kwasem siarkowym, a następnie ogrzanie w temp. 105°C przez 10 minut. Chromatogramy zostały przedstawione na rys. 45 i 46.

Wyniki analizy wskazywały, iż pomarańczowo-żółty barwnik obecny jest w owocach, kwiatach i częściach podziemnych, natomiast saponozydy przede wszystkim w tych ostatnich. Dalszym badaniom poddano więc jedynie części podziemne.



Rys. 45 Chromatogram wyciągów chloroformowych z następujących części morfotycznych *Lysimachia vulgaris* L.: a – kłącza wraz z korzeniami i rozłogami (zebrane w okresie kwitnienia), b – niekwitające ziele, c – owoc, d – kwiat
(płytki pokryte żelem krzemionkowym impregnowane 3% kwasem szczawiowym, faza ruchoma S_{11})



Rys. 46 Chromatogram wyciągów metanолоwych z następujących części morfotycznych *Lysimachia vulgaris* L.: a – kłącza wraz z korzeniami i rozłogami (zebrane w okresie kwitnienia), b – niekwitające ziele, c – owoc, d – kwiat
(płytki pokryte żelem krzemionkowym, faza ruchoma S_1 , wywołanie: I – stęż. kwas siarkowy, II – 10% zawiesina odwłóknionej krwi wołowej w buforze Sörensen)

2.3 Analiza porównawcza (TLC) części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. zebranych w różnych okresach wegetacji

W celu obserwacji ewentualnych różnic w nagromadzeniu się badanych związków w częściach podziemnych tojeści zależnie od terminu zbioru surowca przeprowadzono porównawczą analizę próbek z dwóch okresów wegetacyjnych: I. kwitnienia (przełom czerwca i lipca) i II. obumierania części nadziemnych (przełom września i października).

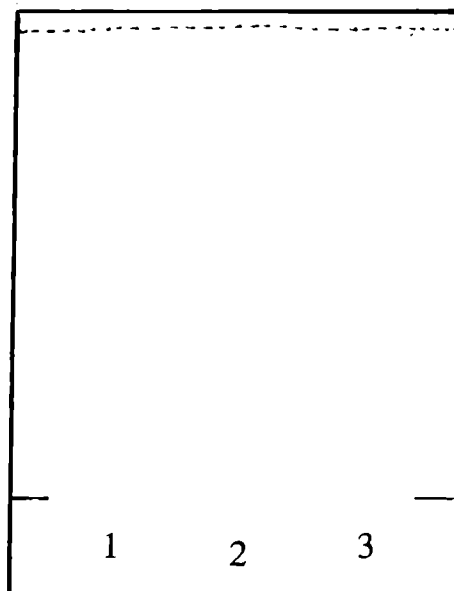
Po 10 g wysuszonych i sproszkowanych części podziemnych z poszczególnych okresów zbioru ekstrahowano wyczerpująco w aparacie Soxhleta kolejno chloroformem i metanolem. Po zagęszczeniu, próbki wyciągów analizowano metodą chromatografii cienkowiekowej.

2.3.1 Analiza wyciągu chloroformowego

Próbki zagęszczonych do sucha wyciągów chloroformowych I i II rozpuszczono w niewielkiej ilości chloroformu i analizowano techniką chromatografii cienkowiekowej na obecność benzochinonów, wobec wzorców embeliny i rapanonu.

Chromatogramy rozwijano w trzech fazach ruchomych: S_9 , S_{10} (na płytkach pokrytych żelem silanizowanym) i S_{11} (płytki pokryte żelem krzemionkowym i impregnowane kwasem szczawiovym). Obecność plamy substancji o wartości R_f odpowiadającej wzorcowej embelinie i rapanonowi zaobserwowano w próbkach z obu badanych okresów zbioru. Oznaczono ją symbolem BQ (tabela 1).

Natężenie barwy substancji BQ w obu przypadkach było porównywalne. Chromatogram próbki z okresu I, rozwinięty w fazie S_{11} przedstawia rys. 47.



Rys. 47 Chromatogram wyciągu chloroformowego z części podziemnych zebranych w fazie kwitnienia (1) oraz wzorców embeliny (2) i rapanonu (3).

Tabela 1. Wyniki porównawczej analizy chromatograficznej (TLC) wyciągu chloroformowego z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L., zebranych w dwóch różnych okresach wegetacyjnych, oraz substancji wzorcowych.

| Wartość R_f w fazie ruchomej | Substancja BQ | | Wzorce | |
|--------------------------------|---------------|------|----------|---------|
| | I | II | embelina | rapanon |
| S_9^* | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| S_{10}^* | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| S_{11}^{**} | 0.61 | 0.61 | 0.61 | 0.61 |

Fazy ruchome:

S_9 : aceton

S_{10} : 7% etanol

S_{11} : benzen-octan etylu (10:2)

- * - płytki pokryte żelalem krzemionkowym silanizowanym: zabarwienie plam - bordowe
 - ** - płytki pokryte żelalem krzemionkowym, impregnowane 3% kwasem szczawiowym: zabarwienie plam - pomarańczowożółte
- I - wyciąg chloroformowy z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. zebranych w okresie kwitnienia
 - II - wyciąg chloroformowy z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. zebranych w okresie obumierania części nadziemnych

Wyciąg chloroformowy przebadano również celem stwierdzenia obecności wolnych sapogenin. Chromatogramy rozwinięto w układach S_5 , S_6 , S_7 i wywołano przez spryskanie stężonym kwasem siarkowym i ogrzanie w temp. $105\text{ }^\circ\text{C}$ przez 10 minut.

Plam o zabarwieniu wskazującym na obecność sapogenin nie zaobserwowano.

2.3.2 Analiza wyciągu metanolowego

Próbki zagęszczonych wyciągów metanolowych z obu badanych okresów wegetacji rozpuszczono w niewielkiej ilości metanolu i poddano analizie techniką chromatografii cienkowsarstwowej. Wyciągi naniesiono pasmowo na płytki chromatograficzne pokryte żelazem krzemionkowym i rozwinięto w fazach S_1 , S_2 , S_3 . Rozwinięte chromatogramy suszono, spryskiwano stężonym kwasem siarkowym i ogrzewano w suszarce w temperaturze $105\text{ }^\circ\text{C}$ przez 10 minut.

Pod wpływem odczynnika wywołującego na chromatogramach uwidoczniły się m.in. pasma o fioletoworóżowym zabarwieniu charakterystycznym dla saponozydów triterpenowych, które w świetle UV fluoryzowały czerwonożółto. W próbce z okresu I stwierdzono obecność trzech związków saponozydowych, które oznaczono wg. malejącej polarności symbolami A, B i C. W próbce z okresu II nie zaobserwowano plamy związku A.

Chromatogram po rozwinięciu w fazie ruchomej S_1 wywołano dodatkowo zawiesiną erytrocytów. Przejaśnienia zaobserwowano dla plam o wartościach R_f odpowiadających saponozydom B i C co wskazywało, iż posiadają one aktywność hemolityczną. W badanych warunkach nie zaobserwowano hemolizy saponozydu A.

Wyniki analizy wskazywały, iż saponozyd B dominował w surowcu niezależnie od okresu zbioru (porównywalne natężenie barwy dla próbek I i II), C w obu przypadkach występował w śladowych ilościach, natomiast A obecny był jedynie w próbce zebranej w okresie kwitnienia (tab. 2).

Chromatogram wyciągu metanolowego z części podziemnych zebranych w okresie kwitnienia, wywołany stężonym kwasem siarkowym, a także zawiesiną erytrocytów przedstawia rys. 46. Wyniki analizy TLC przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Wyniki analizy chromatograficznej (TLC) wyciągu metanolowego z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. zebranych w dwóch okresach wegetacji.

| Saponozyd | Zabarwienie* | | hemo- liza | Wartość R_f w fazie ruchomej | | | | | |
|-----------|-------------------------|--------------------|---------------|--------------------------------|------|-------|------|-------|------|
| | w świetle widzialnym | w nadfiolecie | | S_1 | | S_2 | | S_3 | |
| | | | | I | II | I | II | I | II |
| A | fioletowe | czerwono- żółte | – | 0.08 | – | 0.12 | – | 0.05 | – |
| B | fioletowo- różowe | czerwono- żółte | +++ | 0.33 | 0.33 | 0.51 | 0.51 | 0.28 | 0.28 |
| C | fioletowo- różowe | czerwono- żółte | ++ | 0.41 | 0.41 | 0.60 | 0.60 | 0.35 | 0.35 |

Fazy ruchome:

S_1 : chloroform–metanol–woda (23:12:2)

S_2 : chloroform–metanol–woda (13:8:2)

S_3 : chloroform–metanol–woda (90:35:6)

Odczynniki wywołujące:

- stężony kwas siarkowy

- 10% zawiesina odwłóknionej krwi wołowej w buforze Sörensena

Hemoliza:

+++ bardzo silna

++ silna

– brak

* zabarwienie po spryskaniu stężonym kwasem siarkowym i ogrzaniu w temp. 105 °C przez 10 minut

I - wyciąg metanolowy z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. zebranych w okresie kwitnienia

II - wyciąg metanolowy z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. zebranych w okresie obumierania części nadziemnych

3 Izolacja saponozydów i benzochinonów

3.1 Materiał do izolacji

W oparciu o wyniki wstępnej analizy fitochemicznej surowca jako materiał do izolacji saponozydów i benzochinonów wybrano części podziemne tojeści pospolitej, zebrane w okresie kwitnienia tj. na przełomie czerwca i lipca (1993 i 1994 rok), ze stanowiska naturalnego opisanego w p. 2.1.

Surowiec suszono w temperaturze pokojowej, a następnie rozdrabniano i przesiewano przez sito o wielkości oczek 1.6 mm.

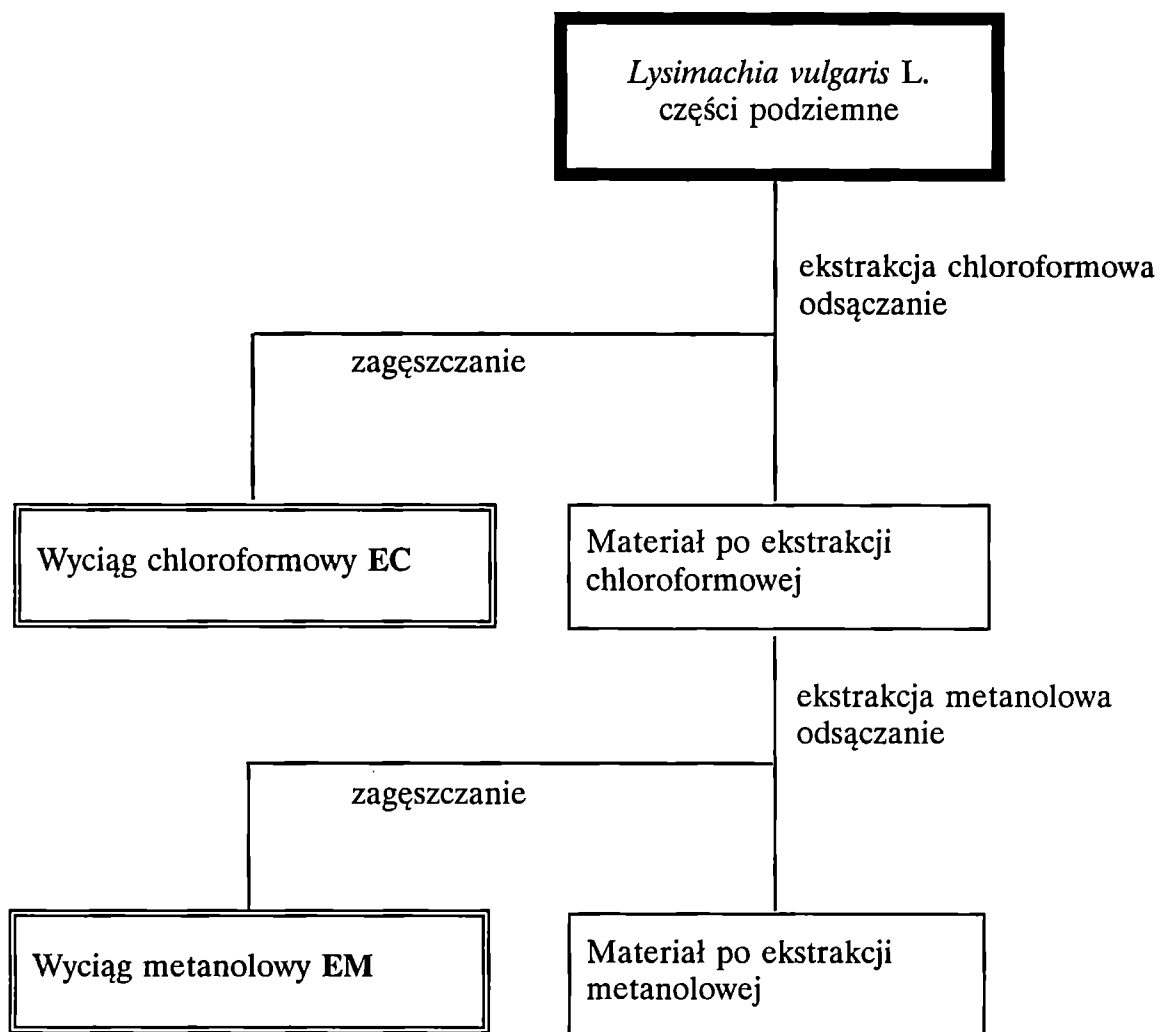
3.2 Ekstrakcja

3.2.1 Ekstrakcja chloroformowa

1012 g surowca umieszczono w kolbie okrągłodennej i ekstrahowano wyczerpująco chloroformem na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Wyciąg chloroformowy (ok. 10 l) zagęszczono w wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. ok 40 °C, otrzymując 12.7 g czerwono-pomarańczowego ekstraktu, który oznaczono symbolem EC. (rys. 48)

3.2.2 Ekstrakcja metanolowa

Surowiec po ekstrakcji chloroformowej wysuszono w temperaturze pokojowej, a następnie poddano czterokrotnej ekstrakcji metanolem. Ekstrakcję prowadzono na wrzącej łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną, zużywając ogółem 10 l rozpuszczalnika. Połączone wyciągi metanolowe zagęszczono w wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 117 g brunatnego ekstraktu o syropowatej konsystencji. Oznaczono go symbolem EM. (rys. 48)



Rys. 48 Schemat ekstrakcji części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L.

3.3 Chromatografia kolumnowa

3.3.1 Rozdział chromatograficzny (CC) benzochinonów

Zagęszczony ekstrakt chloroformowy (EC) rozpuszczono w heksanie i naniesiono na kolumnę wypełnioną żelą krzemionkowym silanizowanym, którą przemywano kolejno heksanem, mieszaniną heksan–benzen i benzenem.

Zebrane frakcje (150) kontrolowano chromatograficznie (TLC : płytki pokryte żelą krzemionkowym i impregnowane kwasem szczawiowym, faza ruchoma S_{11}). Jednorodne chromatograficznie frakcje połączono i przekrystalizowano kilkakrotnie z benzenu uzyskując ok. 8 g pomarańczowej substancji oznaczonej symbolem BQ.

3.3.2 Rozdział chromatograficzny (CC) saponozydów

3.3.2.1 Etap I - wstępne oczyszczanie

Wyciąg metanolowy z surowca (EM) osadzono na żelu krzemionkowym i naniesiono na kolumnę (30 x 10 cm) wypełnioną żelą krzemionkowym zawieszonym w chloroformie. Kolumnę przemywano kolejno chloroformem, chloroformem ze wzrastającym gradientem metanolu (5, 10, 15, 30, 50%), a następnie metanolem. Ogółem zebrano 250 frakcji, po ok. 60 cm³ każda. Frakcje jednorodne chromatograficznie (TLC, faza S_1) łączono i zagęszczano do sucha.

Do dalszych badań użyto frakcje, w których po wywołaniu (stęż. H_2SO_4 + ogrzewanie w temp. 105 °C przez 10 minut) stwierdzono obecność plam o fioletoworóżowym zabarwieniu względnie pozytywny wynik testu hemolitycznego.

Wyniki przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Wyniki analizy chromatograficznej (TLC) frakcji zebranych z kolumny w trakcie oczyszczania wyciągu metanolowego z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. w etapie I.

| <i>Połączone frakcje</i> | <i>Zabarwienie*</i> | <i>Hemoliza</i> | <i>Wartość R_f w fazie ruchomej S_1</i> | <i>Symbol</i> |
|--------------------------|--|-----------------|---|---------------|
| 1–112 | ⊖ | – | (0.95-0.78) | |
| 113–120 | brunatno–fioletowe | + | 0.75 | D |
| 121–140 | brunatno–fioletowe fioletowo–różowe fioletowo–różowe | + ++ +++ | 0.75 0.41 0.33 | D C B |
| 141–175 | fioletowo–różowe fioletowo–różowe | ++ +++ | 0.41 0.33 | C B |
| 176–203 | fioletowo–różowe | +++ | 0.33 | B |
| 204–220 | ⊖ | – | (0.31-0.12) | |
| 221–240 | fioletowe | – | 0.08 | A |
| 241–250 | ⊖ | – | (0.06-0.03) | |

Faza ruchoma:

S_1 : chloroform–metanol–woda (23:12:2)

Odczynniki wywołujące:

- stężony kwas siarkowy
- 10% zawiesina odwłóknionej krwi wołowej w buforze Sörensena

* zabarwienie po spryskaniu stęż. kwasem siarkowym i ogrzaniu w temp. 105 °C przez 10 minut

⊖ brak zabarwienia charakterystycznego dla saponozydów

Hemoliza:

- +++ bardzo silna
- ++ silna
- + słaba
- brak

We frakcjach 113–120 stwierdzono obecność kolejnego, aktywnego hemolitycznie saponozydu ($R_f = 0.75$, faza ruchoma S_1) oznaczonego symbolem D.

Fracje 141–175 zawierające saponozydy C i B, oraz frakcje 121–140 zawierające saponozydy D, C, B poddano kilkakrotnej chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (faza ruchoma S_1). W jej wyniku uzyskano zespół frakcji zawierających osobno związek D, C i B, i oznaczono je odpowiednio symbolami f_D , f_C , f_B .

Fracje 176–203 (patrz tabela 3) zawierające saponozyd B połączono z f_B , a frakcje 221–240 zawierające saponozyd A oznaczono symbolem f_A .

3.3.2.2 Etap II - oczyszczanie frakcji f_A , f_B , f_C i f_D na tlenku glinu.

3.3.2.2.1 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd A

Fracje f_A , po zagęszczeniu w wyparce obrotowej, rozpuszczono w niewielkiej ilości fazy ruchomej S_{15} i naniesiono na kolumnę (100 x 5 cm) wypełnioną tlenkiem glinu zawieszonym w fazie S_{15} , którą stosowano jako eluent. Zebrano 57 frakcji (po 1 cm³), które łączono na podstawie podobnego obrazu chromatograficznego (TLC).

Saponozyd A znajdował się we frakcjach 14–55 (TLC: płytki pokryte żelem krzemionkowym, S_4 , $R_f = 0.54$), które zagęszczono do sucha i pozostawiono do dalszej analizy. Oznaczono je symbolem F_A .

3.3.2.2.2 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd B

Na kolumnę wypełnioną jak w punkcie 3.3.2.2.1 naniesiono frakcję f_B i przemywano fazą ruchomą S_{15} . Zebrano ogółem 153 frakcje, które kontrolowano chromatograficznie (TLC: płytki pokryte żelem krzemionkowym, S_4). Saponozyd B znajdował się w połączonych frakcjach 10–148 ($R_f = 0.61$), które zagęszczono i pozostawiono do dalszej analizy. Oznaczono je symbolem F_B .

3.3.2.2.3 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd C

Fracje f_C rozdzielano na kolumnie o wymiarach 50 x 2.5 cm (wypełnienie: tlenek glinu, faza ruchoma: S_4). Do dalszej analizy pozostawiono frakcje 7–50 (ogółem zebrano 54 frakcje), oznaczone symbolem F_C (TLC: płytki pokryte żelem krzemionkowym, S_4 , $R_f = 0.65$)

3.3.2.2.4 Oczyszczanie frakcji zawierających saponozyd D

Fracje f_D oczyszczano na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu o wymiarach 40 x 1 cm. Jako eluent zastosowano układ S_4 . Zebrano 36 frakcji, które łączono na podstawie podobnego obrazu chromatograficznego (TLC: płytki pokryte żelem krzemionkowym, S_4). Frakcje 6–33, które oznaczono symbolem F_D ($R_f = 0.77$) zawierały saponozyd D, jednak ze względu na jego śladowe ilości zrezygnowano z dalszej izolacji.

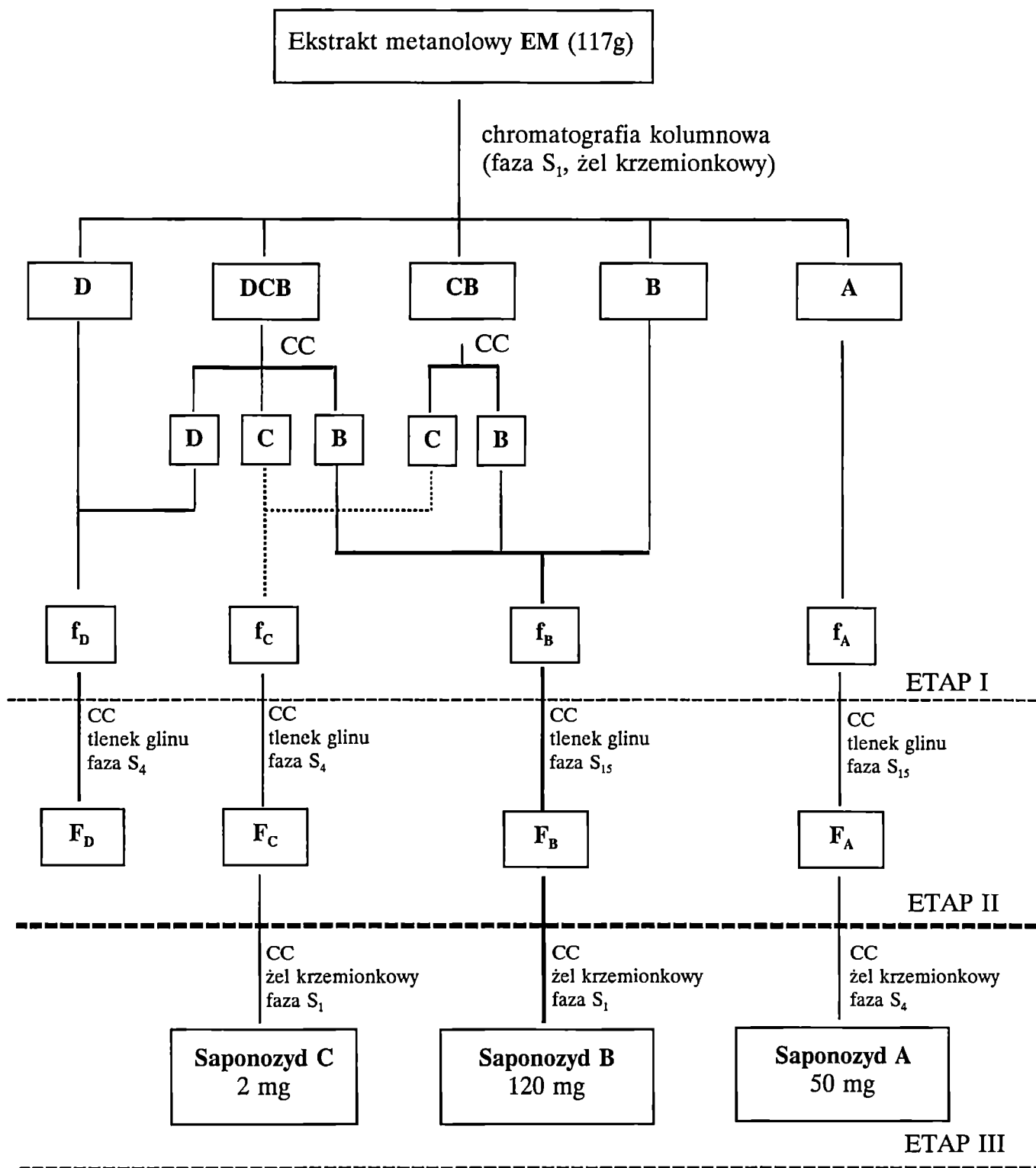
3.3.2.3 Etap III - otrzymanie czystych saponozydów

Pozbawione barwników frakcje zawierające poszczególne saponozydy A, B i C tj. odpowiednio F_A , F_B i F_C , poddano dalszemu oczyszczaniu.

Zastosowano kolumny o wymiarach 40 x 1 cm wypełnione żelalem krzemionkowym.

- Rozdzielając związki zawarte we frakcji F_A jako fazę ruchomą zastosowano układ S_4 . Zebrano 35 frakcji (0.5 cm^3). Jednorodne frakcje 15–34 połączono i odparowano do sucha, a następnie przekrystalizowano z butanolu nasyconego wodą uzyskując **50 mg czystego saponozydu A**.
- Dla końcowego rozdziału związków zawartych we frakcji F_B jako eluent zastosowano fazę ruchomą S_1 . Zebrano 50 frakcji. Połączone jednorodne frakcje 6–49, po odparowaniu do sucha krystalizowano kilkakrotnie z metanolu uzyskując **120 mg amorficznego saponozydu B**.
- Rozdzielając związki zawarte we frakcji F_C zastosowano fazę ruchomą S_1 . Z połączonych 12 frakcji, po odparowaniu do sucha i przekrystalizowaniu z metanolu otrzymano **ok. 2 mg saponozydu C**.

Schemat izolacji saponozydów A, B i C z wyciągu metanolowego EM przedstawia rys. 49.



Rys. 49 Schemat izolacji saponozydów z wyciągu metanolowego z części podziemnych *Lysimachia vulgaris* L. (CC - chromatografia kolumnowa; D, DCB, CB, B, A - wstępnie rozdzielone frakcje zawierające poszczególne saponozydy, f_D, f_C, f_B, f_A - połączone frakcje zawierające odpowiednie saponozydy; F_D, F_C, F_B, F_A - frakcje po oczyszczeniu na tlenku glinu).

4 Badania strukturalne wyizolowanych związków

4.1 Benzochinony

Substancję BQ poddano porównawczej analizie chromatograficznej (TLC) wobec wzorców benzochinonów – rapanonu i embeliny. Chromatogramy rozwijano w układzie S_{11} , a po wysuszeniu obserwowano w świetle widzialnym.

Zmierzono skręcalność oraz temperaturę topnienia, wykonano widma spektralne. Substancję BQ poddano ponadto analizie GLC w warunkach opisanych w p. 1.2.3. Wyniki zestawiono w p. 5.1

4.1.1 Acetylacja

Substancję BQ (30 mg) rozpuszczono w mieszaninie bezwodnik kwasu octowego-pirydyna (2 ml+2 ml) i prowadzono acetylację w temperaturze pokojowej, przy ciągłym mieszaniu, przez 24 godziny. Produkty acetylacji oczyszczano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelalem krzemionkowym i przemywanej fazą ruchomą S_8 . Frakcje kontrolowano chromatograficznie (TLC: płytki pokryte żelalem krzemionkowym, faza ruchoma S_8). Acetylowaną pochodną przekrystalizowano z etanolu.

4.1.2 Metylacja

Substancję BQ (30 mg) rozpuszczono w eterze, zadano eterowym roztworem diazometanu i mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu do sucha produkty metylacji oczyszczano na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym (faza ruchoma S_8). Eter metylowy substancji BQ otrzymano w postaci oleju.

4.1.3 Utlenienie nadmanganianem potasu i metylacja powstałych kwasów tłuszczowych

Substancję BQ (100 mg) rozpuszczono w mieszaninie pirydyny (15 ml) i wody (0.5 ml), a następnie przy ciągłym mieszaniu dodawano porcjami sproszkowany nadmanganian potasu (0.5 g). Nadmiar $KMnO_4$ usunięto wodorosiarczynem sodowym ($NaHSO_3$), a mieszaninę reakcyjną rozcieńczono wodą. Produkty utlenienia eluowano eterem etylowym. Rozpuszczalnik odparowano, a do pozostałości dodano 5 ml 2M metanolowego roztworu chlorowodoru i ogrzewano przez 0.5 godziny na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Po rozcieńczeniu mieszaniny reakcyjnej wodą, zmetylowany produkt eluowano chloroformem i poddano chromatografii gazowej.

4.2 Saponozydy

Badaniom strukturalnym poddano wyizolowane z wyciągu metanolowego z części podziemnych tojeści pospolitej saponozydy A i B. Oznaczono ich skręcalność właściwą, zmierzono temperatury topnienia i wykonano widma spektralne. Wyniki zestawiono w p. 5.2 i p. 5.3.

Saponozyd C poddano jedynie wstępnej analizie jakościowej pod kątem określenia rodzaju cukrów i aglikonu, metodą hydrolizy gazowym chlorowodorem na płycie chromatograficznej.

4.2.1 Hydroliza gazowym chlorowodorem na płycie chromatograficznej

Hydrolizę prowadzono na płytkach gotowych pokrytych żelem krzemionkowym w komorze, do której doprowadzano wytworzony w osobnym reaktorze gazowy chlorowódor ($KCl + H_2SO_4$). Komorę ogrzewano na łaźni wodnej w temperaturze 80 °C. Czas prowadzenia hydrolizy dobierano eksperymentalnie.

4.2.1.1 Identyfikacja aglikonów

Próbki saponozydów A, B i C nanoszono na płytki obok wzorców sapogenin. Hydrolizę prowadzono przez 20 minut. Po odpędzeniu chlorowodoru w strumieniu ciepłego powietrza, płytki rozwijano w trzech fazach ruchomych: S_5 , S_6 , S_7 . Chromatogramy spryskiwano stężonym kwasem siarkowym i ogrzewano w suszarce w temp. 105 °C przez 10 min.

Wyniki analizy przedstawia tabela 4.

4.2.1.2 Identyfikacja cukrów

Metanolowe roztwory badanych saponozydów oraz cukrów wzorcowych nanoszono na płytki pokryte żelem krzemionkowym i hydrolizowano gazowym chlorowodorem jak opisano w p. 4.2.1. Czas hydrolizy – 30 minut. Płytki rozwijano w trzech fazach ruchomych: S_1 (2x), S_{12} , S_{13} . Po wysuszeniu, chromatogramy spryskano ftalanem aniliny i ogrzewano w temp. 105 °C przez 10 minut.

Wartości R_f cukrów oraz zabarwienia plam zestawione są w tabeli 5.

Tabela 4. Wyniki porównawczej analizy chromatograficznej (TLC) aglikonów uzyskanych po hydrolizie gazowym chlorowodem saponozydów A, B i C z substancjami wzorcowymi.

| <i>Substancje wzorcowe</i> | <i>Zabarwienie*</i> | <i>Wartości R_f w fazach</i> | | |
|---------------------------------|---------------------|---|----------------|----------------|
| | | S_5 | S_6 | S_7 |
| hederagenina | różowofioletowe | 0.20 | 0.13 | 0.42 |
| 23-hydroksy- prymulagenina A | brunatno-różowe | 0.40 | 0.21 | 0.57 |
| prywerogenina | brunatno-różowe | 0.60 | 0.33 | 0.71 |
| kwasy oleanolowy | różowofioletowe | 0.66 | 0.55 | 0.80 |
| kwasy echinocystowy | beżowe | 0.77 | 0.58 | 0.82 |
| <i>Aglikony saponozydów</i> | ***** ***** | ***** ***** | ***** ***** | ***** ***** |
| A | różowofioletowe | 0.20 | 0.13 | 0.42 |
| B | brunatno-różowe | 0.45 | 0.23 | 0.61 |
| C | różowofioletowe | 0.20 | 0.13 | 0.42 |

Fazy ruchome:

- S_5 : chloroform – metanol (25:1)
- S_6 : chloroform – octan etylu (4:1)
- S_7 : benzen – aceton (4:2)

Odczynnik wywołujący:
stężony kwas siarkowy

* zabarwienie po spryskaniu odczynnikiem wywołującym i ogrzaniu w temp. 105 °C przez 10 minut

Tabela 5. Wyniki porównawczej analizy chromatograficznej (TLC) cukrów saponozydów A, B i C po hydrolizie gazowym chlorowodorem oraz cukrów wzorcowych.

| Cukry wzorcowe | Zabarwienie* | Wartości R_f w fazie ruchomej | | |
|----------------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|----------------|
| | | S_1 | S_{12} | S_{13} |
| galaktoza | żółtobrunatne | 0.46 | 0.32 | 0.44 |
| glukoza | żółtobrunatne | 0.49 | 0.34 | 0.46 |
| arabinoza | różowe | 0.56 | 0.38 | 0.50 |
| ksyloza | różowe | 0.60 | 0.43 | 0.48 |
| ramnoza | żółte | 0.65 | 0.47 | 0.53 |
| kwask glukuronowy (lakton) | różowo-czerwone | 0.70 | 0.45 | 0.66 |
| Cukry saponozydów | ***** ***** | ***** ***** | ***** ***** | ***** ***** |
| A | żółtobrunatne | 0.49 | 0.34 | 0.46 |
| | różowe | 0.56 | 0.38 | 0.50 |
| | żółte | 0.65 | 0.47 | 0.53 |
| B | żółtobrunatne | 0.49 | 0.34 | 0.46 |
| | różowe | 0.56 | 0.38 | 0.50 |
| | różowe | 0.60 | 0.43 | 0.48 |
| C | żółtobrunatne | 0.49 | 0.34 | 0.46 |
| | różowe | 0.60 | 0.43 | 0.48 |

Fazy ruchome:

S_1 : chloroform–metanol–woda (23:12:2)

S_{12} : chloroform–kwas octowy–woda (6:7:1)

S_{13} : chloroform–metanol–aceton–woda (3:3:3:1)

Odczynnik wywołujący:

1% butanolewy roztwór ftalanu aniliny

* zabarwienie po spryskaniu odczynnikiem wywołującym i ogrzaniu w temp. 105 °C przez 10 minut

4.2.2 Hydroliza kwaśna saponozydu B

50 mg saponozydu B hydrolizowano 2N metanolem roztworem chlorowodoru przez 4 godziny w temperaturze wrzenia roztworu. Następnie hydrolizat ochłodzono, rozcieńczono wodą destylowaną, a po oddestylowaniu metanolu odsączono wytrącony osad aglikonów.

4.2.2.1 Analiza produktów hydrolizy kwaśnej saponozydu B

● cukry

Kwaśną fazę wodną po oddzieleniu osadu aglikonów neutralizowano żywicą jonowymienną Dowex (forma OH), następnie zagęszczano do sucha i po rozpuszczeniu w metanolu analizowano techniką TLC stosując fazy ruchome S_1 , S_{12} , S_{13} .

Wartości R_f cukrów zestawiono w p. 5.2

● aglikon

Osad aglikonów otrzymany w wyniku hydrolizy kwaśnej oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej, jako eluent stosując fazę ruchomą S_5 . Frakcje kontrolowano chromatograficznie (TLC: płytki pokryte żelem krzemionkowym, faza S_5). Połączone frakcje zawierające czysty aglikon saponozydu B przekrystalizowano kilkakrotnie z metanolu otrzymując 10 mg związku.

Aglikon saponozydu B poddano analizom spektralnym, zmierzono temperaturę topnienia i skręcalność właściwą. Wyniki zestawiono w p. 5.2

4.2.3 Hydroliza częściowa saponozydu B

2 mg saponozydu B hydrolizowano przez godzinę na wrzącej łaźni wodnej 1% metanolem roztworem kwasu solnego. Hydrolizat rozcieńczono wodą i eluowano mieszaniną prosapogenin n–butanolem.

4.2.3.1 Analiza cukrów prosapogenin saponozydu B

Mieszaninę prosapogenin saponozydu B naniesiono na płytkę chromatograficzną i rozwinięto w jednym kierunku stosując fazę ruchomą S_1 . Po wysuszeniu chromatogramu, na linii rozwinięcia naniesiono wzorcowe cukry (arabinoza, glukoza, ksyloza). Płytkę umieszczono w komorze i poddano hydrolizie kwaśnej gazowym chlorowodorem jak opisano w p. 4.2.1. Po odpędzeniu chlorowodoru chromatogram rozwijano w drugim kierunku w fazie S_1 (2x), wysuszono i wywołano cukry ftalanem aniliny.

Uzyskane wyniki zestawiono w p. 5.2

4.2.4 Metylacja saponozydu B metodą Hakomori [287,115]

Handlowy wodorek sodu (NaH) w oleju parafinowym przemyto kilkakrotnie heksanem. Po usunięciu rozpuszczalnika osad (3 g) wysuszono w atmosferze azotu i przeniesiono do kolbki okrągłodennej. Dodano 60 ml świeżo przedestylowanego dimetylosulfotlenku (DMSO) i łagodnie ogrzewano, mieszając przez 4 godziny.

10 ml tak przygotowanego odczynnika przeniesiono do kolbki, do której następnie dodano rozpuszczony w niewielkiej ilości DMSO saponozyd B (25 mg). Mieszano przez około 20 minut (do przejaśnienia roztworu), a następnie dodawano kroplami świeżo przedestylowany jodek metylu (0.5 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1 godzinę przy łagodnym ogrzewaniu (temp. 40 °C). Dalej metylację prowadzono w temperaturze pokojowej, dodając kilkakrotnie jodku metylu. Po 24 godzinach zawartość w kolbce rozcieńczono wodą, wytrząśnięto z nasyconym roztworem tiosiarczanu sodu, a następnie eluowano zmetylowany produkt chloroformem (3 x 10 ml).

Warstwę chloroformową po przemyciu wodą osuszano nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano do sucha. Zmetylowany produkt oczyszczano na kolumnie wypełnionej żelazem krzemionkowym stosując fazę ruchomą S₈.

4.2.4.1 Hydroliza kwaśna zmetylowanego saponozydu B

Oczyszczony chromatograficznie (CC) zmetylowany saponozyd B hydrolizowano w zamkniętej ampułce w atmosferze azotu 90% kwasem mrówkowym (3 ml). Hydrolizę prowadzono przez 2 godziny w temperaturze wrzącej łaźni wodnej. Po otwarciu ampułki zawartość przeniesiono do kolbki okrągłodennej i rozcieńczono trzykrotnie wodą. Z hydrolizatu wypadł osad aglikonu, który odsączono, a kwaśną fazę wodną odparowano w wyparce obrotowej. W końcowym etapie zagęszczania pozostałość (około 0.5 ml) trzykrotnie oddestylowano z metanolem (3 x 10 ml).

Częściowo zmetylowane cukry saponozydu B analizowano chromatograficznie (TLC) w fazie ruchomej S₁₄. Wartości R_G zestawiono w p. 5.2.

4.2.4.2 Przeprowadzenie częściowo zmetylowanych cukrów saponozydu B w octany alditoli.

Częściowo zmetylowane cukry saponozydu B rozpuszczono w 2 ml mieszaniny metanol-woda (1:1), dodano borowodorku sodu (ok. 10 mg) i pozostawiono na 24 godziny. Nieprzereagowany NaBH₄ rozłożyło kwasem octowym. Mieszaninę rozcieńczono dwukrotnie wodą, a jony sodowe usunięto Amberlitem IRC-50. Zubożony roztwór odparowano do sucha, oddestylowując kwas borowy z metanolem (3 x 10 ml).

Suchą pozostałość, zawierającą częściowo zmetylowane i zredukowane cukry, poddano acetylacji. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny w środowisku pirydyna – bezwodnik kwasu octowego (1:1) przy ciągłym mieszaniu. Nadmiar bezwodnika rozłożyło dodając dwukrotną objętość wody przy równoczesnym chłodzeniu i zagęszczono w wyparce obrotowej.

Częściowo zmetylowane i zacetylowane alditole cukrów eluowano heksanem, a po zagęszczeniu do sucha rozpuszczono w heksanie i analizowano metodą chromatografii gazowej. Czasy retencji zestawione są w p. 5.2.

4.2.5 Hydroliza alkaliczna saponozydu A

20 mg saponozydu A rozpuszczono w 5 ml 2% metanolowego roztworu wodorotlenku potasu i hydrolizowano na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 1.5 godziny. Następnie hydrolizat rozcieńczono wodą i zobojętniono 1% kwasem solnym.

4.2.5.1 Analiza prosapogeniny po hydrolizie alkalicznej saponozydu A

Prosapogeninę saponozydu A eluowano z hydrolizatu n-butanolem (3 x 10 ml). Fazę butanolową przemyto wodą, zagęszczono do sucha na wyparce obrotowej i poddano oczyszczaniu metodą chromatografii kolumnowej w fazie ruchomej S_1 . Jednorodne chromatograficznie frakcje (TLC, S_1), zawierające prosapogeninę saponozydu A, połączono, odparowano i przekrystalizowano kilkakrotnie z metanolu.

Otrzymany związek poddano analizom spektralnym, oznaczono skręcalność i temperaturę topnienia. Wyniki zestawiono w p. 5.3.

4.2.5.1.1 Hydroliza prosapogeniny saponozydu A gazowym chlorowodorem na płycie chromatograficznej – analiza części cukrowej

Na płytkę chromatograficzną naniesiono prosapogeninę saponozydu A oraz wzorce cukrów (arabinoza, glukoza, ramnoza). Hydrolizę prowadzono w warunkach opisanych w p. 4.2.1. Chromatogram rozwinięto dwukrotnie w fazie ruchomej S_1 i wywołano ftalanem aniliny. Wartości R_f zidentyfikowanych cukrów zestawiono w p. 5. 3.

4.2.5.1.2 Metylacja prosapogeniny saponozydu A i analiza zmetylowanych cukrów po hydrolizie gazowym chlorowodorem na płycie chromatograficznej

Prosapogeninę saponozydu A poddano metylacji metodą wg. Hakomori, jak opisano w p. 4.2.4. Zmetylowany produkt naniesiono na płytkę chromatograficzną i rozwinięto w jednym kierunku w fazie ruchomej S_8 . Po wysuszeniu chromatogramu, na linii rozwinięcia naniesiono wzorce zmetylowanych cukrów. Płytkę umieszczono w komorze, do której doprowadzano gazowy chlorowodór.

Hydrolizę prowadzono przez 30 minut, w temperaturze 80 °C. Po odpędzeniu chlorowodoru w strumieniu ciepłego powietrza, płytkę rozwinięto w drugim kierunku w fazie ruchomej S_{14} . Chromatogram wysuszono, a cukry wywołano ftalanem aniliny. Wartości R_G zestawiono w p. 5.3.

4.2.5.2 Analiza cukrów pozostałych w fazie wodnej po hydrolizie alkalicznej saponozydu A

Fazę wodną, którą oddzielono z hydrolizatu po wyeluowaniu butanolem prosapogenin saponozydu A, odparowano do sucha. Z suchej pozostałości wymyto metanolem związek, któremu nadano nazwę oligosacharyd A.

Związek ten naniesiono na płytkę chromatograficzną obok wzorców cukrów i przeprowadzono hydrolizę gazowym chlorowodorem, jak opisano w p. 4.2.1. Po odpędzeniu chlorowodoru, chromatogram rozwinięto dwukrotnie w fazie ruchomej S_1 , a następnie wywołano ftalanem aniliny. Wartości R_f zidentyfikowanych cukrów zestawiono w p. 5.3.

4.2.5.2.1 Metylacja oligosacharydu A i analiza zmetylowanych cukrów po hydrolizie gazowym chlorowodorem na płytce chromatograficznej

Oligosacharyd A poddano metylacji metodą wg. Hakomori, jak opisano w p. 4.2.4. Zmetylowany produkt naniesiono na płytkę chromatograficzną i rozwinięto w jednym kierunku w fazie ruchomej S_8 . Chromatogram wysuszono, a na linii rozwinięcia naniesiono wzorce zmetylowanych cukrów. Płytkę poddano hydrolizie gazowym chlorowodorem, jak opisano w p. 4.2.5.1.2. Po odpędzeniu chlorowodoru w strumieniu ciepłego powietrza, chromatogram rozwinięto w drugim kierunku stosując fazę ruchomą S_{14} , a po wysuszeniu cukry wywołano ftalanem aniliny. Wartości R_G zestawiono w p. 5.3.

5 Wyniki analiz fizykochemicznych i spektralnych

5.1 Substancja BQ

postać: krystaliczna

barwa: pomarańczowa

t. top.: 141–143 °C

skręcalność: $[\alpha]_D = 0^\circ$ (c 1.0; chloroform)

TLC: R_f 0.61 (faza ruchoma S_{11}), identyczny z embeliną i rapanonem

analiza elementarna: znal. C 69.01%, H 6.49% (obl.: C 72.0%, H 9.7%)

UV (EtOH) λ_{max} : 291, 419 (rys. 50)

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3310 (O–H, walencyjne), 2920, 2850 (C–H), 1615 (C=O), 1360, 1329 (C–O, deformacyjne) (rys. 51)

1H NMR ($CDCl_3$, 500.13 MHz) δ ppm: 7.6 (2H,bs,2xOH), 5.9 (1H,s,H pierścienia), 2.45 (2H,t,CH₂), 1.48 (2H,t,CH₂), 1.26 (24H,bs,CH₂ x 12), 0.87 (3H,t,CH₃) (rys. 55)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125.77 MHz) δ ppm: 169 (C–1,C–2,C–4,C–5 pierścienia), 117.1 (C–3 pierścienia), 102.2 (C–6 pierścienia), 31.9–14.0 sygnały węgla łańcucha bocznego (rys. 56)

EIMS m/z (int.%): 350 M^+ (2), 351 $M+1$ (0.5), 322 (34.5), 294 (57.4), 155 (64.2), 154 (100), 153 (69.2) - rys. 58

GLC: (rys. 59) czasy retencji w min.:

homolog o długości łańcucha C_{15} : $R_T = 1.83$

homolog o długości łańcucha C_{13} : $R_T = 0.16$

homolog o długości łańcucha C_{11} : $R_T = 0.76$

Pochodna acetylowa;

żółta, amorficzna substancja

t.top.: 105–107 °C

TLC: R_f 0.24 (faza ruchoma S_8)

IR (KBr) ν cm^{-1} : 2925, 2850 (C–H), 1770 (C=O), 1595 (=C–H) (rys. 60)

Pochodna metylowa:

brunatnoczerwony olej

TLC: R_f 0.75 (faza ruchoma S_8)

IR (KBr) ν cm^{-1} : 2840 ($\text{CH}_3\text{-O-R}$), 1660, 1610 ($=\text{CH}_2$), 1460, 1250 (C-O-C),
1070–1020 (rys. 61)

Analiza produktów utlenienia:

GLC zmetylowanych kwasów tłuszczowych (rys. 62) czasy retencji w min.:

laurynowego $R_T = 2$
mirystycynowego $R_T = 3.8$
palmitynowego $R_T = 6.8$

5.2 Saponozyd B

postać: amorficzna

barwa: kremowobiała

t.top.: 265–270 °C

skręcalność: $[\alpha]_D = +2^\circ$ (c 1.0; metanol)

TLC: R_f 0.33 (faza ruchoma S_1)

aktywny hemolitycznie w testach na płycie TLC

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3440 (O–H), 2940 (C–H), 1075 (C–OH) - rys. 63

FAB–MS (jony dodatnie) m/z (int.%): 1179.7 [M+Cs]⁺ (0.09), 1069.7 [M+Na]⁺ (0.08),
132.9 [pentoza] (100)

FAB–MS (jony ujemne) m/z (int.%): 1045.3 [M–H][–] (100), 913.2 [M–pentoza][–]
(19.8), 883.2 [M–heksoza][–] (4.45), 751.2
[M–(pentoza+heksoza)][–] (10.4) - rys. 64

¹H NMR (metanol–*d*₄, 200.13 MHz) δ ppm: 4.97 (H–1 glu'), 4.75 (H–1 glu), 4.71 (H–1
ksyl), 4.67 (H–1 ara), 3.21 (m, H–3 α) - rys. 65

¹H NMR (pirydyna–*d*₅, 500.13 MHz) δ ppm: 5.47 (1H,d,J=7.6 Hz,H–1 glu'), 4.97
(1H,d,J=7.9 Hz,H–1 glu), 4.88 (1H,d,J=6.5 Hz,H–1 ksyl), 4.76 (1H,d,J=5.4 Hz,H–1
ara), 0.87, 0.98, 1.07, 1.08, 1.21, 1.34, 1.52 (s, 7 x CH₃ aglikonu) - rys. 66

¹³C NMR (metanol–*d*₄, 50 MHz) δ ppm: 107.2, 105.6, 104.8, 104.3 (anomeryczne węgle
cukrów), pozostałe dane zestawiono w tabeli 6. (rys. 67)

Wyniki pełnej hydrolizy kwaśnej saponozydu B:

| | | |
|---------|-----------------|-----------------------------|
| cukry: | arabinoza - TLC | R_f 0.56, faza S_1 (2x) |
| | | R_f 0.38, faza S_{12} |
| | | R_f 0.50, faza S_{13} |
| ksyloza | - TLC | R_f 0.60, faza S_1 (2x) |
| | | R_f 0.43, faza S_{12} |
| | | R_f 0.48, faza S_{13} |
| glukoza | - TLC | R_f 0.49, faza S_1 (2x) |
| | | R_f 0.34, faza S_{12} |
| | | R_f 0.46, faza S_{13} |

aglikon:

t.top.: 230–234 °C (lit. 229–232 °C [246], 225–226 °C [205], 249–250 °C [47])
 skręcalność: $[\alpha]_D = +50^\circ$ (c 0.6; chloroform)

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3490 (O–H), 2950 (C–H), 1628 (CH=CH), 1374 (*gem* CH₃)
 - rys. 68

EIMS (jony dodatnie) m/z (int.%): 458.4 M⁺(33.9), 440.4 [M–H₂O]⁺(23.8), 250.2 [rDA a]⁺ (95.7), 219.2 [rDA a – CH₂OH]⁺(100), 207.2 [rDA b]⁺ (30.3) - rys. 69

¹H NMR (CDCl₃, 500.13 MHz) δ ppm: 5.31 (1H,t,H–12), 4.04 (1H,t, H–16 β),
 3.3(1H,s,H–3 α),3.2(1H,d,H–28a), 3.24 (1H,d,H–28b), 1.34, 1.00, 0.94, 0.93,
 0.92, 0.91, 0.78 (s, 7 x CH₃) - rys. 70

¹³C NMR (CDCl₃, 125.77 MHz) δ ppm: (rys. 71), dane zestawiono w tabeli 6.

Wyniki częściowej hydrolizy kwaśnej saponozydu B:

kierunek pierwszy (faza S₁) – prosapogeniny B1 (R_f 0.9), B2 (R_f 0.7), B3 (R_f 0.23)

kierunek drugi (faza S₁, 2x)- po hydrolizie gazowym chlorowodorem na płytce TLC:

cukry: B1: arabinoza (R_f 0.56)
 B2: arabinoza (R_f 0.56)
 glukoza (R_f 0.49)
 B3: arabinoza (R_f 0.56)
 glukoza (R_f 0.49)
 ksyloza (R_f 0.60)

Cukry po metylacji saponozydu B metodą Hakomori:

TLC (faza S₁₄): 2,3,4,6-tetra-O-metyloglukoza R_G 1.0
 2,3,4-tri-O-metyloksyloza R_G 1.1
 3,4,6-tri-O-metyloglukoza R_G 0.6
 3-O-metyloarabinoza R_G 0.2

Wartości R_G względem 2,3,4,6-tetra-O-metyloglukozy [287].

GLC (octany alditoli), czasy retencji w min.:

1,5-diacetylo-2,3,4,6-tetra-O-metyloglucitol R_T =2.5
 1,2,5-triacetylo-3,4,6-tri-O-metyloglucitol R_T =4.1
 1,5-diacetylo-2,3,4-tri-O-metyloksylitol R_T =1.8
 1,2,4,5-tetraacetylo-3-O-metyloarabitol R_T =3.25

Tabela 6. Sygnały węgla w widmie ^{13}C NMR saponozydu B oraz aglikonu otrzymanego po hydrolizie kwaśnej (ppm)

| C | aglikon* | aglikon** | glikon | | |
|----------|-----------------|------------------|-------------------|------------|--------------|
| 1 | 38.7 | 40.2 | cukry terminalne: | | |
| 2 | 27.2 | 27.2 | ksyloza | C-1 | 107.2 |
| 3 | 78.9 | 91.3 | | C-2 | 76.0 |
| 4 | 38.6 | 40.6 | | C-3 | 77.8 |
| 5 | 55.2 | 56.8 | | C-4 | 70.9 |
| 6 | 18.2 | 18.8 | | C-5 | 67.4 |
| 7 | 32.8 | 33.3 | | glukoza' | C-1 |
| 8 | 39.9 | 43.3 | C-2 | | 76.0 |
| 9 | 47.0 | 50.2 | C-3 | | 78.7 |
| 10 | 36.9 | 37.4 | C-4 | | 71.9 |
| 11 | 23.4 | 19.9 | C-5 | | 78.0 |
| 12 | 122.7 | 37.0 | C-6 | | 62.5 |
| 13 | 142.9 | 88.3 | cukry wewnętrzne: | | |
| 14 | 41.5 | 45.3 | glukoza | C-1 | 104.8 |
| 15 | 35.3 | 37.8 | | C-2 | 85.1 |
| 16 | 74.9 | 77.6 | | C-3 | 77.5 |
| 17 | 40.5 | 45.4 | | C-4 | 71.1 |
| 18 | 42.7 | 51.4 | | C-5 | 78.0 |
| 19 | 46.9 | 39.8 | | C-6 | 63.3 |
| 20 | 30.3 | 32.4 | arabinoza | C-1 | 104.3 |
| 21 | 34.7 | 35.1 | | C-2 | 79.5 |
| 22 | 25.5 | 30.8 | | C-3 | 74.3 |
| 23 | 28.0 | 28.4 | | C-4 | 80.2 |
| 24 | 15.7 | 16.8 | | C-5 | 65.8 |
| 25 | 15.5 | 16.8 | | | |
| 26 | 17.1 | 18.8 | | | |
| 27 | 26.2 | 19.9 | | | |
| 28 | 70.7 | 78.7 | | | |
| 29 | 32.7 | 33.9 | | | |
| 30 | 23.4 | 24.9 | | | |

** sygnały węgla części aglikonowej saponozydu B

* sygnały węgla aglikonu po hydrolizie kwaśnej saponozydu B

5.3 Saponozyd A

postać: krystaliczna (igły)

barwa: bezbarwny

t.top.: 220–223 °C

skręcalność: $[\alpha]_D = -57^\circ$ (c 0.7; metanol)

TLC: R_f 0.08 (faza ruchoma S_1)

brak aktywności hemolitycznej w teście na płytce TLC

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3382 (O–H), 2934 (C–H), 1733 (C=O, ester), 1056 (C–O)- rys. 72

LSIMS (jony ujemne) m/z: 1381 [M–H] $^-$, 1236 [M–H–ramnoza] $^-$, 1074 [M–H–ramnoza–glukoza] $^-$, 912 [M–H–ramnoza–2 x glukoza] $^-$, 766 [M–H–2 x ramnoza–2 x glukoza] $^-$, 750 [M–H–ramnoza–3 x glukoza] $^-$, 471 [M–H–2 x ramnoza–3 x glukoza–arabinoza] $^-$ (rys. 73)

^1H NMR (metanol- d_4 , 500.13 MHz) δ ppm: 5.34 (1H,d,J=9.9 Hz, H–1 glu', estrowo związana), 5.24 (1H,t,H–12 aglikonu), 5.21 (1H,d,J=1.4 Hz,H–1 ramn), 4.83 (1H,d,J=1.4 Hz,H–1 ramn', w łańcuchu związanym estrowo), 4.62 (s,C–23–OH aglikonu), 4.48 (1H,d,J=6.2 Hz,H–1 ara), 4.43 (1H,d,J=7.6 Hz,H–1 glu), 4.39 (1H,d,J=7.6 Hz,H–1 glu'', w łańcuchu związanym estrowo), 3.63–3.61 (dd,H–3 α aglikonu), 1.25 (3H,d,J=6.2 Hz, CH₃ ramn'), 1.22 (3H,d,J=6.2 Hz,CH₃ ramn), 1.16, 0.97, 0.94, 0.90, 0.79, 0.70 (s, 6 x CH₃ aglikonu) - rys. 74

^1H NMR (pirydyna- d_5 , 500.13 MHz) δ ppm: 6.24 (1H,s,H–1 ramn), 6.22 (1H,d,J=7.5 Hz,H–1 glu', związana estrowo), 5.83 (1H,s,H–1 ramn', w łańcuchu związanym estrowo), 5.38 (1H,bs,H–12 aglikonu), 5.08 (1H,d,J=7Hz,H–1 ara), 4.97 (2H,d,J=7Hz,H–1 glu'', w łańcuchu związanym estrowo, H–1 glu), 3.85 (m,H–3 α aglikonu), 1.67 (3H,d,J=5.01 Hz,CH₃ ramn, w łańcuchu związanym estrowo), 1.62 (3H,d,J=5.01 Hz,CH₃ ramn), 1.15, 1.09, 1.07, 0.94, 0.85, 0.84 (s, 6 x CH₃ aglikonu) - rys. 75

^{13}C NMR (pirydyna- d_5 , 125 MHz) δ ppm: 106.7 (C–1 ara), 104.8 (C–1 glu), 104.4 (C–1 glu'', w łańcuchu związanym estrowo), 102.7 (C–1 ramn', w łańcuchu związanym estrowo), 101.7 (C–1 ramn), 95.6 (C–1 glu', związana estrowo) – sygnały węgla anomerycznych cukrów, pozostałe (rys. 79) wraz z wynikami analizy DEPT (rys. 80) zebrano w tabeli 7.

Korelacja NOE (pirydyna- d_5 , rys. 78):

dla protonu Ara-1 : proton H–3 aglikonu

Glu-1 : proton H–3 Ara (4.5 ppm)

Ramn-1 : proton H–2 Ara (4.09 ppm)

Tabela 7. Sygnały węgla w widmie ^{13}C NMR saponozydu A (125 MHz, pirydyna- d_5 , δ ppm)

| <i>Aglikon</i> | ^{13}C δ | <i>DEPT</i> | <i>Glikon</i> | | ^{13}C δ | <i>DEPT</i> |
|----------------|--------------------------|-----------------|--|---------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| C-1 | 39.1 | CH ₂ | 3-O-reszta: | | | |
| C-2 | 26.1 | CH ₂ | Ara | C-1 | 106.7 | CH |
| C-3 | 81.1 | CH | | C-2 | 76.3 | CH |
| C-4 | 43.6 | C | | C-3 | 80.3 | CH |
| C-5 | 47.8 | CH | | C-4 | 69.2 | CH |
| C-6 | 18.2 | CH ₂ | | C-5 | 65.4 | CH ₂ |
| C-7 | 32.6 | CH ₂ | | Ramn ($\rightarrow^2\text{Ara}$) | C-1 | 101.7 |
| C-8 | 40.0 | C | C-2 | | 72.5 | CH |
| C-9 | 48.3 | CH | C-3 | | 72.3 | CH |
| C-10 | 37.0 | C | C-4 | | 74.1 | CH |
| C-11 | 23.9 | CH ₂ | C-5 | | 70.4 | CH |
| C-12 | 123.0 | CH | C-6 | | 18.7 | CH ₃ |
| C-13 | 144.2 | C | Glu ($\rightarrow^3\text{Ara}$) | C-1 | 104.8 | CH |
| C-14 | 42.2 | C | | C-2 | 74.8 | CH |
| C-15 | 28.4 | CH ₂ | | C-3 | 78.5 | CH |
| C-16 | 23.4 | CH ₂ | | C-4 | 71.3 | CH |
| C-17 | 47.1 | C | | C-5 | 78.8 | CH |
| C-18 | 41.7 | CH | | C-6 | 62.6 | CH ₂ |
| C-19 | 46.3 | CH ₂ | 28-COO-reszta: | | | |
| C-20 | 30.8 | C | Glu' | C-1 | 95.7 | CH |
| C-21 | 34.1 | CH ₂ | | C-2 | 73.9 | CH |
| C-22 | 32.9 | CH ₂ | | C-3 | 78.7 | CH |
| C-23 | 64.8 | CH ₂ | | C-4 | 70.8 | CH |
| C-24 | 14.1 | CH ₃ | | C-5 | 78.1 | CH |
| C-25 | 16.3 | CH ₃ | | C-6 | 69.8 | CH ₂ |
| C-26 | 17.7 | CH ₃ | Glu'' ($\rightarrow^6\text{Glu}'$) | C-1 | 104.4 | CH |
| C-27 | 26.4 | CH ₃ | | C-2 | 75.4 | CH |
| C-28 | 176.7 | C | | C-3 | 77.2 | CH |
| C-29 | 33.2 | CH ₃ | | C-4 | 78.4 | CH |
| C-30 | 23.8 | CH ₃ | | C-5 | 76.6 | CH |
| | | | | C-6 | 61.3 | CH ₂ |
| | | | Ramn' ($\rightarrow^4\text{Glu}''$) | C-1 | 102.8 | CH |
| | | | | C-2 | 72.6 | CH |
| | | | | C-3 | 72.8 | CH |
| | | | | C-4 | 74.0 | CH |
| | | | | C-5 | 70.4 | CH |
| | | | | C-6 | 18.6 | C |

Wyniki hydrolizy kwaśnej saponozydu A:

cukry: ramnoza – TLC R_f 0.65, faza S_1 (2x)

R_f 0.47, faza S_{12}

R_f 0.53, faza S_{13}

glukoza – TLC R_f 0.49, faza S_1 (2x)

R_f 0.34, faza S_{12}

R_f 0.46, faza S_{13}

arabinoza – TLC R_f 0.56, faza S_1 (2x)

R_f 0.38, faza S_{12}

R_f 0.50, faza S_{13}

aglikon TLC: wartość R_f (=0.2, faza S_5) odpowiada hederageninie (zob. p. 4.2.1.1, tabela 4)

Wyniki hydrolizy alkalicznej saponozydu A:

cukry oligosacharydu A: (TLC, faza S_1 , 2x): ramnoza R_f 0.65

glukoza R_f 0.49

prosapogenina saponozydu A: t.top. 252–255 °C

skręcalność: $[\alpha]_D = +18^\circ$ (c 0.4; metanol)

IR (KBr) ν cm^{-1} : 3381 (O–H), 2943 (C–H), 1683 (–COOH), 1050 (C–O) - rys. 81

LSIMS (jony dodatnie): 935 $[M+Na]^+$, - rys. 82

^1H NMR (metanol- d_4 , 500 MHz) δ ppm: 5.23 (1H,t,H–12 aglikonu), 5.21 (1H,d,J=1.8 Hz,H–1 ramn), 4.62 (s,C–23–OH aglikonu), 4.48 (1H,d,J=6.12 Hz,H–1 ara), 4.43 (1H,d,J=7.7 Hz,H–1 glu), 3.64–3.61 (dd,H–3 α aglikonu), 1.22 (3H,d,J=6.1 Hz,CH₃ ramn), 0.17, 0.96, 0.93, 0.90, 0.81, 0.70 (s, 6 x CH₃ aglikonu) - rys. 83

Cukry po hydrolizie kwaśnej prosapogeniny saponozydu A:

TLC (faza ruchoma S_1 , 2x): arabinoza R_f 0.56

ramnoza R_f 0.65

glukoza R_f 0.49

Cukry po metylacji prosapogeniny saponozydu A i hydrolizie kwaśnej:

TLC (faza ruchoma S_{14}): 2,3,4,6-tetra-O-metyloglukoza $R_G = 1.0$

2,3,4-tri-O-metyloramnoza $R_G = 1.2$

4-O-metyloarabinoza $R_G = 0.3$

Wartości R_G względem 2,3,4,6-tetra-O-metyloglukozy (1.0)

Cukry po metylacji oligosacharydu A i hydrolizie kwaśnej:

TLC (faza ruchoma S_{14}): 2,3,4-tri-O-metyloramnoza $R_G = 1.2$

6 Badania aktywności biologicznej

Przedmiotem badań było określenie aktywności substancji BQ oraz saponozydu B w kierunku:

- a) działania fungistatycznego¹
- b) przeżywalności komórek nowotworowych²

a) Aktywność fungistatyczną testowano wobec *Candida albicans*. Do badań użyto komórek 30 szczepów, pozyskanych z materiału pobranego od pacjentów (plwocina, popłuczyny oskrzelowe, kał, wymazy z gardła, jamy ustnej, pochwy), z 24 godzinnej hodowli.

5 μ l zawiesiny poszczególnych szczepów *C. albicans* (stężenie 10⁷ komórek/ml) nanoszono na podłoże, w którym uprzednio rozpuszczono badany związek. Po 48 godzinach dokonywano odczytu, porównując obraz z próbą kontrolną (gdzie w podłożu rozpuszczono odpowiednią ilość dimetylosulfotlenku).

Wrażliwość *Candida albicans* na testowane substancje, wyrażoną w liczbie szczepów dla których zaobserwowano zahamowanie wzrostu, przedstawiono w tabeli 8.

b) W badaniach przeżywalności użyto komórek nowotworowych z hodowli *in vitro* następujących linii:

1. melanomy mysiej S91 Cloudmana
2. melanomy ludzkiej BM
3. CHO (komórki jajnika chomika chińskiego)

Testowaną substancję rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (DMSO), a następnie rozcieńczano do odpowiedniego stężenia w podłożu (RPMI 1640, Cytogen), w którym hodowano komórki nowotworowe. Po 48 i 72 godzinach określano ich liczbę w hodowli. Wyniki przedstawiono na wykresach zależności frakcji przeżywającej S/S₀ (gdzie S oznacza liczbę komórek w hodowli z badaną substancją, a S₀ - liczbę komórek w hodowli bez badanej substancji) od stężenia testowanego związku wyrażonego w μ g/ml (rys. 84). W tabeli 9 zestawiono wartości ID₅₀, czyli dawki obniżającej przeżywalność komórek o 50%, w μ g/ml.

¹ Testy w kierunku aktywności fungistatycznej przeprowadzono w Zakładzie Mykologii Instytutu Mikrobiologii CM UJ. Za wykonanie oznaczeń serdecznie dziękuję Pani doc. dr hab. Alicji Budak oraz Pani mgr Danucie Trojanowskiej.

² Przeżywalność komórek linii nowotworowych testowano w Zakładzie Biofizyki Instytutu Biologii Molekularnej UJ. Za wykonanie oznaczeń serdecznie dziękuję Pani dr Krystynie Ciężka i Pani dr Martynie Elas.

Tabela 8. Wyniki badań aktywności fungistatycznej substancji BQ i saponozydu B wobec 30 szczepów *Candida albicans*.

| <i>Substancja BQ</i> | | | <i>Saponozyd B</i> | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------|
| <i>stężenie w podłożu (μg/ml)</i> | <i>liczba szczepów wrażliwych</i> | | <i>stężenie w podłożu (μg/ml)</i> | <i>liczba szczepów wrażliwych</i> | |
| | <i>(±)</i> | <i>+</i> | | <i>(±)</i> | <i>+</i> |
| 1.6 | 0 | 0 | 3.75 | 0 | 0 |
| 3.2 | 0 | 0 | 7.5 | 0 | 0 |
| 6.2 | 3 | 2 | 15 | 2 | 0 |
| 12.5 | 2 | 6 | 30 | 1 | 3 |
| 25 | 11 | 11 | - | | |
| 50 | 0 | 30 | - | | |

+ : całkowite zahamowanie wzrostu

(±) : częściowe zahamowanie wzrostu

Tabela 9. Wartości ID₅₀ (w μg/ml) dla saponozydu B i substancji BQ

| <i>linia komórek</i> | <i>substancja BQ</i> | | <i>saponozyd B</i> | |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | <i>ID₅₀ po 48 h</i> | <i>ID₅₀ po 72 h</i> | <i>ID₅₀ po 48 h</i> | <i>ID₅₀ po 72 h</i> |
| S-91 | 7.8 | 5.0 | 2.1 | 1.8 |
| BM | >30 | >30 | 1.0 | 1.0 |
| CHO | 4.6 | 3.2 | 1.4 | 1.0 |

Bibliografia

- [1] Abe H., Konishi H., Komiya H., Arichi S. (1981) *Planta Med.*, 42, pp. 356-63
- [2] Abe H., Sakaguchi M., Odashima S., Arichi S. (1982) *Naunyn Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 320, 3, pp. 266-71, Medline: AN: 83037017
- [3] Adewunmi C.O., Becker W., Dorfler G. (1988) *J. Ethnopharmacol.*, 24, 1, pp. 107-14, Medline: AN: 89069602
- [4] Agrawal P.K., Rastogi R.P. (1974) *Phytochemistry*, 13, pp. 2623
- [5] Agrawal P.K. (1992) *Phytochemistry*, 31, 10, pp. 3307-30
- [6] Ahmad V.U., Mohammad F.V., Noorwala M., Sener B. (1993) *Planta Med.*, 59, pp. 461-4
- [7] Ahmed W., Usmanghani K., Ahmad I., Ahmad V.U., Miyase T. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 2, pp. 314-7
- [8] Akamatsu H., Komura J., Asada Y., Niwa Y. (1991) *Planta Med.*, 57, pp. 119-21
- [9] Alankuš-Caliskan O., Anil H. (1995) *Phytochemistry*, 38, 6, pp. 1493-5
- [10] Amoros M., Girre R.L. (1987) *Phytochemistry*, 26, 3, pp. 787-91
- [11] Amoros M., Fauconnier B., Girre L. (1977) *Annales pharmaceutiques francaises*, 35, 9-10, pp. 371-6
- [12] Ansari S.H., Ali M., Quadry J.S. (1993) *Pharmazie*, 3, pp. 215-17
- [13] Aoki T., Tanio Y., Suga T. (1976) *Phytochemistry*, 15, pp. 781-4
- [14] Arisawa M., Ohmura K., Kobayashi A., Morita N. (1989) *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 9, pp. 2431-34
- [15] Asada Y., Ikeno M., Furuya T. (1994) *Phytochemistry*, 35, 3, pp. 757-64
- [16] Asada Y., Ikeno M., Furuya T. (1994) *Phytochemistry*, 36, 2, pp. 455-8
- [17] Atsuchi M., Yamashita Ch., Iwasaki Y. (1995) *Eur. Pat. Appl.* EP 636,633, *Chem. Abstr.* 1995, 122:222825z
- [18] Bader G., Tuja D., Wray V., Hiller K. (1994) *Pharmazie*, 2/3, pp. 209-12
- [19] Bader G. (1994) *Pharmazie*, 49, 6, pp. 391-400
- [20] Bader G., Kulhanek Y., Ziegler-Böhme H. (1990) *Pharmazie*, 45, 8, pp. 618-20
- [21] Baigent D.R. (1973) *Ph.D. Thesis*, University New England, Australia

- [22] Banthorpe D.V. (1991) w *Methods in Plant Biochemistry*, ed. Dey P.M., Harborne J.B., Vol. 7, Academic Press, London, pp. 1-43
- [23] Batista O., Simões M.F., Duarte A., Valdeira M.L., Torre de la M.C., Rodriguez B. (1995) *Phytochemistry*, 38, 1, pp. 167-9
- [24] Bauer L., Brasil e Silva G.A.A., Rücker A. (1973) *Phytochemistry*, 12, pp. 1192
- [25] Berg van den A.J.J., Labadie R.P. (1989) w *Methods in Plant Biochemistry*, ed. Dey P.M., Harborne J.B., Vol. 1, Academic Press, London, pp.451-91
- [26] Bielańska M., Góra J., Świątek L. (1984) *Pollena: tłuszcze, środki piorące, kosmetyki*, 28, 5-6, pp. 96-8
- [27] Bloor S.J., Qi L. (1994) *J. Nat. Prod.*, 57, 10, pp. 1354-60
- [28] Bonte F., Dumas M., Chaudagne C., Meybeck A. (1994) *Planta Med.*, 60, pp. 133-5
- [29] Borkowski B. (1970) *Zarys farmakognozji*, PZWL, W-wa
- [30] Brandao M.G.L., Lacaille-Dubois M.A., Teixeira M.A., Wagner H. (1993) *Phytochemistry*, 34, 4, pp. 1123-27
- [31] Brieskorn C.H. (1987) *Pharmazie in unserer Zeit*, 16, 6, pp.161-81
- [32] Broda B., Mowszowicz J. (1996) *Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych*, PZWL, W-wa
- [33] Broda B., Mowszowicz J. (1972) *Systematyka roślin leczniczych*, PZWL, W-wa
- [34] Brückner A. (1974) *Słownik etymologiczny języka polskiego*, WP, W-wa
- [35] Burczyk J., Reznicek G., Baumgarten S., Hugh-Bloch M., Jurenitsch J., Schröder H., Werz U., Haslinger E. (1995) *Phytochemistry*, 39, 1, pp. 195-8
- [36] Burgos J., Sala F.J., López A. (1973) *Phytochemistry*, 12, pp. 1201-6
- [37] Cart J., Reznicek G., Korhammer S., Haslinger F., Jurenitsch J., Kubelka W. (1992) *Sci. Pharm.*, 60, 3, 161
- [38] Červenka M. (1990) *Świat roślin, skał i minerałów*, PWRiL, W-wa
- [39] Chakravarty A.K., Das B., Pakrashi S.C. (1987) *Phytochemistry*, 26, 8, pp. 2345-49
- [40] Chantrill B.H., Coulthard C.E., Dickinson L., Inley G.W., Morris W., Pyle A.H. (1952) *J. Gen. Microbiol.*, 6, pp. 74-84
- [41] Chen C.C., Yu H.J., Ou J.C., Pan T.M. (1994) *J. Chinese Chem. Soc.*, 41, 2, pp. 195–8, Chemistry Citation Index: TGA No.: NE034
- [42] Chen S.E., Sawchuk R.J., Staba E.J. (1980) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 5, 3, pp. 161-8, Medline: AN: 81138263
- [43] Cheng J.T., Tsai C.L. (1986) *Biochem. Pharmacol.*, 35, 15, pp. 2483-7
- [44] Chitra M., Shyamala-Devi C.S., Sukumar E. (1994) *Fitoterapia*, 55. 4, pp. 317-21

- [45] Činčura F., Ferakova V. (1990) *Pospolite rošliny šrodkowej Europy*, PWRiL, W-wa
- [46] Connoly J.D., Hill R.A. (1991) w *Methods in Plant Biochemistry*, ed. Dey P.M., Harborne J.B. Vol. 7, Academic Press, London, pp. 331-59
- [47] Connoly J.D., Hill R.A. (1991) *Dictionary of Terpenoids*, Vol. 2, Chapman and Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras
- [48] Corsaro M.M., Della Greca M., Fiorentino A., Monaco P., Previtera L. (1994) *Phytochemistry*, 37, 2, pp. 515-19
- [49] Cui B., Kinjo J., Nohara T. (1993) *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 3, pp. 553-6
- [50] Czarnecki R., Chełmecka A., Woróń J. (1994) *Herba Polonica*, 40, 3, pp. 114-7
- [51] Czarnecki R., Chełmecka A. (1994) *Herba Polonica*, 40, 1-2, pp.26-30
- [52] Dai Y., Hang B.Q., Li P.Z., Tan L.W. (1989) *Chung. Kuo. Yao. Li. Hsueh. Pao.*, 10, 4, pp. 381-4, Medline: AN:90163960
- [53] Danloy S., Quentin-Leclercq J., Coucke P., Pauw-Gillet de M.C., Elias R., Balansard G., Angenot L., Bassleer R. (1994) *Planta Med.*, 60, pp. 45-9
- [54] Della Greca M., Fiorentino A., Monaco P., Previtera L. (1994) *Phytochemistry*, 36, 6, pp. 1479-83
- [55] Dijoux M.G., Lavaud C., Massiot G., Men-Olivier le L., Sheeley D. M. (1993) *Phytochemistry*, 34, 2, pp. 497-9
- [56] Dixit V.P., Bhargava S.K. (1983) *Andrologia*, 15, 5, pp. 486-94
- [57] Donnelly D.M.X., Nangle B.J., Prendergast J.P., O'Sullivan A.M. (1968) *Phytochemistry*, 7, pp. 647-9
- [58] Dorman D.E., Roberts J.D. (1970) *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5, pp. 1355-61
- [59] Dumitrescu C., Paraschin V. (1987) *Interprinderea de Produse Cosmetice Nivea Ron*, Ro, 591, 30, Medline
- [60] El-Dakhakhny M. (1963) *Planta Med.*, 4, pp. 465-70
- [61] Elgamal M.H.A., Soliman H.S.M., Karawya M.S., Mikhova B., Duddeck H. (1995) *Phytochemistry*, 38, 6, pp. 1481-5
- [62] Elgamal M.H.A., Shaker K.H., Pöllmann K., Seifert K. (1995) *Phytochemistry*, 40, 4, pp. 1233-6
- [63] Engler A. (1964) *Syllabus der Pflanzenfamilien*, II, Borntraeger, Berlin
- [64] Faccino R.M., Carini M., Bonadeo P. (1990) *Acta Therapeutica*, 16, pp. 337-49
- [65] Favel A., Steinmetz M.D., Regli P., Vidal-Ollivier E., Elias R., Balansard G. (1994) *Planta Med.*, 60, pp. 50-3
- [66] Friebolin H. (1993) *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, VCH Publishers, New York

- [67] Fukuyama Y., Kiroyama Y., Kodama M., Iwaki H., Hosozawa S., Aki S., Matsui K. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 10, pp. 2211-3
- [68] Fukuyama Y., Okino J., Kodama M. (1991) *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 7, pp. 1877-9
- [69] Fukuyama Y., Kiriya Y., Okino J., Kodama M. (1993) *Tetrahedron Letters*, 34, 47, pp. 7633-6
- [70] Fukuyama Y., Kiriya Y., Okino J., Kodama M., Iwaki H., Hosozawa S., Matsui K. (1993) *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 3, pp. 561-5
- [71] Furukawa H., Wu T.S., Ohta T., Kuoh C.S. (1985) *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 10, pp. 4132-8
- [72] Fuzi I., Racz G., Rapp I., Domokos L. (1966) *Farm. Roman.*, 14, 6, pp. 367-70
- [73] Fuzi I., Racz G., Both I., Peter M. (1966) *Farm. Roman.*, 14, 11, pp. 671-74
- [74] Gilani A., Aftab K., Saeed S., Ahmad V.U., Noorwala M., Mohammad F.V. (1994) *Fitoterapia*, 65, 4, pp. 333-9
- [75] Giner J.L., Djerassi C. (1995) *Phytochemistry*, 39, 2, pp. 333-5
- [76] Glombitza K.W., Kurth H. (1987) *Planta Med.*, pp. 548-55
- [77] Gripenberg J. (1974) *Tetrahedron Letters*, 8, pp. 619-22
- [78] Gu L.Z., Zhang B.S., Nan J.H. (1988) *Chung. Yao. Tung. Pao.* 13, 7, pp. 40-2, Medline: AN: 89063565
- [79] Guinea M.C., Parellada J., Lacaille-Dubois M.A., Wagner H. (1994) *Planta Med.*, 60, pp. 163-7
- [80] Han D., Han J., Qiao M., Yu Z., Tan W., Xu S. (1988) *Chem. Abstr.* :62305k
- [81] Hankou Hospital Ther. Group (1981) *Xinyixue* 12(6), pp. 293-4, *Chem. Abstr.*97(25):207875n
- [82] Harborne J.B. (1968) *Phytochemistry*, 7, pp. 1215-30
- [83] Harborne J.B., Turner B.L. (1984) *Plant Chemosystematics*, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, London, pp. 163-71
- [84] Hartleb I., Seifert K. (1994) *Phytochemistry*, 35, 4, pp. 1009-11
- [85] Hartleb I., Seifert K. (1995) *Phytochemistry*, 38, 1, pp. 221-4
- [86] Hase J., Kobashi K., Mitsui K., Namba T., Yoshizaki M., Tomimori T. (1981) *J. Pharmacobiodyn.*, 4, 11, pp. 833-7
- [87] Hattori T., Ito M., Suzuki Y. (1991) *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 97, 1, pp. 13-21, Medline: AN:91257677
- [88] Hausen B.M. (1978) *Arch. Derm. Res.*, 261, pp. 311-21
- [89] Hausser K.H., Kalbitzer H.R. (1993) *NMR w Biologii i Medycynie*, Wyd. Naukowe VAM, Poznań
- [90] Hayashi, Fukui H., Tabata M. (1993) *Planta Med.*, 59, 351

- [91] Hegi G. *Illustrierte Flora von Mittel Europa*, Band 5, Teil 3, Carl Hauser, Munich
- [92] Hegnauer R. (1969) *Chemotaksonomie der Pflanzen*, Band 5, Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart
- [93] Hegnauer R. (1973) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band 6, Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart
- [94] Hegnauer R. (1962) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band 1, Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart
- [95] Hensens O.D., Lewis K.G. (1965) *Tetrahedron Letters*, 51, pp. 4639-43
- [96] Hidaka K., Ito M., Matsuda Y., Kohda H., Yamasaki K., Yamahara J. (1987) *Phytochemistry*, 26, 7, pp. 2023-7
- [97] Hikino H., Kiso Y., Amagaya S., Ogihara Y. (1984) *J. Ethnopharmacol.*, 12, 2, pp. 231-5
- [98] Hiller K., Paulick A., Friedrich E. (1981) *Pharmazie*, 36, 2, pp. 133-4
- [99] Hoppe A. (1975) *Drogenkunde*, Band 1., Walter de Gruyter, Berlin-New York
- [100] Hostettmann K., Hostettmann M., Marston A. (1991) *Methods in Plant Biochemistry*, ed. Dey P.M., Harborne J.B., vol. 7, Academic Press, London, pp.435-71
- [101] Houghton P.J., Zarka R., Heras de las B., Hoult J.R.S. (1995) *Planta Med.*, 61, pp. 33-6
- [102] Hu M., Ogawa K., Sashida Y., Xiao P.G. (1995) *Phytochemistry*, 39, 1, pp. 179-84
- [103] Iatsyno A.I., Belova L.F., Lipkina G.S., Sokolov S.I.A., Trutneva E.A. (1978) *Farmakol. Toksikol.*, 41, 5, pp. 556-60, Medline: AN:79024923
- [104] Ida Y., Katsumata M., Satoh Y., Shoji J. (1994) *Planta Med.*, 60, pp. 286-7
- [105] Imbesi A. (1964) *Indice delle Piante: Finora Ammesse nelle Farmacopee Ufficiali dei Diversi Stati del Mondo*, Messina
- [106] Inada A., Nakanishi T., Tokuda H., Nishino H., Iwashima A., Sharma O.P. (1995) *Planta Med.*, 61, pp. 558-9
- [107] Inada A., Somekawa M., Murata H., Nakanishi T., Tokuda H., Nishino H., Iwashima A., Darnaedi D., Murata J. (1993) *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 3, pp. 617-19
- [108] *Index Kewensis* (1895), Clarendon Press, Oxford
- [109] Inoe H., Mori T., Shibata S., Saito H. (1987) *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 9, pp. 3888-93
- [110] Inose Y., Miyase T., Ueno A. (1991) *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 8, pp. 2037-42
- [111] Inose Y., Miyase T., Ueno A. (1992) *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 4, pp. 946-53
- [112] Ishikawa T., Kotake K.I., Ishii H. (1995) *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 6, pp. 1039-41
- [113] Itoigawa M., Takeya K., Furukawa H. (1990) *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 308, pp. 95-103

- [114] Izzi el A., Benie T., Thieulant M.L., Men-Olivier le L., Duval J. (1992) *Planta Med.*, 58, pp. 229-33
- [115] Janeczko Z. (1993) *Rozprawa habilitacyjna*, nakładem AM im. M. Kopernika, Kraków
- [115a] Janik I., Janeczko Z., Sendra J., Burczyk J. (1994) *Fitoterapia*, 65, 5, pp. 476
- [116] Jansakul Ch., Baumann H., Kenne L., Samuelsson G. (1987) *Planta Med.*, pp. 405-9
- [117] Jayasinghe L., Shimada H., Hara N., Fujimoto Y. (1995) *Phytochemistry*, 40, 3, pp. 891-7
- [118] Jayasinghe L., Wannigama G.P., Macleod J.K. (1993) *Phytochemistry*, 34, 4, pp. 1111-6
- [119] Jia Z., Koike K., Ohmoto T., Ni M. (1994) *Phytochemistry*, 37, 5, pp. 1389-96
- [120] Jia Z., Koike K., Nikaido T., Ohmoto T., Ni M. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 11, pp. 2309-14
- [121] Jiang Y., Weniger B., Béji N., Italiano L., Beck J.P., Anton R. (1993) *Planta Med.*, 59, pp. 680-1
- [122] Jimeno M.L., Rumbero A., Vázquez P. (1995) *Phytochemistry*, 40, 3, pp. 899–901
- [123] Kączkowski J. (1993) *Biochemia roślin, Tom 2 - Metabolizm wtórny*, Wydawnictwo Naukowe PWN, W-wa
- [124] Kakuno T., Yoshikawa K., Arihara S., Takei M., Endo K. (1991) *Tetrahedron*, 47, 35, pp. 7219-26
- [125] Kardono L.B.S., Tsauri S., Padmawinata K., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. (1990) *J. Nat. Prod.*, 53, 6, pp. 1447–55
- [126] Karrer W. (1976) *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, pp. 477–86
- [127] Kasai R., Miyakoshi M., Nie R.L., Zhou J., Matsumoto K., Morita T., Nishi M., Miyahara K., Tanaka O. (1988) *Phytochemistry*, 27, 5, pp. 1439-46
- [128] Khan N.U., Parveen N. (1990) *Hamdard*, 38, 1, pp. 30-40
- [129] Khurana S.K., Krishnamoorthy V., Seshadri T.R. (1972) *Curr. Sci.*, 41, 331
- [130] Kim D.S., Chang Y.J., zedk U., Zhao P., Liu Y.Q., Yang Ch. R. (1995) *Phytochemistry*, 40, 5, pp. 1493-97
- [131] Kinjo J., Suyama K., Nohara T. (1995) *Phytochemistry*, 40, 6, pp. 1765–67
- [132] Kinoshita K., Morikawa K., Fujita M., Natori S. (1992) *Planta Med.*, 58, pp. 137-45
- [133] Kirmizigül S., Anil H. (1994) *Phytochemistry*, 36, 6, pp. 1555-6
- [134] Kirmizigül S., Anil H. (1994) *Phytochemistry*, 35, 4, pp. 1075-6
- [135] Kirmizigül S., Anil H., Rose M.E. (1995) *Phytochemistry*, 39, 5, pp. 1171-4
- [136] Kitagawa I., Yoshikawa M., Kobayashi K., Imakura Y., Im K.S., Ikenishi Y. (1980) *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 1, pp. 296-300

- [137] Kitagawa I., Matsuda A., Yosioka I. (1972) *Chem. Pharm. Bull.*, 20, 10, pp. 2226-34
- [138] Kitagawa I., Ikenishi Y., Yoshikawa M., Yosioka I. (1976) *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 10, pp. 2470-79
- [139] Kitagawa I., Matsuda A., Yosioka I. (1968) *Tetrahedron Letters*, 51, pp. 5377-80
- [140] Kitagawa I., Matsuda A., Nishimura T., Hirai S.I., Yosioka I. (1967) *Chem. Pharm. Bull.*, 15, 9, pp. 1435-37
- [141] Koçkar O.M., Kara M., Kara S., Bozan B., Baser K.H.C. (1994) *Fitoterapia*, 65, 5, pp. 439-43
- [142] Kohda H., Takeda O., Tanaka S. (1989) *Chem. Pharm. Bull.* 37, 12, pp. 3304-05
- [143] Kohlmünzer S. (1993) *Farmakognozja - podręcznik dla studentów farmacji*, PZWL, W-wa
- [144] König W.A., Faasch H., Heitsch H., Colberg C., Hausen B.M. (1993) *Zeitschrift für Naturforschung, Sect. B-A, J. Chem. Sci.*, 48, 3, pp. 387-93
- [145] Konoshima T., Kozuka M., Sawada T., Kimura T. (1987) *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 1, pp. 46-52
- [146] Korta J. (1970) *Acta Biol. Cracov.*, 13, 2, pp. 143-54
- [147] Korta J. (1969) *Acta Biol. Cracov.*, 12, 1-2, pp. 1-7
- [148] Kubo I., Chaudhuri S.K. (1994) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 4, 9, pp. 1131-4
- [149] Kubo I., Kim M., Ganjian I. (1987) *Tetrahedron*, 43, 12, pp. 2653-60
- [150] Kubo I., Kamikawa T., Miura I. (1983) *Tetrahedron Letters*, 24, 36, pp. 3825-8
- [151] Kumazawa Y., Kawakita T., Takimoto H., Nomoto K. (1990) *Int. J. Immunopharmacol.*, 12, 5, pp. 531-7
- [152] Kumazawa Y., Takimoto H., Nishimura C., Kawakita T., Nomoto K. (1989) *Int. J. Immunopharmacol.*, 11, 1, pp. 21-8
- [153] Kusano G., Idoji M., Sogoh Y., Shibano M., Kusano A., Iwashita T. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 5, pp. 1106-10
- [154] Lacaille-Dubois M.A., Hanquet B., Rustaiyan A., Wagner H. (1993) *Phytochemistry*, 34, 2, pp. 489-95
- [155] Lacaille-Dubois M.-A., Hanquet B., Cui Z.H., Lou Z.C., Wagner H. (1995) *Phytochemistry*, 40, 2, pp. 509-14
- [156] Lambert J.D.H., Temmink J.H.M., Marquis J., Parkhurst R.M., Lugt Ch.B., Lemmich E., Wolde-Yohannes L., Savigny de D. (1991) *Regulatory Toxicol. and Pharmacol.*, 14, pp. 189-201
- [157] Lauer U., Anke T., Hansske F. (1991) *J. of Antibiotics*, 44, 1, pp. 59-65
- [158] Lavaud C., Massiot G., Barrera J.B., Morreti Ch., Men-Olivier L. (1994) *Phytochemistry*, 37, 6, pp. 1671-77
- [159] Lemmich E., Cornett C., Furu P., Jorstian C.L., Knudsen A.D., Olsen C.E., Salih A., Thiilborg S.T. (1995) *Phytochemistry*, 39, 1, pp. 63-8

- [160] Li X.C., Yang Ch.R., Liu Y.Q., Kasai R., Ohtani K., Yamasaki K., Miyahara K., Shingu K. (1995) *Phytochemistry*, 39, 5, pp. 1175-9
- [161] Li H., Yuan Z., Wei Y. (1988) *Shenang Yaoxveyuan Xuebao* 5, 3, pp. 208-12, Medline
- [162] Łuczak S., Świątek L., Daniewski M. (1989) *Acta Pol. Pharm.*, 46, 4, pp. 381-5
- [163] Luo S.Q., Lin L.Z., Cordell G.A. (1993) *Phytochemistry*, 33, 5, pp. 1197-205
- [164] Mahato S.B., Pal B.C., Nandy A.K. (1992) *Tetrahedron*, 48, 32, pp. 6717-28
- [165] Mahato S.B., Nandy A.K., Roy G. (1992) *Phytochemistry*, 31, 7, pp. 2199-249
- [166] Mahato S.B., Sahu N.P., Roy S.K., Seu S. (1991) *Tetrahedron*, 47, 28, pp. 5215-30
- [167] Mahato S.B., Nandy A.K. (1991) *Phytochemistry*, 30, 5, pp. 1357-90
- [168] Mahato S.B., Kundu A.P. (1994) *Phytochemistry*, 37, 6, pp. 1517-75
- [169] Mansouri L., Henry M. (1995) *Pharmazie*, 9, pp. 642-43
- [170] Margineanu C., Cucu V., Grecu L., Pârvu C. (1976) *Planta Med.*, 30, pp. 35-8
- [171] Marini-Bettólo G.B. (1971) w *Pharmacognosy and Phytochemistry*, ed. Wagner H., Hörhammer L., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [172] Marston A., Chapuis J. Ch., Sordat B., Msonthi J.D., Hostettmann K. (1986) *Planta Med.*, pp. 207-10
- [173] Melek F.R., Abdel-Khalik S.M., Miyase T., Haggag M.Y. (1994) *Fitoterapia*, 65, 4, pp. 363-6
- [174] Midiwo J.O., Ghebremeskel Y. (1993) *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 7, 1, pp. 67-9, Chemistry Citation Index: TGA No.: LW280
- [175] Midiwo J.O., Ghebremeskel Y., Arot J. M., Koyama K., Natori S. (1992) *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 6, 1, pp. 15-19, Chemistry Citation Index: TGA No.: KT944
- [176] Midiwo J.O., Ghebremeskel Y. (1993) *Int. J. BioChemPhysics*, 2, 1-2, pp. 117-8
- [177] Midiwo J.O., Odingo J.O., Arot L.M. (1990) *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 4, 1, pp. 71-3, *Chem. Abstr.* 1991, 114:98170a
- [178] Mimaki Y., Nishino H., Ori K., Kuroda M., Matsui T., Sashida Y. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 2, pp. 327-32
- [179] Miyase T., Andoh T., Ueno A. (1995) *Phytochemistry*, 40, 5, pp. 1499-502
- [180] Miyase T., Inose Y., Veno A. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 3, pp. 617-24
- [181] Mohamed K.M., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K. (1995) *Phytochemistry*, 40, 4, pp. 1237-42
- [182] Mohammad F.V., Noorwala M., Ahmad V.U., Sener B. (1995) *Phytochemistry*, 40, 1, pp. 213-8
- [183] Moreno M., Rodriguez V.M. (1981) *Phytochemistry*, 20, 6, pp. 1446-7
- [184] Mori F., Miyase T., Ueno A. (1994) *Phytochemistry*, 36, 6, pp. 1485-8

- [185] Mowszowicz J. (1983) *Przewodnik do oznaczania krajowych roślin zielarskich*, PWRiL, W-wa
- [186] Mowszowicz J. (1986) *Krajowe chwasty polne i ogrodowe. Przewodnik do oznaczania*, PWRiL, W-wa
- [187] Mowszowicz J. (1986) *Zarys systematyki roślin*, PWN, W-wa
- [188] Mowszowicz J. (1980) *Pospolite rośliny naczyniowe Polski*, PWN, W-wa
- [189] Naito T., Niitsu K., Ikeya Y., Okada M., Mitsuhashi H. (1992) *Phytochemistry*, 31, 5, pp. 1787-89
- [190] Nakamura T., Takeda T., Ogihara Y. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 5, pp. 1111-5
- [191] Nakata H., Sasaki K., Morimoto I., Hirata Y. (1964) *Tetrahedron*, 20, pp. 2319-23
- [192] Ndamba J., Lemmich E., Mølgaard P. (1994) *Phytochemistry*, 35, 1, pp. 95-9
- [193] Nielsen S.E., Anthoni U., Christophersen C., Cornett C. (1995) *Phytochemistry*, 39, 3, pp. 625-30
- [194] Noorwala M., Mohammad F.V., Ahmad V.U., Sener B. (1994) *Phytochemistry*, 36, 2, pp. 439-43
- [195] Nose M., Ito M., Kamimura K., Shimizu M., Ogihara Y. (1994) *Planta Med.*, 60, pp. 136-9
- [196] Nose M., Amagaya S., Ogihara Y. (1989) *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 10, pp. 2736-40
- [197] Nowiński M (1980) *Dzieje roślin leczniczych*, PWRiL, W-Wa
- [198] Numata A., Kanbara S., Takahashi Ch., Fujiki R., Yoneda M., Fujita E., Nabeshima Y. (1991) *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 8, pp. 2129-31
- [199] Ogawa H., Sakaki S., Yoshihira K., Natori S. (1968) *Tetrahedron Letters*, 11, pp. 1387-92
- [200] Ogawa H., Natori S. (1968) *Phytochemistry*, 7, pp. 773-82
- [201] Ogihashi H., Takamura H., Koshimizu K., Tokuda H., Ito Y. (1986) *Cancer Lett.*, 30, 2, pp. 143-51, Medline: AN: 86161439
- [202] Ogura M., Cordell G.A., Farnsworth N.R. (1976) *Lloydia*, 39, 4, pp. 255-7
- [203] Ogura M., Cordell G.A., Farnsworth N.R. (1977) *Lloydia*, 40, 2, pp. 127-220
- [204] Ohashi K., Kojima H., Tanikawa T., Okumura Y., Kawazoe K., Tataru N., Shibuya H., Kitagawa I. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 8, pp. 1596-1600
- [205] Ohtani K., Mavi S., Hostettmann K. (1993) *Phytochemistry*, 33, 1, pp. 83-6
- [206] Oulad-Ali A., Jiang Y., Weniger B., Italiano L., Beck J.P., Anton R., Guillaume D. (1993) *Planta Med.*, 59, pp. 679-80
- [207] Oulad-Ali A., Guillaume D., Weniger B., Jiang Y., Anton R. (1994) *Phytochemistry*, 36, 2, pp. 445-8
- [208] Pant P., Rastogi R.P. (1979) *Phytochemistry*, 18, pp. 1095-108

- [209] Pawłowski B. (1963) *Flora Polska*, tom X, PWN, W-wa, Kraków
- [210] Phongpaichit S., Schneider E.F., Picman A.K., Tantiwachwuttikul P., Wiriyaichitra P., Arnason J.T. (1995) *Biochem. Syst. Ecol.* 23, 1, pp. 17-25, *Chem. Abstr.* 1995, 122: 209574x
- [211] Pistelli L., Cammilli A., Manunta A., Marsili A., Morelli I. (1993) *Phytochemistry*, 33, 6, pp. 1537-39
- [212] Podbielkowski Z. (1987) *Roślinność kuli ziemskiej*, Wyd. Szk. i Ped., W-wa
- [213] Polonsky J., Fourrey J.L. (1964) *Tetrahedron Letters*, 52, pp. 3983-90
- [214] Popov A.M., Rovin Y.G., Anisimov M.M., Likhatskaia G.N., Strigina L.I. (1982) *Biofizika*, 27, 5, pp. 827-31, Medline: AN:83049214
- [215] Poprzęcki W. (1983) *Rośliny lecznicze*, W-wa
- [216] Prum N., Pichon P., Raynaud J. (1972) *Plant. Med. Phytother.*, 6, 4, pp. 267-70
- [217] Prum N. (1973) *Thèse de Docteur*, L'Université Claude-Bernard, Lyon, Francja
- [218] Prum N., Pichon P. (1971) *Bull. Trav. Soc. Pharm.*, 15, 2, pp. 67-72
- [219] Quetin-Leclercq J., Elias R., Balansard G., Bassleer R., Angenot L. (1992) *Planta Med.*, 58, pp. 279-81
- [220] Racz G., Fuzi I., Domokos L. (1965) *Rev. Med.* 11, pp. 56-8, *Chem. Abstr* 67(4):14802h
- [221] Rajasekaran M., Bapna J.S., Lakshmanan S., Ramachandran-Nair A.G., Veliath A.J., Panchanadam M. (1988) *J. Ethnopharmacol.*, 24, 1, pp. 115-21
- [222] Rao Ch.B., Venkateswarlu V. (1962) *Tetrahedron*, 18, pp. 361-4
- [223] Rasool N., Khan A.Q., Ahmad V.U., Malik A. (1991) *Phytochemistry*, 30, 8, pp. 2800-3
- [224] Recio del Carmen M., Giner R.M., Mániz S., Rios J.L. (1995) *Planta Med.*, 61, pp.182-5
- [225] Reznicek G., Schröder H., Schubert-Zsilavec M., Schöpke Th., Lehrkinder S., Haslinger E., Hiller K., Jurenitsch J., Kubelka W. (1994) *Pharmazie*, 1, pp.58-61
- [226] Reznicek G., Jurenitsch J., Robien W., Kubelka W. (1989) *Phytochemistry*, 28, 3, pp. 825-8
- [227] Rhee Y.H., Ahn J.H., Choe J., Kang K.W., Joe C. (1991) *Planta Med.*, 57, pp. 125-8
- [228] Rodriguez J., Quiñoá E., Riguera R., Peters B.M., Abrell L.M., Crews P. (1992) *Tetrahedron*, 48, 32, pp. 6667-80
- [229] Rodriguez J., Castro R., Riguera R. (1991) *Tetrahedron*, 47, 26, pp. 4753-62
- [230] Rogers C.B. (1995) *Phytochemistry*, 40, 3, pp. 833-6
- [231] Rostafiński J. (1893) *Zielnik czarodziejski, to jest zbiór przesądów o roślinach*, Kraków
- [232] Rostafiński J. (1900) *Słownik polskich imion, rodzajów oraz wyższych skupień roślin*, Kraków
- [233] Rücker G., Mayer R., Shin-Kim J.S. (1991) *Planta Med.*, 57, pp. 468-71

- [234] Rządowska-Bodalska H., Olechnowicz-Stępień J. (1975) *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 27, 3, pp. 345-8
- [235] Sadowska A. (1991) *Rośliny i roślinne substancje przeciwnowotworowe*, PWN, W-wa
- [236] Sakai S., Katsumata M., Satoh Y., Nagasao M., Miyakoshi M., Ida Y., Shoji J. (1994) *Phytochemistry*, 35, 5, pp. 1319-24
- [237] Sander H., Wójcik Z. (1972) *Kalendarz przyrody WP*, W-wa
- [238] Sawada H., Miyakoshi M., Isoda S., Ida Y., Shoji J. (1993) *Phytochemistry*, 34, 4, pp. 1117–21
- [239] Schöpke Th., Hiller K. (1990) *Pharmazie*, 45, 5, pp. 313-42
- [240] Schöpke Th., Hasan Agha M.I., Wray V., Hiller K. (1994) *Phytochemistry*, 36, 2, pp. 449-53
- [241] Schöpke Th., Hasan Agha M.I., Kraft R., Otto A., Hieler K. (1993) *Sci. Pharm.*, 61, pp. 145-53
- [242] Segal R., Shatkovsky P., Milo-Goldzweig I. (1974) *Biochem. Pharmac.*, 23, pp. 973-81
- [243] Segal R., Milo-Goldzweig I. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 512, pp. 223-26
- [244] Segal R., Mansour M., Zaitschek D.V. (1966) *Biochem. Pharmac.*, 15, pp. 1411-16
- [245] Segal R., Milo-Goldzweig I., Shupper H., Zaitschek D.V. (1970) *Biochem. Pharmac.*, 19, pp. 2501-07
- [246] Segiet-Kujawa E. (1991) *J. Nat. Prod.*, 54, 4, pp. 1044-8
- [247] Seki K., Haga K., Kaneko R. (1995) *Phytochemistry*, 38, 4, pp. 965-73
- [248] Sekurai N., Koeda M., Inove T., Nagai M. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 1, pp. 48-51
- [249] Sen S., Sahu N.P., Mahato S.B. (1993) *Tetrahedron*, 49, 40, pp. 9031-38
- [250] Shao B., Qin G., Xu R., Wu H., Ma K. (1995) *Phytochemistry*, 38, 6, pp. 1473–9
- [251] Shao Y., Zhou B.N., Ma K., Wu H.M. (1995) *Planta Med.*, 61, pp. 246–9
- [252] Shao Y., Zhou B., Ma K., Wu H., Lin L., Cordell G.A. (1995) *Phytochemistry*, 39, 4, pp. 875-81
- [253] Shao Y., Zhou B.N., Gao J.H., Lin L.Z., Cordell G.A. (1995) *Phytochemistry*, 38, 3, pp. 675-80
- [254] Shao Y., Zhou B.N., Lin L.Z., Cordell G.A. (1995) *Phytochemistry*, 38, 4, pp. 927-33
- [255] Shao Y., Zhou B.N., Lin L.Z., Cordell G.A. (1995) *Phytochemistry*, 38, 6, pp. 1487-92
- [256] Shibata S. (1976) *New Natural Product and Plant Drugs with Pharmacological Biological or Therapeutic Activities (Proceedings of the 1st International Congress on Medicinal Plant Research, Sekt A.)* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977, pp. 177-96
- [257] Shoji N., Umeyama A., Saitou N., Yoshikawa K., Nagai M., Arihara S. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 7, pp. 1422-6
- [258] Shoji N., Umeyama A., Takemoto T. (1984) *J. Nat. Prod.*, 47(3), pp. 530-2

- [259] Shoji N., Umeyama A., Yoshikawa K., Arihara S. (1994) *Phytochemistry*, 37, 5, pp. 1397-402
- [260] Shoji N., Umeyama A., Yoshikawa K., Arihara S. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 9, pp. 1750-5
- [261] Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. (1991) *Spectrometric identification of organic compounds*, wyd. 5, John Wiley and Sons, Inc., Nowy Jork, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- [262] Son K.H., Jung K.Y., Chang H.W., Kim H.P., Kang S.S. (1994) *Phytochemistry*, 35, 4, pp.1005-8
- [263] Srivastava S.K., Srivastava S.D. (1994) *Fitoterapia*, 55, 4, pp. 301-3
- [264] Strauss A., Spengel S. M., Schaffner W. (1995) *Phytochemistry*, 38, 4, pp. 861-5
- [265] Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Walewska E. (1978) *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*, PZWL, W-wa
- [266] Sugishita E., Amagaya S., Ogihara Y. (1983) *J. Pharmacobiodyn.*, 6, 5, pp. 287-94
- [267] Sun R.Q., Jia Z.J., Cheng D.L., Zhu Z.Q. (1992) *Planta Med.*, 58, pp. 211-13
- [268] Swain T. (1963) *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press, London, New York
- [269] Szafer W. (1959) *Szata roślinna Polski*, PWN, W-wa
- [270] Szweykowska A., Szweykowski J. (1986) *Botanika*, PWN, W-wa
- [271] Takechi M., Shimada S., Tanaka Y. (1992) *Planta Med.*, 58, pp. 128-30
- [272] Takechi M., Tanaka Y. (1995) *Planta Med.*, 61, pp. 76-7
- [273] Takeshita T., Yokoyama K., Yi D., Kinjo J., Nohara T. (1991) *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 7, pp. 1908-10
- [274] Tétényi P. (1970) *Intraspecific Chemical Taxa Medicinal Plants*, Akademiai Kiado, Budapest
- [275] Thapliyal R.P., Bahuguna R.P. (1993) *Phytochemistry*, 33, 3, pp. 671–3
- [276] Thiilborg S.T., Christensen S. B., Cornett C., Olsen C.E., Lemmich E. (1994) *Phytochemistry*, 36, 3, pp. 753-9
- [277] Tian Z., Chang M.N., Sandrino M., Huang L., Pan J.X., Arison B., Smith J., Lam Y.K.T. (1987) *Phytochemistry*, 26, 8, pp. 2361-2
- [278] Tokuda H., Ohigashi H., Koshimizu K., Ito Y. (1986) *Cancer Lett.*, 33, 3, pp. 279-85
- [279] Tolgyesi G., Kozma A. (1983) *Tiscia*, 18, pp. 71-5, *Chem. Abstr.* 102(13):109827a
- [280] Tommasi de N., Conti C., Stein M.L., Pizza C. (1991) *Planta Med.*, 57, pp. 250-3
- [281] Tommasi de N., Piacente S., Simone de F., Pizza C. (1993) *J. Nat. Prod.*, 56, 10, pp. 1669-75
- [282] Tschesche R., Wulff G. (1964) *Planta Med.*, 12, 272
- [283] Tschesche R., Ziegler F. (1964) *Liebigs Ann. Chem.*, 674, pp. 185-95

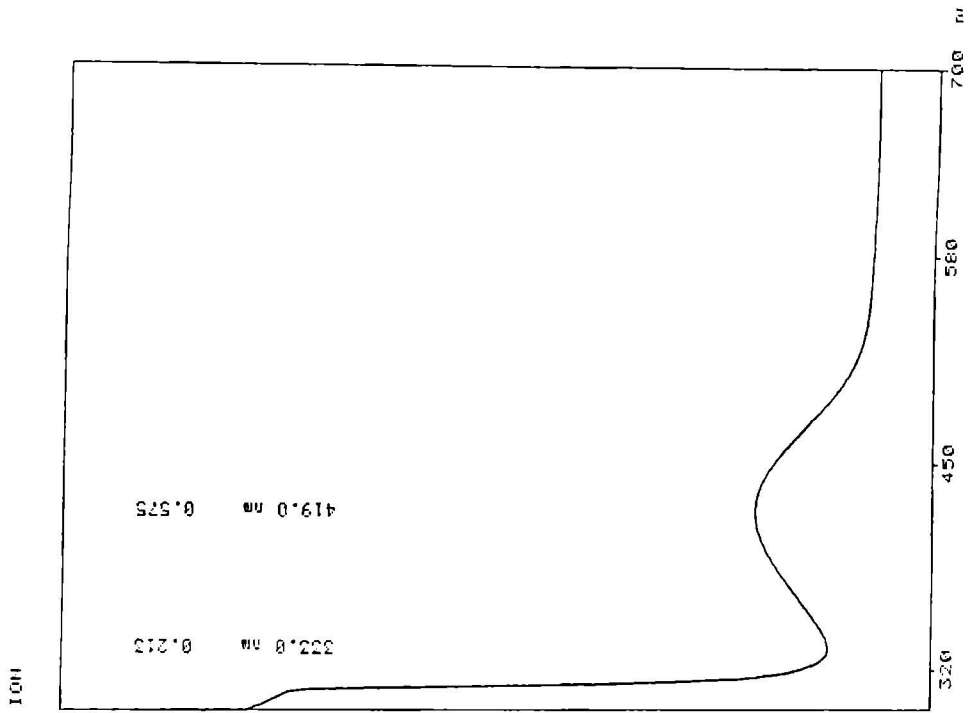
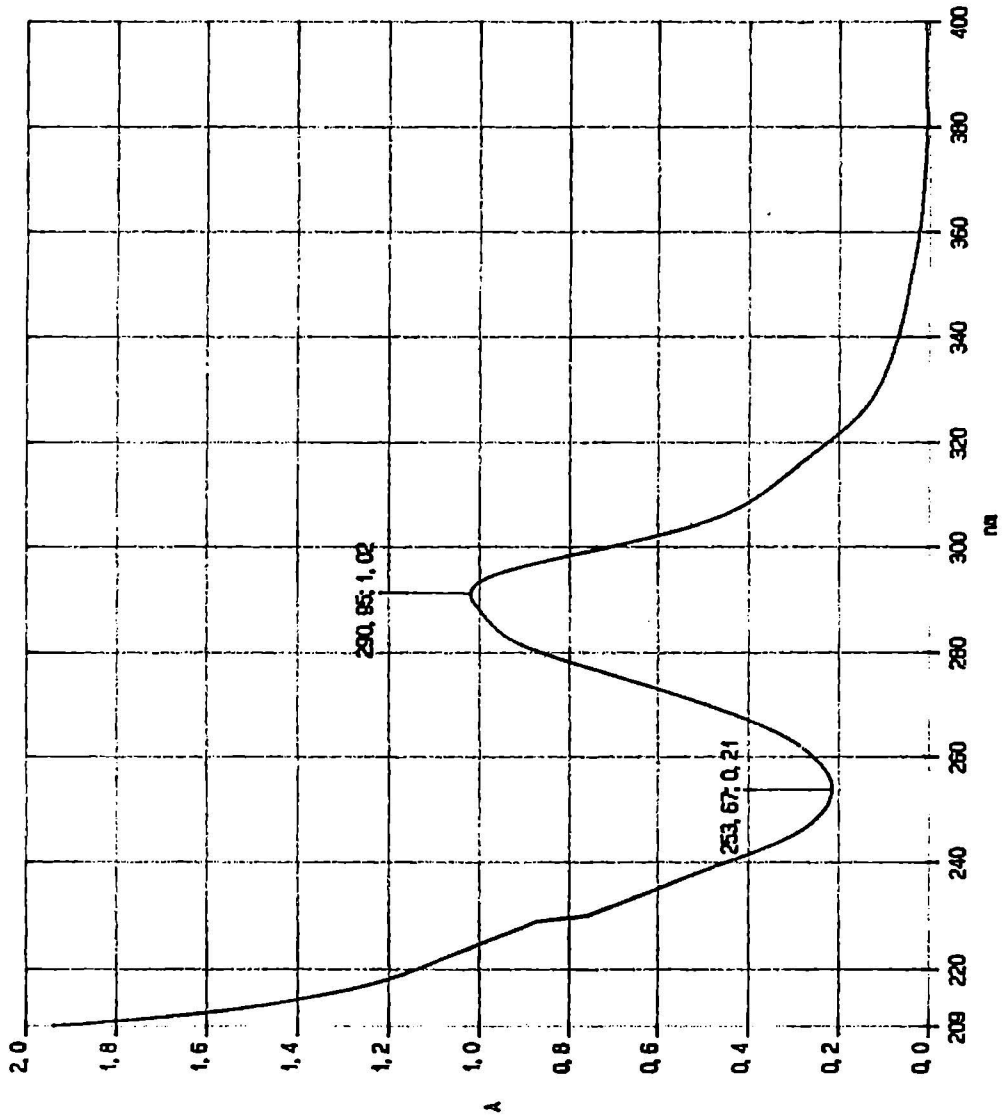
- [284] Tschesche R. (1971) w *Pharmacognosy & Phytochemistry*, ed. Wagner H., Hörhammer L., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 274-89
- [285] Tschesche R., Wiemann W. (1977) *Chem. Ber.*, 110, pp. 2407-15
- [286] Tschesche R., Tjoa B.T., Wulff G. (1966) *Liebigs Ann. Chem. Bol.*, 696, pp. 160-79
- [287] Tschesche R., Wulff G. (1963) *Tetrahedron*, 19, pp. 621-34
- [288] Umek A. (1982) *Farm. Vestn.*, 33, 1, pp. 15-20
- [289] Ushio Y., Abe H. (1992) *Planta Med.*, 58, pp. 171-3
- [290] Vigneau Ch. (1985) *Plantes Médicinales: thérapeutiques- toxicité*, Masson, Paris, New York
- [291] Viqar V.A., Viqar S., Shoib A., Quazi N.S. (1988) *Phytochemistry*, 27, 1, pp. 304-6
- [292] Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M. (1984) *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- [293] Wagner H., Proksch A. (1985) *Economic and Medicinal Plant Research*, Academic Press, London, pp. 113-44
- [294] Wang Y., Wu J., Wang X., Zhang F. (1994) *Baiquien Yike Daxue Xuebao*, 20, 6, pp. 551-4, *Chem. Abstr.* 1995, 122: 281875p
- [295] Wang H.B., Mayer R., Rücker G. (1993) *Phytochemistry*, 33, 6, pp. 1469-73
- [296] Wang M., Guan X., Han X., Hong S. (1992) *Planta Med.*, 58, pp. 205-7
- [297] Wang S.M, Sun R., Li S., Wang Y., Xiao X., Hao L., Ma X. (1995) *Chem. Abstr.* 122:122879b
- [298] Waterman P.G., Mbi C.N. (1979) *Planta Med.*, 37, pp. 241-6
- [299] Wijnsma R., Weerden van I.N., Verpoorte R., Harkes P.A.A., Lugt Ch.B., Scheffer J.J.C., Baerheim-Svendsen A. (1986) *Planta Med.*, pp. 211-2
- [300] Wolters B. (1966) *Planta Med.*, 4, pp. 392-401
- [301] Wolters B. (1969) *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, 1, pp. 42-50
- [302] Wong S.M., Pezzuto J.M., Fong H.H.S., Farnsworths N.R. (1985) *J. Pharm. Sci.*, 74, 10, pp. 1114-6
- [303] Wulff G. (1968) *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, 108, 23, pp. 797-807
- [304] Yagi A., Okamura N., Haraguchi H., Abo T., Hashimoto K. (1993) *Phytochemistry*, 33, 1, pp. 87-91
- [305] Yaguchi E., Miyase T., Ueno A. (1995) *Phytochemistry*, 39, 1, pp. 185-9
- [306] Yahara S, Ding N., Nahara T (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 6, pp. 1336-8
- [307] Yamaguchi N., Kohno H., Tawara M., Odashima S., Abe H. (1985) *Int. J. Immunopharmacol.*, 7, 6, pp. 827-32

- [308] Yamaguchi K. (1970) *Spectral Data of Natural Products*, Vol.1, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London
- [309] Yamamoto R., Miyase T., Ueno A. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 6, pp. 1291-6
- [310] Yamamura S., Simpol L.R., Ozawa K., Ohtani K., Otsuka H., Kasai R., Yamasaki K., Padolina W.G. (1995) *Phytochemistry*, 39, 1, pp. 105-10
- [311] Yang S.J. (1994) *Aichi Ike Daigaku Igakukai Zasshi*, 22, 6, pp. 697-705, *Chem. Abstr.* 1995, 122:281784h
- [312] Yasukawa K., Takido M. (1988) *Phytochemistry*, 27, 9, pp. 3017-19
- [313] Yasukawa K., Ogawa H., Takido M. (1990) *Phytochemistry*, 29, 5, pp. 1707-8
- [314] Yasukawa K., Sekine H., Takido M. (1989) *Phytochemistry*, 28, 8, pp. 2215-6
- [315] Ye W.C., Ou B.X., Ji N.N., Zhao S.X., Ye T., Mc Kerverey A., Stevenson P. (1995) *Phytochemistry*, 39, 4, pp. 937-9
- [316] Yen M.H., Lin C.C., Chuang C.H., Lin S.C. (1994) *Fitoterapia*, 65, 5, pp. 409-17
- [317] Yoshikawa M., Murakami T., Ueno T., Kadoya M., Matsuda H., Yamahara J., Murakami N. (1995) *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 2, pp. 350-2
- [318] Yoshiki Y., Kim J.H., Okubo K., Nagoya I., Sakabe T., Tamura N. (1995) *Phytochemistry*, 38, 1, pp. 229-31
- [319] Yoshimitsu H., Hayashi K., Kumabe M., Nohara T. (1994) *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 1, pp. 101-4
- [320] Yu S.S., Yu D.Q., Liang X.T. (1995) *Phytochemistry*, 38,3, pp. 695-8
- [321] Yu L., Ma R., Wang Y., Nishino H. (1994) *Planta Med.*, 60, pp. 204-8
- [322] Zhao W., Xu J., Qin G., Xu R. (1995) *Phytochemistry*, 39, 1, pp. 191-3
- [323] Zwaving J.H. (1971) *Pharm. Weekblad*, 106, pp. 629-48

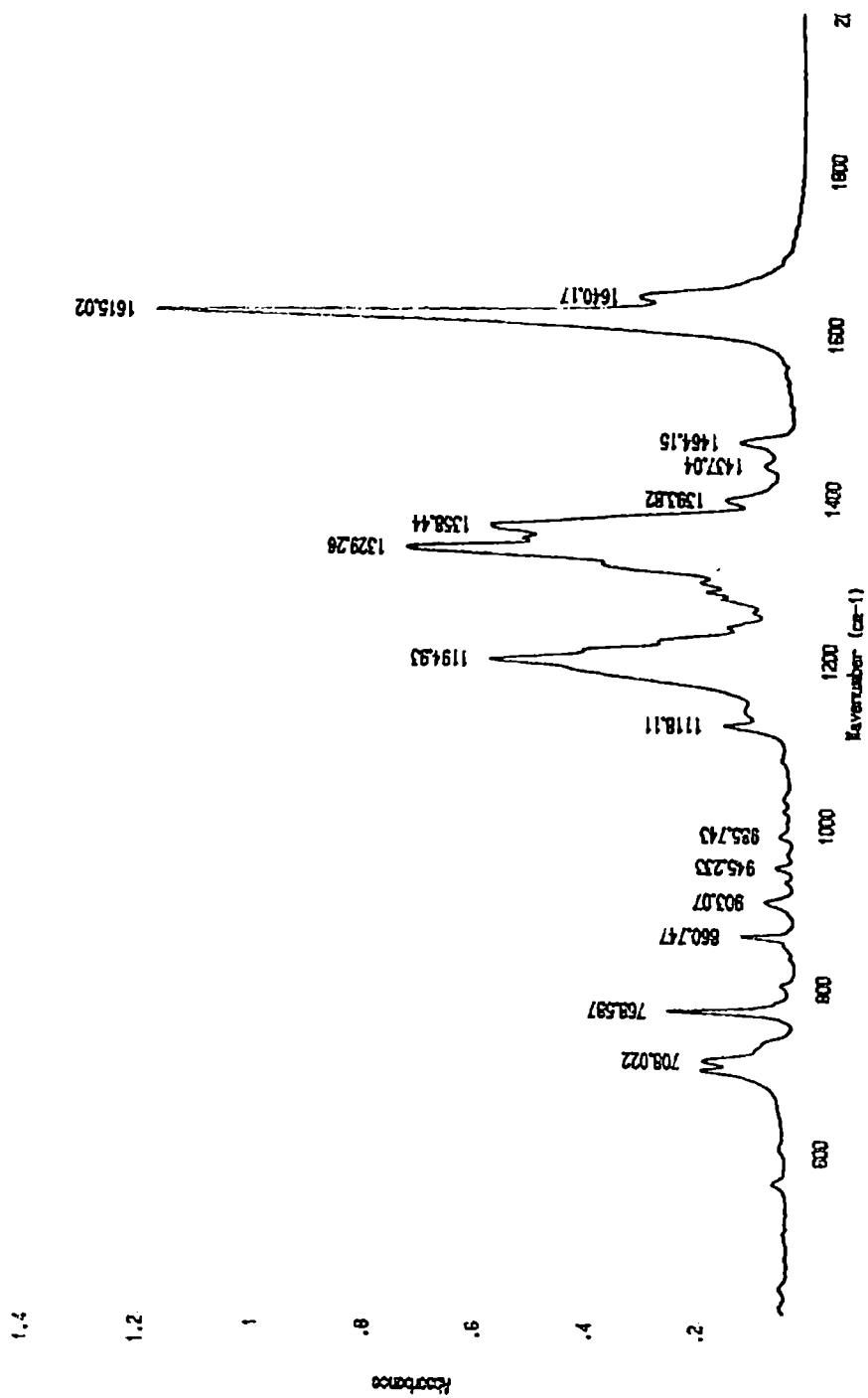
Spis widm

| | | |
|---------|---|---------|
| Rys. 50 | Widmo UV substancji BQ..... | str.138 |
| Rys. 51 | Widmo IR substancji BQ..... | 139 |
| Rys. 52 | Widmo IR embeliny i rapanonu..... | 140 |
| Rys. 53 | Widmo IR embeliny i rapanonu (zakres 600 - 1400 cm ⁻¹)..... | 141 |
| Rys. 54 | Porównawcze widmo IR embeliny i substancji BQ (zakres 600 - 1800 cm ⁻¹)..... | 142 |
| Rys. 55 | Widmo ¹ H NMR substancji BQ..... | 143 |
| Rys. 56 | Widmo ¹³ C NMR substancji BQ..... | 144 |
| Rys. 57 | Widmo korelacyjne ¹ H - ¹³ C NMR (HETCOR) substancji BQ..... | 145 |
| Rys. 58 | Widmo EIMS substancji BQ..... | 146 |
| Rys. 59 | Chromatogram gazowy (GLC) substancji BQ..... | 147 |
| Rys. 60 | Widmo IR substancji BQ oraz acetylowej pochodnej..... | 148 |
| Rys. 61 | Widmo IR substancji BQ i pochodnej metylowej..... | 149 |
| Rys. 62 | Chromatogram gazowy estrów metylowych kwasów tłuszczowych - produktów utlenienia substancji BQ nadmanganianem potasu..... | 150 |
| Rys. 63 | Widmo IR saponozydu B..... | 151 |
| Rys. 64 | Widmo FAB-MS saponozydu B..... | 152 |
| Rys. 65 | Widmo ¹ H NMR saponozydu B (metanol- <i>d</i> ₄ , 200 MHz)..... | 153 |
| Rys. 66 | Widmo ¹ H NMR saponozydu B (pirydyna- <i>d</i> ₅ , 500.13 MHz)..... | 154 |
| Rys. 67 | Widmo ¹³ C NMR saponozydu B..... | 155 |
| Rys. 68 | Widmo IR aglikonu saponozydu B..... | 156 |
| Rys. 69 | Widmo EIMS aglikonu saponozydu B..... | 157 |
| Rys. 70 | Widmo ¹ H NMR aglikonu saponozydu B..... | 158 |
| Rys. 71 | Widmo ¹³ C NMR aglikonu saponozydu B..... | 159 |
| Rys. 72 | Widmo IR saponozydu A..... | 160 |
| Rys. 73 | Widmo LSIMS saponozydu A..... | 161 |
| Rys. 74 | Widmo ¹ H NMR saponozydu A (metanol- <i>d</i> ₄)..... | 162 |
| Rys. 75 | Widmo ¹ H NMR saponozydu A (pirydyna- <i>d</i> ₅)..... | 163 |
| Rys. 76 | Widmo korelacyjne HOHAHA saponozydu A..... | 164 |
| Rys. 77 | Widmo korelacyjne ¹ H - ¹ H COSY saponozydu A..... | 165 |
| Rys. 78 | Widmo NOESY saponozydu A..... | 166 |
| Rys. 79 | Widmo ¹³ C NMR saponozydu A..... | 167 |
| Rys. 80 | Widmo DEPT saponozydu A..... | 168 |
| Rys. 81 | Widmo IR prosapogeniny saponozydu A..... | 169 |
| Rys. 82 | Widmo LSIMS prosapogeniny saponozydu A..... | 170 |
| Rys. 83 | Widmo ¹ H NMR prosapogeniny saponozydu A..... | 171 |
| Rys. 84 | Krzywe przeżywalności komórek linii CHO, melanomy mysiej S91, melanomy ludzkiej BM, pod wpływem saponozydu B i substancji BQ..... | 172 |

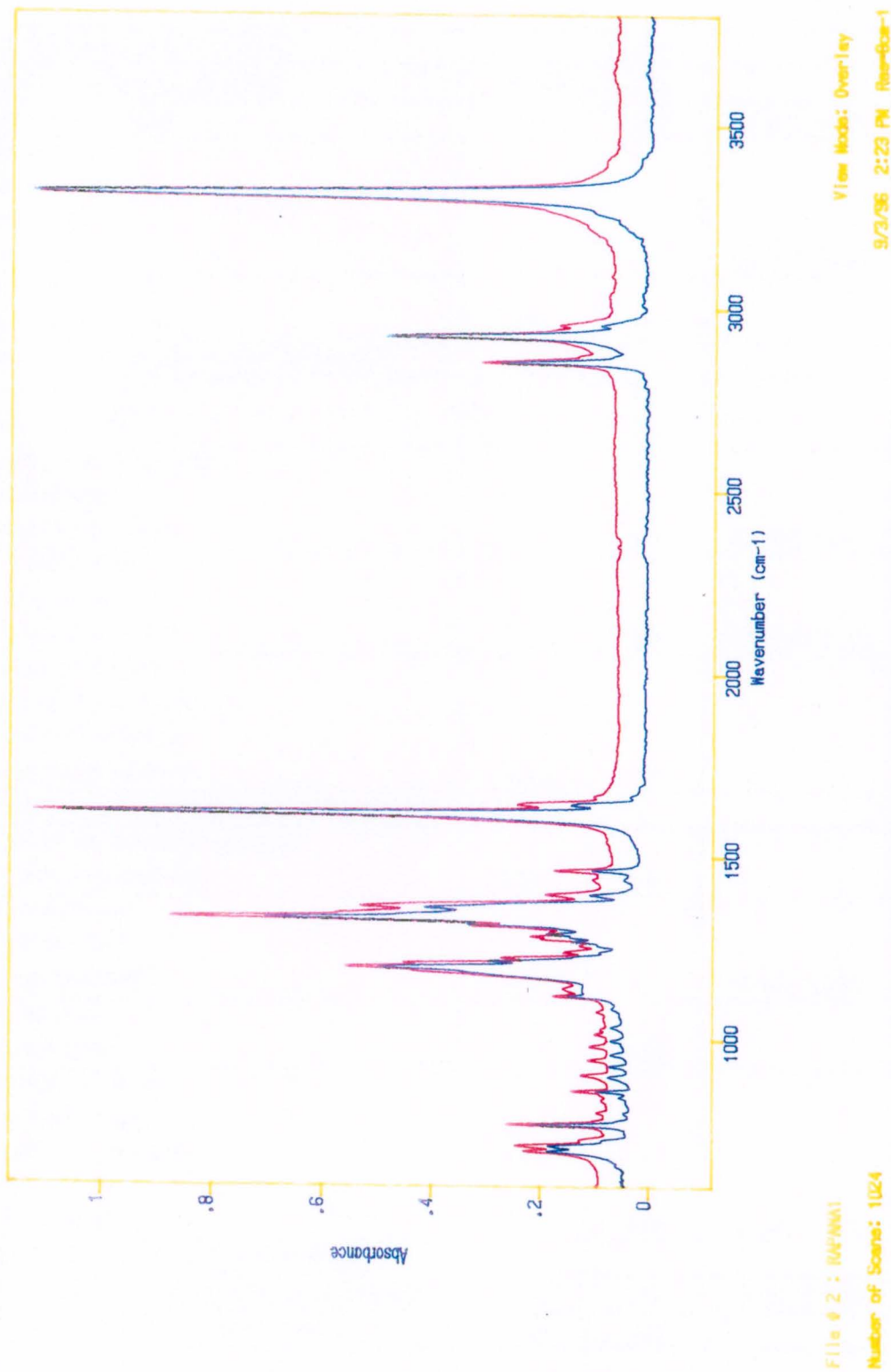
Date: 6.11.96 Time: 13:17:13



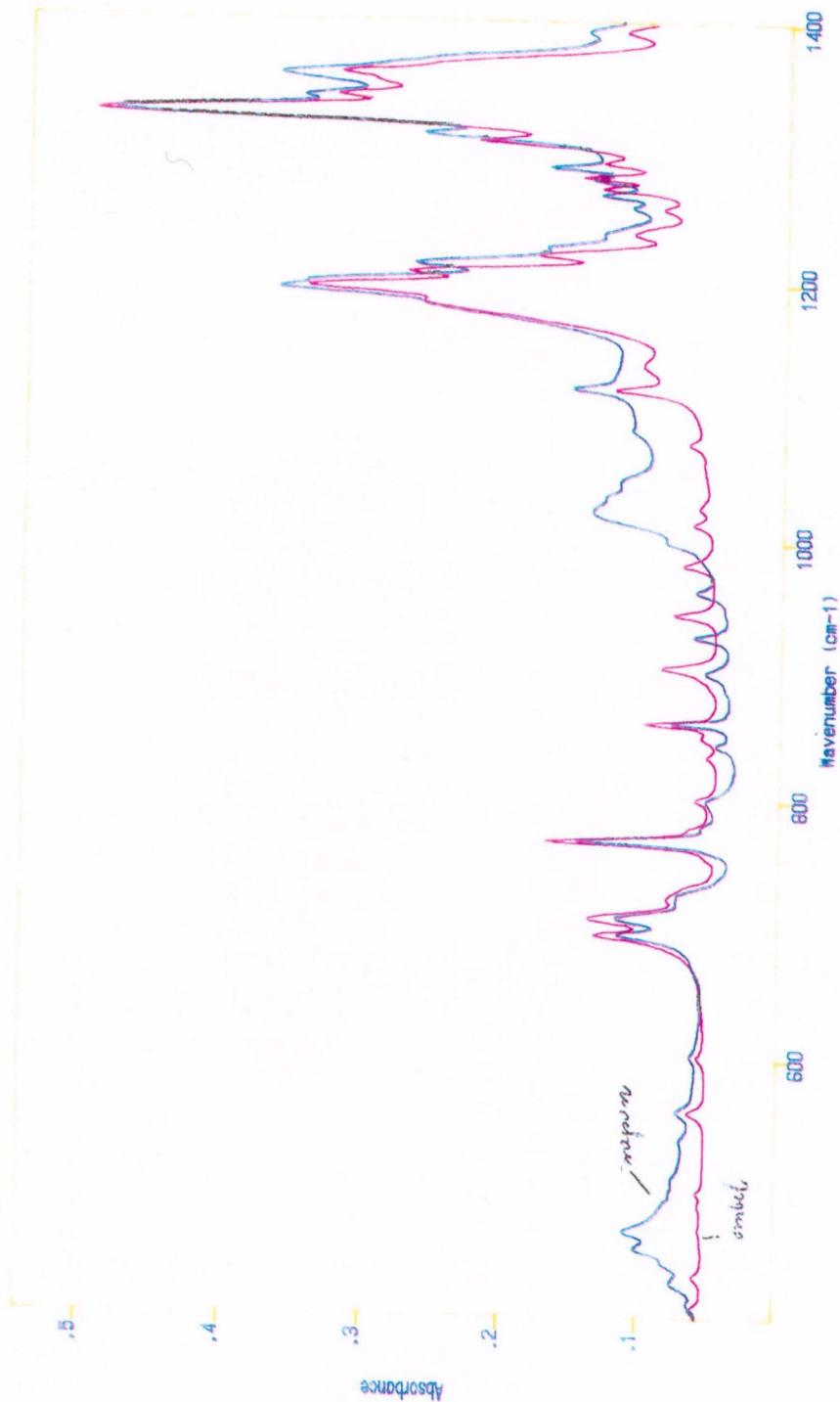
Rys. 50 Widmo UV substancji BQ (etanol, A: stężenie 5×10^{-5} , B: stężenie 1×10^{-4}).



Rys. 51 Widmo IR substancji BQ.



Rys. 52 Widmo IR embeliny (kolor czerwony) i rapanonu (niebieski).

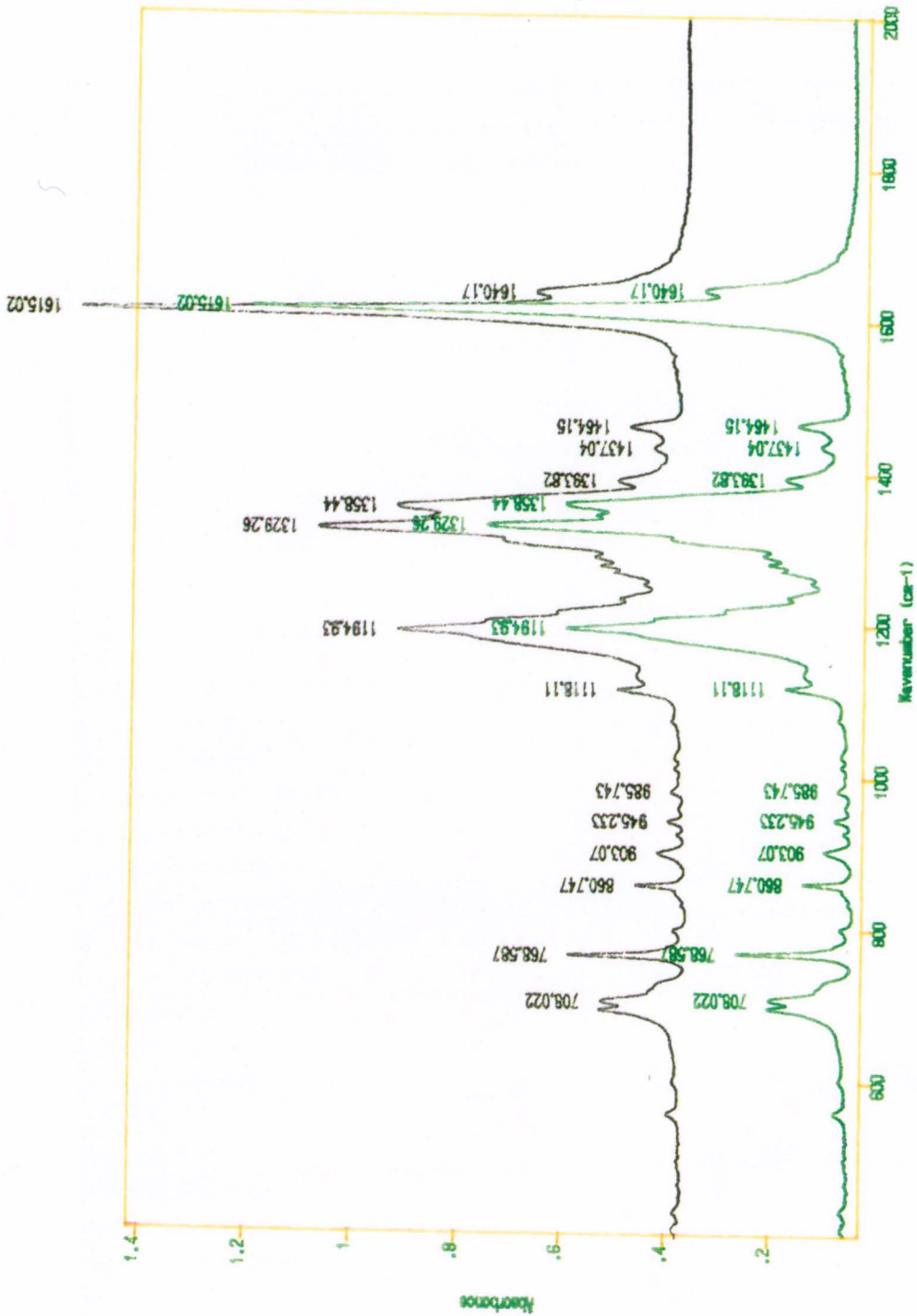


File # 2 : RAPANU
 Number of Scans: 256

(to tablette KBR)

View Mode: Overlay
 9/10/95 12:43 PM Res=4cm-1

Rys. 53 Widmo IR embeliny (kolor czerwony) i rapanonu (niebieski) zakres 600-1400 cm^{-1} .



View Mode: Peaks

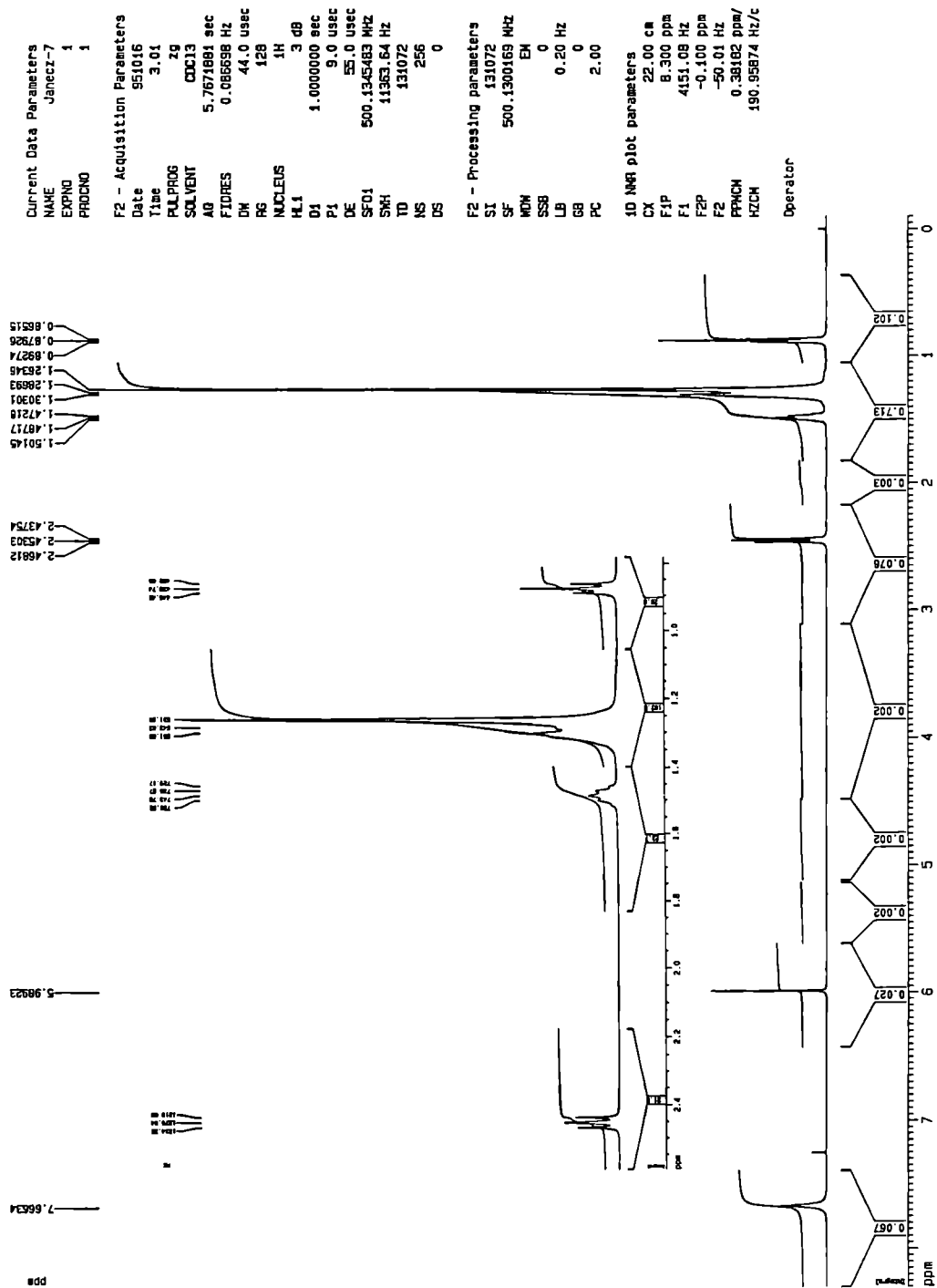
10/4/95 4:41 PM Res=64x-1

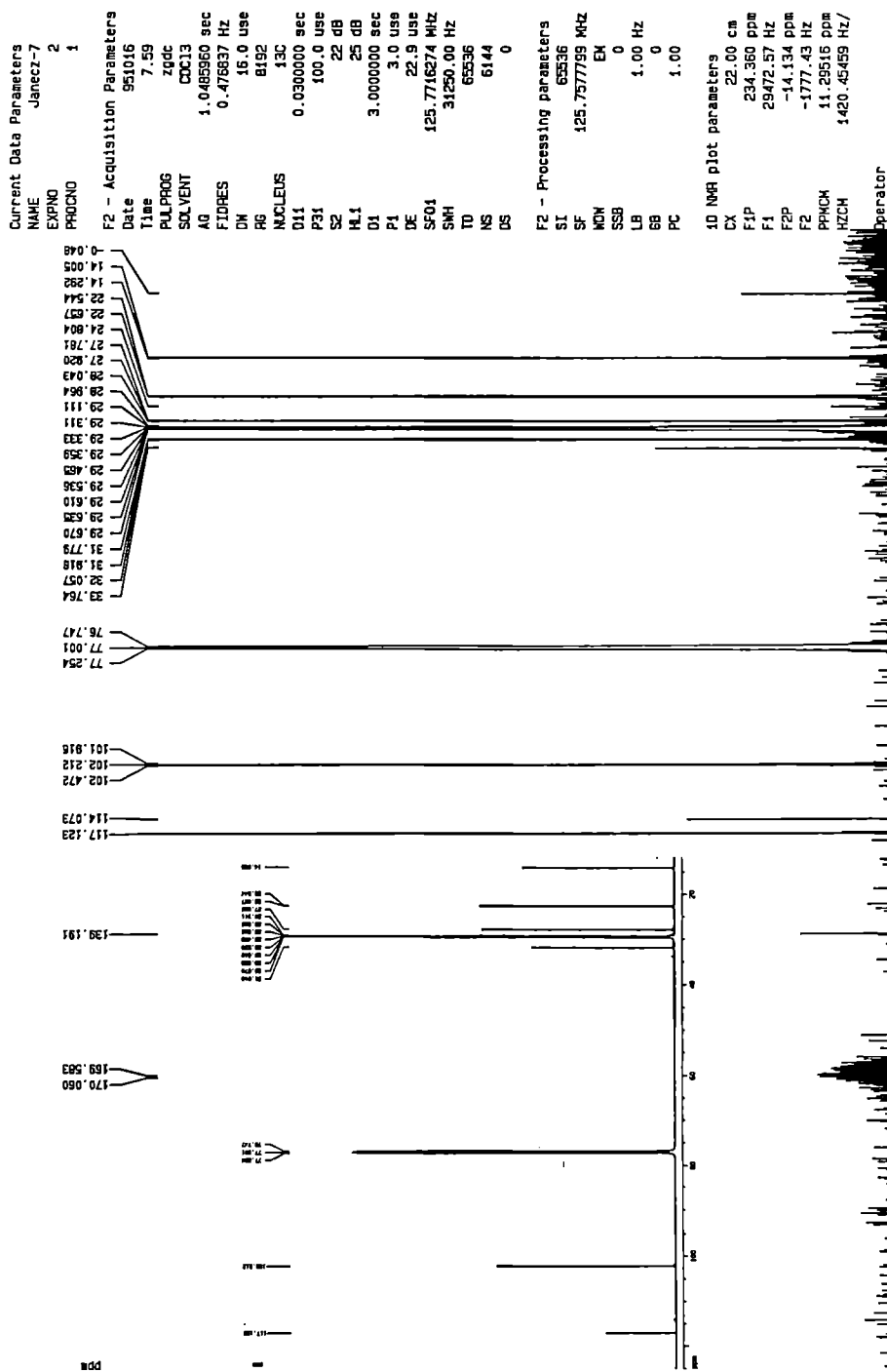
7

File # 1 : F775

Number of Scans: 128

Rys. 54 Porównawcze widmo IR (zakres 600-1800 cm^{-1}) embeliny (kolor czarny) i substancji BQ (kolor zielony).

Rys. 55 Widmo ^1H NMR substancji BQ.

Rys. 56 Widmo ^{13}C NMR substancji BQ.

Current Data Parameters
 NAME Podolnik.chion
 EXPNO 20
 PROCNO 1

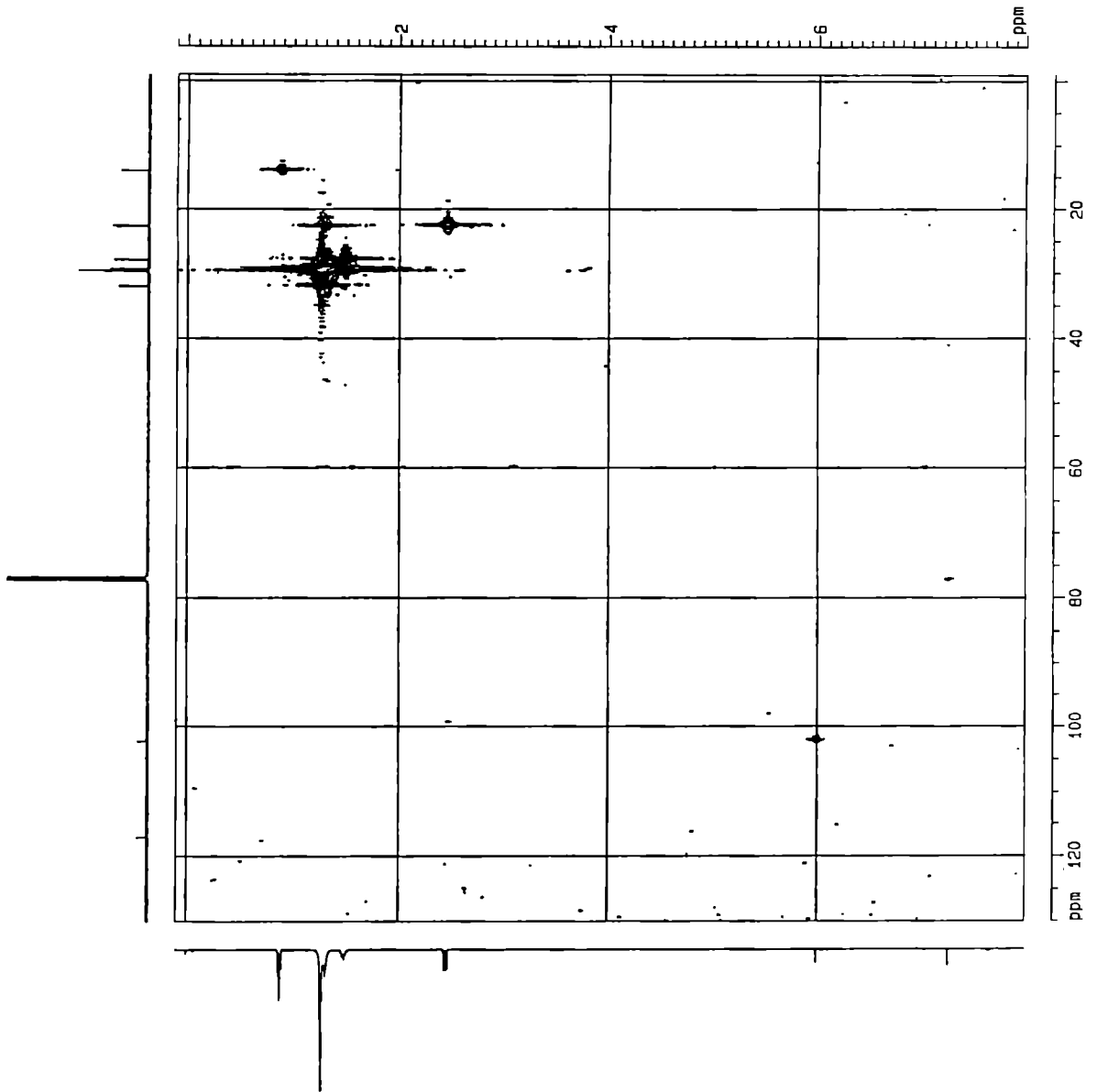
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 201813
 Time 21.36
 File hica
 PULPROG zgpg30
 SOLVENT H2O
 AD 0.0276580 sec
 FIDRES 18.964469 Hz
 SF 277.0 MHz
 DSF 8.00
 HZRES 16.00
 NUC1 13C
 NUC2 1H
 D1 0.0300000 sec
 D11 2.0000000 sec
 S1 3.00
 P1 12.0 usec
 PD 0.0000000 sec
 PR 0.0000000 sec
 PI 0.0000000 sec
 PC 0.0020000 sec
 ZG 23.00
 DE 361.0 usec
 SF21 125.7633594 MHz
 SFH 18018.332 Hz
 TD 1024
 S1 110.0 usec
 S11 14.00
 S12 14.00
 S13 0.0010000 sec
 S14 0.0010000 sec

F1 - Acquisition Parameters
 NQ0 200
 TD 256
 SF21 500.1319 MHz
 SFH2 19.146300 Hz
 S11 8.001.000

F2 - Processing Parameters
 SI 1024
 SF 125.7578414 MHz
 EN 0
 NQ1 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

F1 - Processing Parameters
 SI 512
 SF 500.1300127 MHz
 EN 2
 NQ1 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0

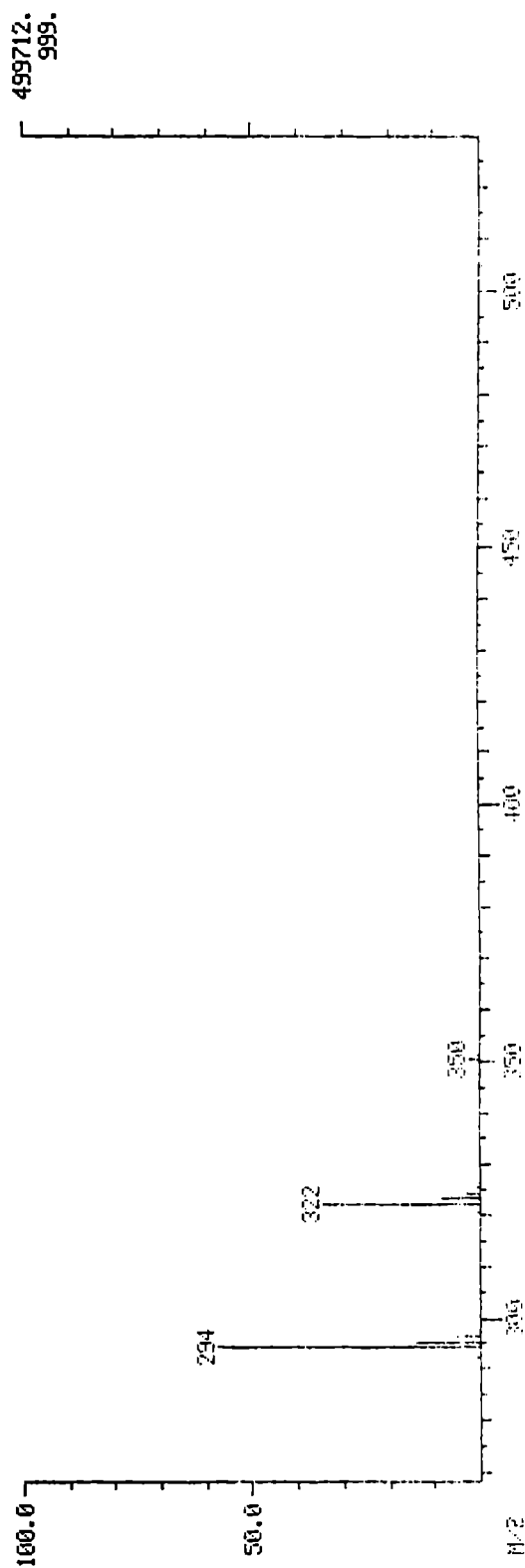
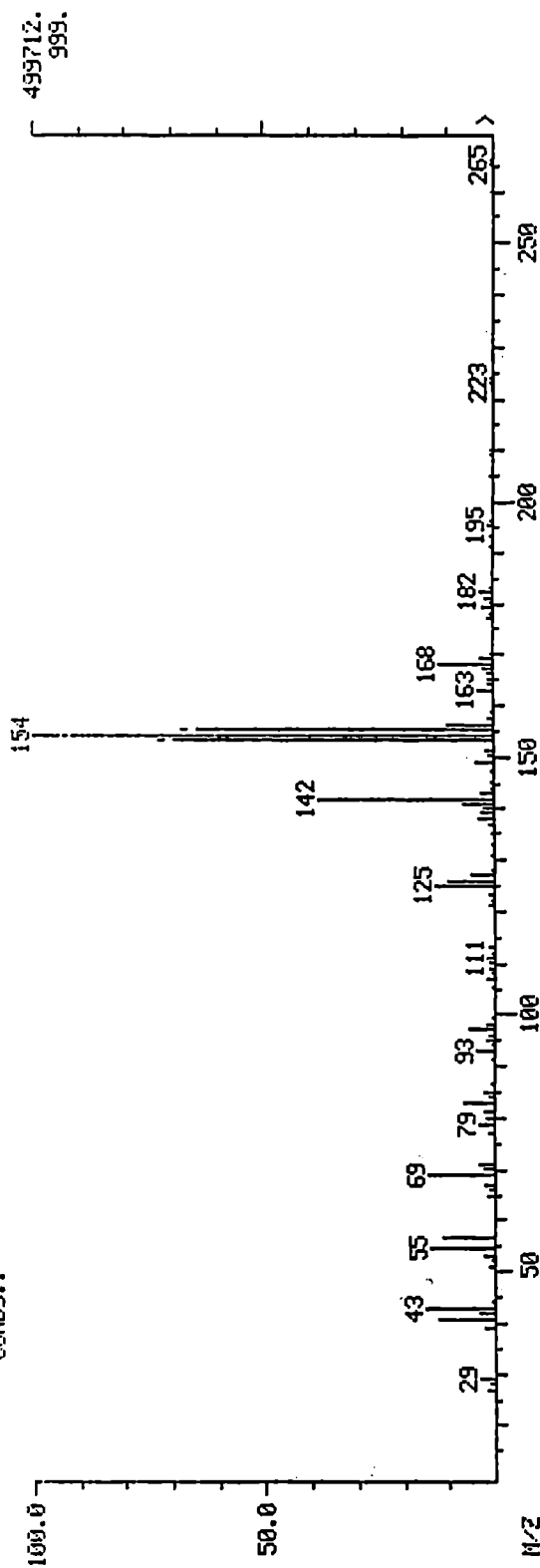
2D NMR Plot Parameters
 DSZ 15.00 cm
 EX1 15.00 cm
 PZPLO 130.000 ppm
 FZLO 1836.31 Hz
 FZPH 1.000 ppm
 FZPL 1.000 ppm
 FZLO 8.000 ppm
 FZPL 4001.04 Hz
 FZPH -0.100 ppm
 FZPC 5.73333 ppm/cm
 FZPZCH 1088.28478 Hz/cm
 F1FREQ 0 ppm/cm
 F2FREQ 270.01022 Hz/cm



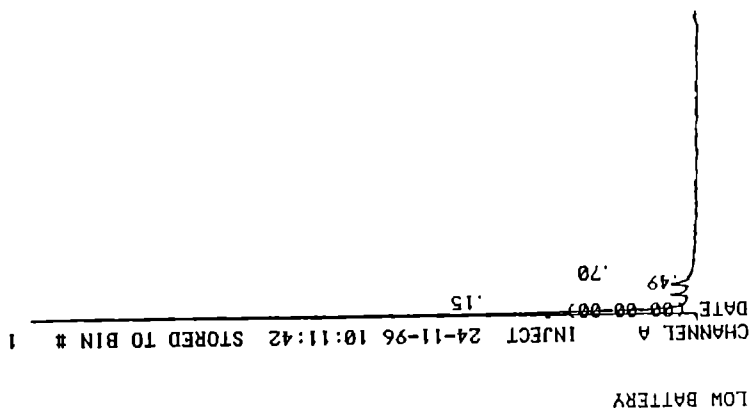
Rys. 57 Widmo korelacyjne ¹H - ¹³C NMR (HETCOR) substancji BQ.

MASS SPECTRUM
05/29/96 16:33:00 + 1:38
SAMPLE: CHINON
COND.: :

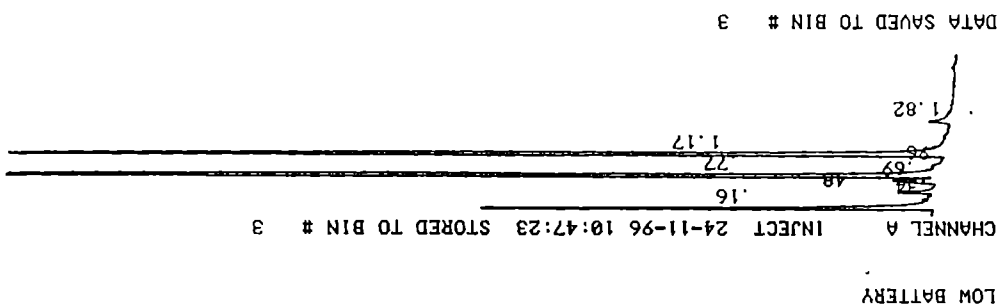
DATA: CHIN #72
CALI: EI2905 #3
BASE M/Z: 154
RIC: 3268610.



Rys. 58 Widmo EIMS substancji BQ.



3

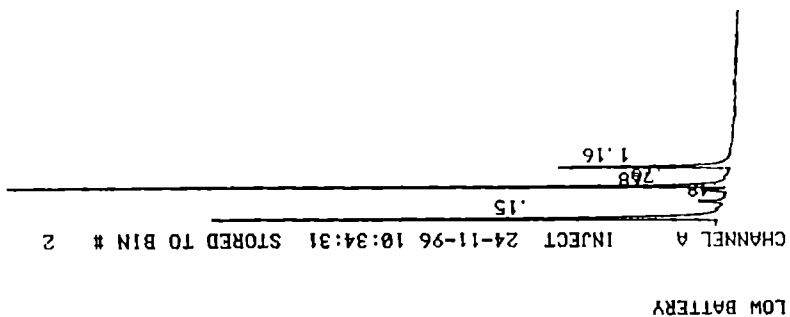


2

| PEAK# | AREA | RT | AREA BC |
|-------|--------|------|------------|
| 2 | 3.111 | 0.48 | 114481 03 |
| 3 | 3.602 | 0.68 | 132562 02 |
| 4 | 68.974 | 0.76 | 2538344 03 |
| 5 | 24.313 | 1.16 | 894740 01 |
| TOTAL | 100. | | 3680127 |

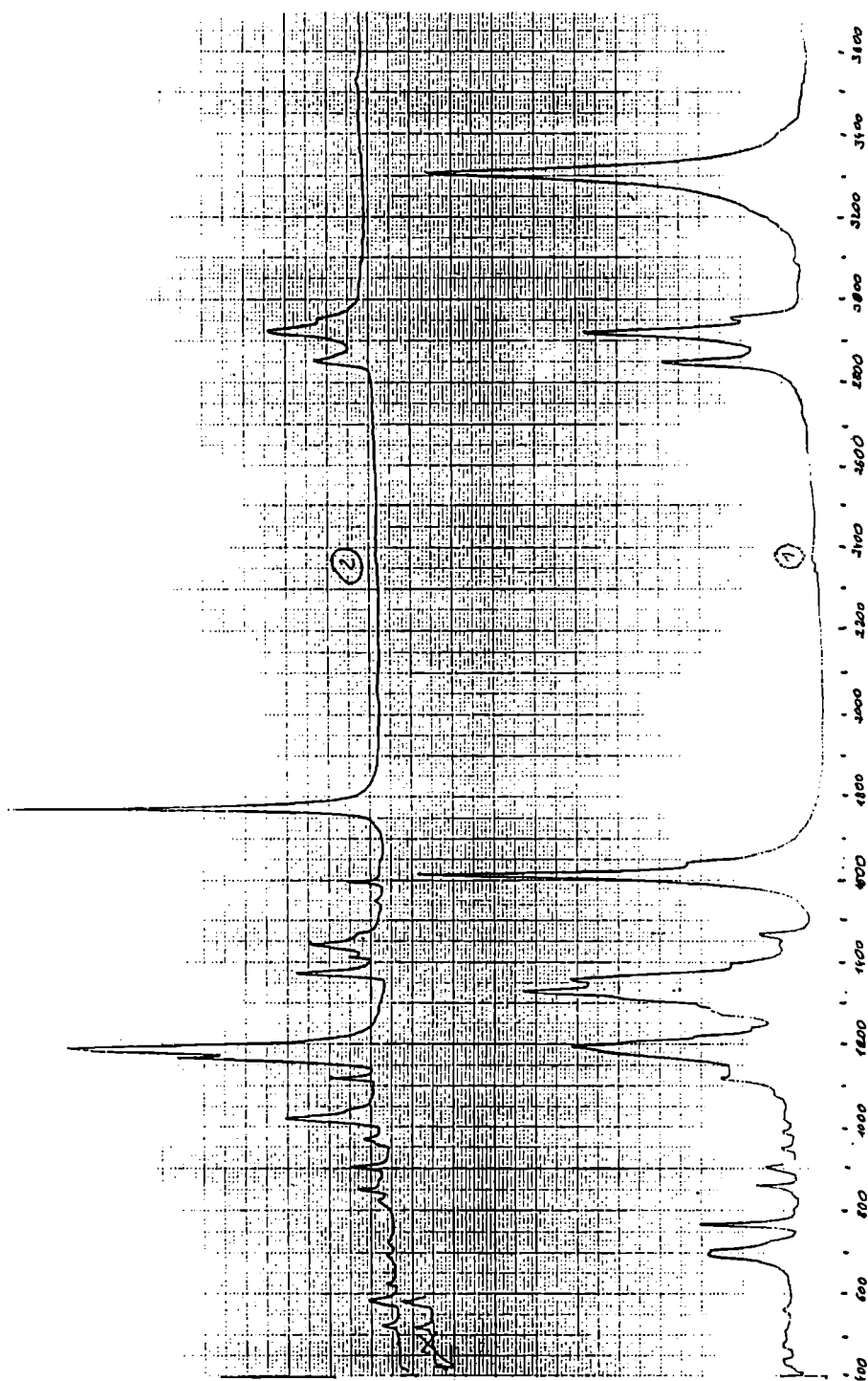
FILE 1. METHOD 0. RUN 2 INDEX 2 BIN 2
 24-11-96 10:34:31 CH=.A. PS= 1.
 DATA SAVED TO BIN # 2

1

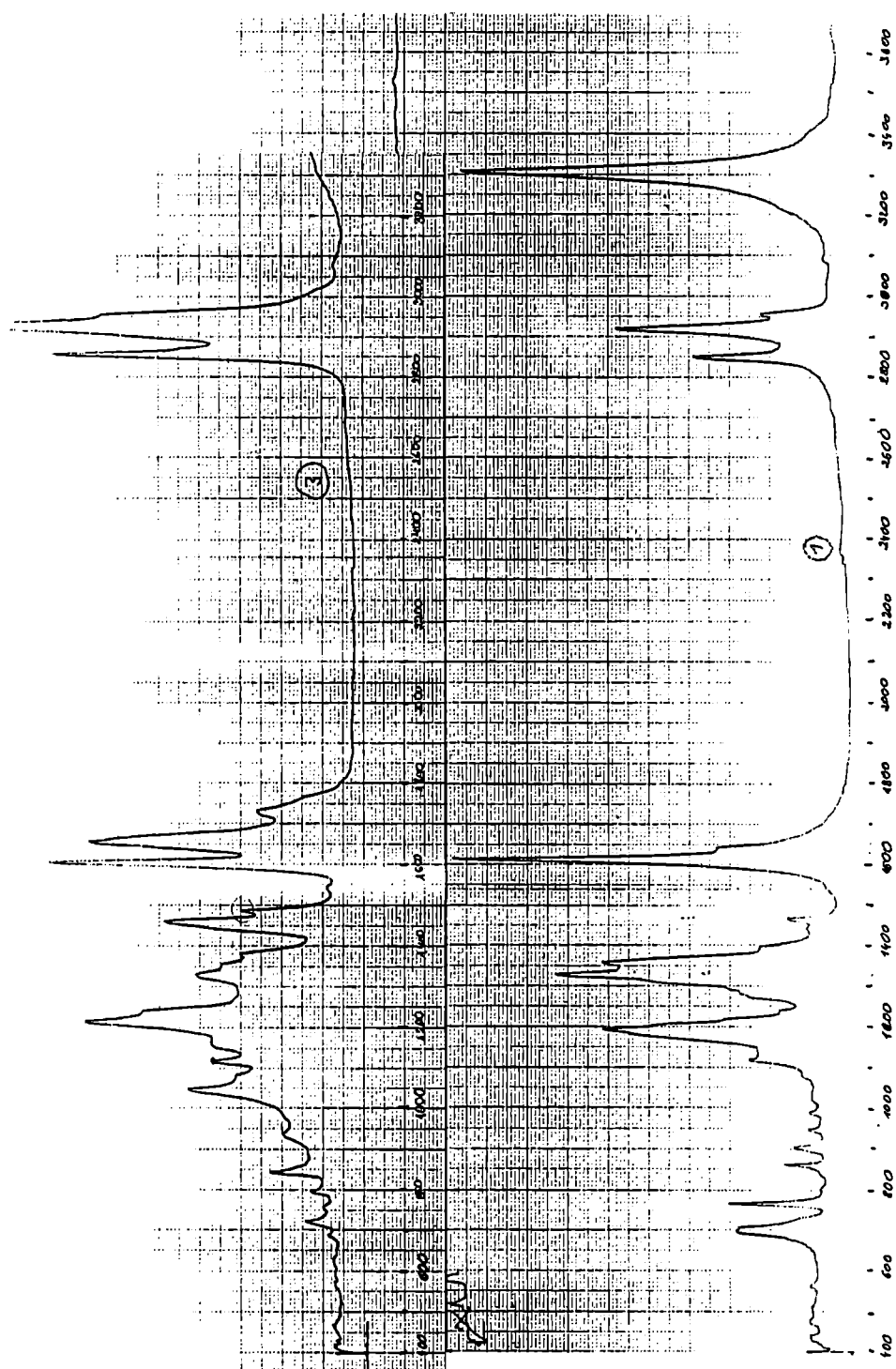


023

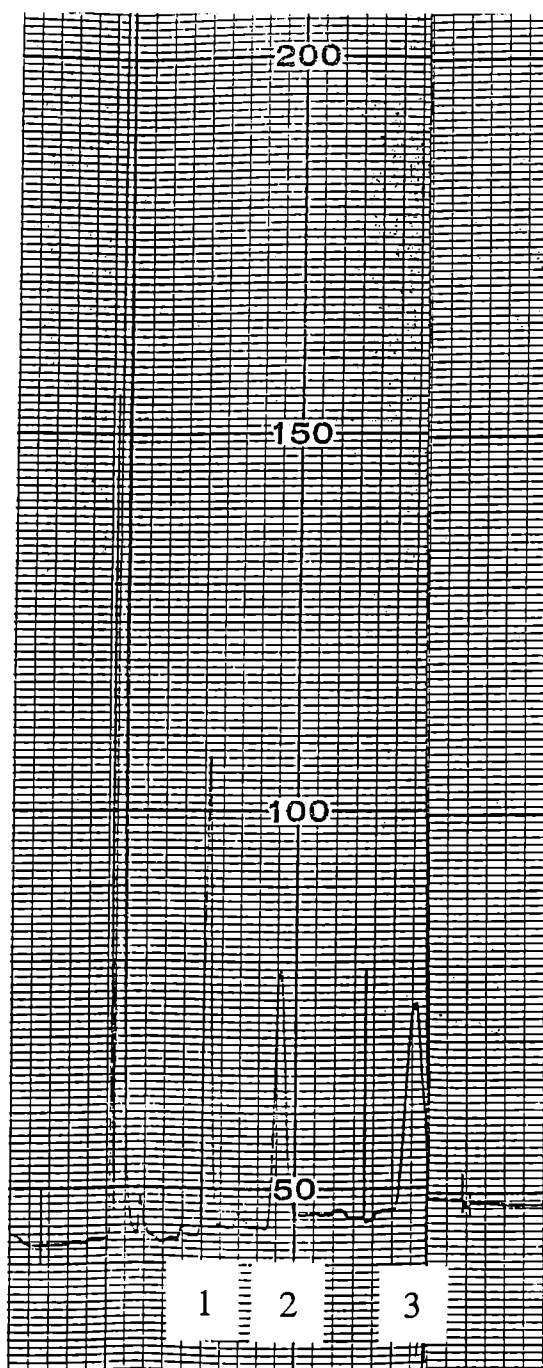
Rys. 59 Chromatogram gazowy (GLC) substancji BQ (chloroform).
 1 - piki embeliny (0.76) i rapanonu (1.16)
 2 - piki embeliny, rapanonu i homorapanonu (1.82)
 3 - chromatogram rozpuszczalnika



Rys. 60 Widmo IR substancji BQ (1) oraz acetylowej pochodnej (2).

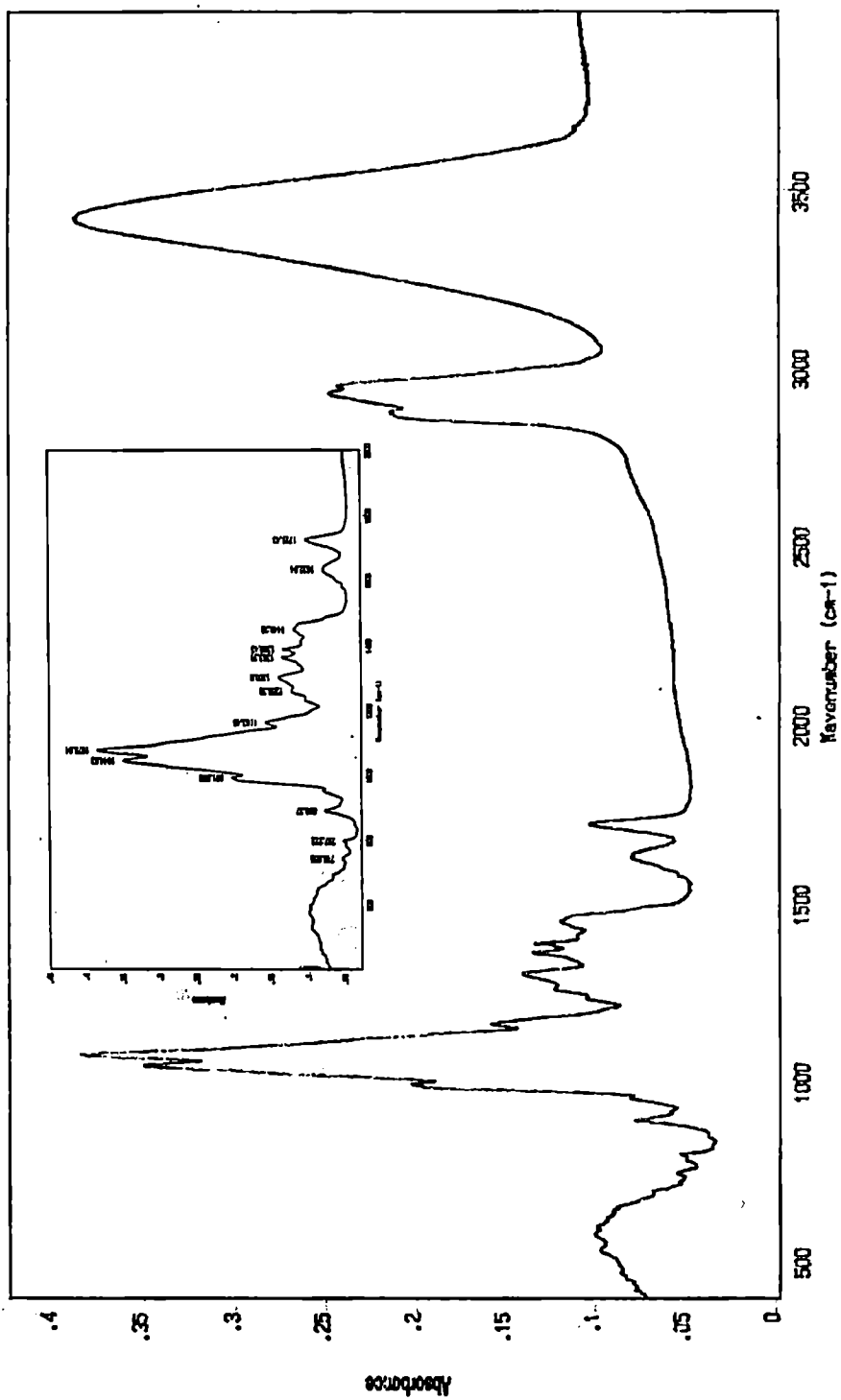


Rys. 61 Widmo IR substancji BQ (1) oraz pochodnej metylowej (3).



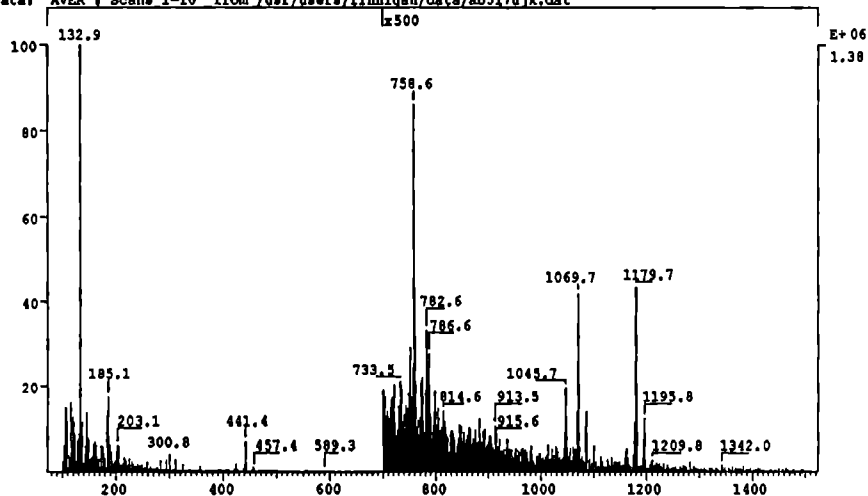
Rys. 62 Chromatogram gazowy estrów metylowych kwasów tłuszczowych - produktów utlenienia substancji BQ nadmanganianem potasu:

- 1 - ester metylowy kwasu laurynowego
- 2 - ester metylowy kwasu mirystycznego
- 3 - ester metylowy kwasu palmitynowego

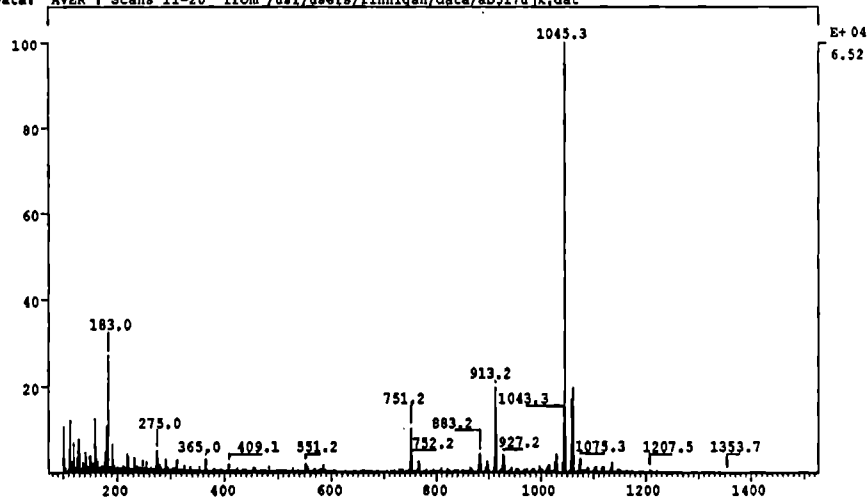


Rys. 63 Widmo IR saponozydu B.

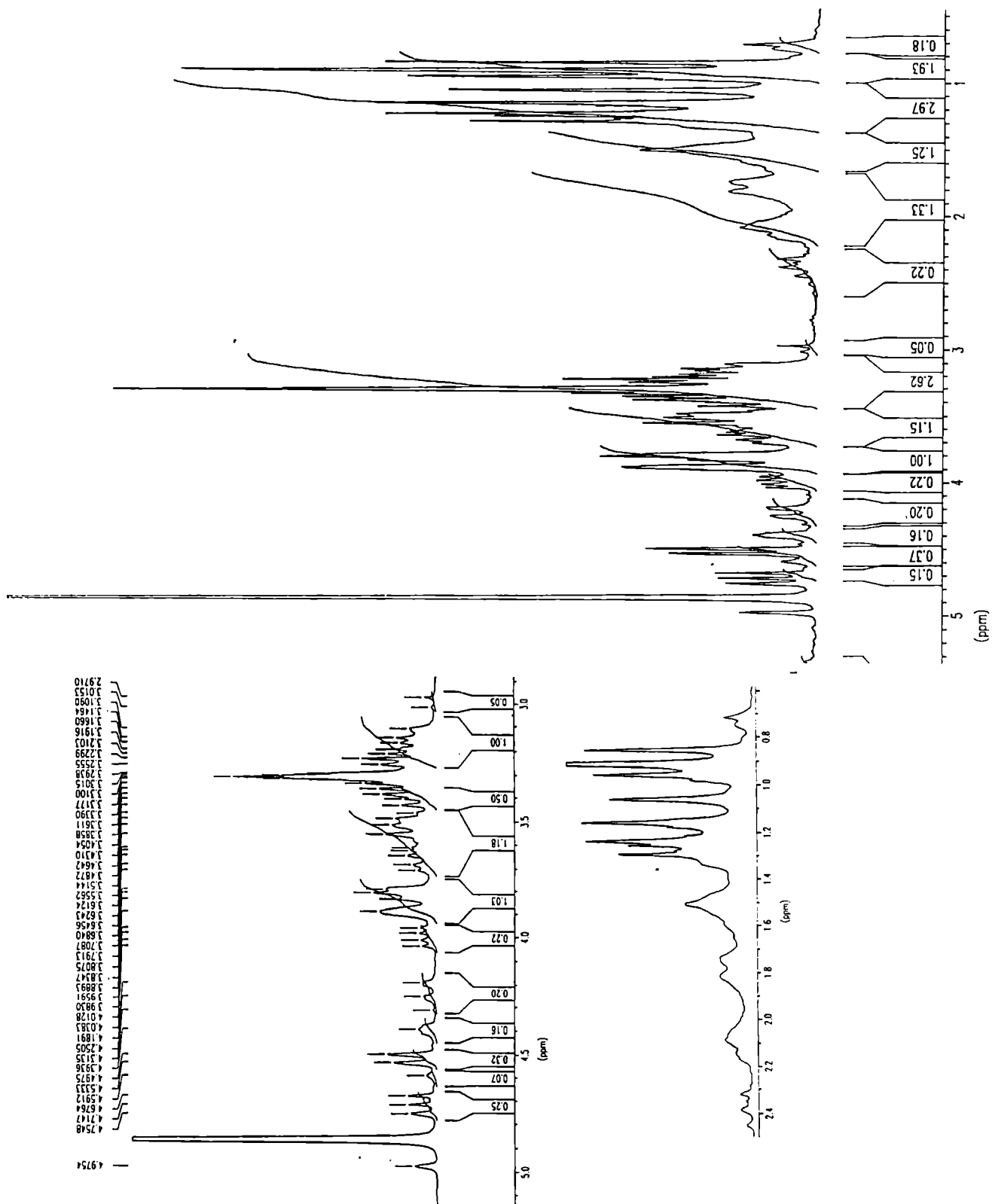
SPEC: mb517ujk 16-Jun-94 Elapse: 00:00:17.7 1
 Samp: 3 Start: 12:34:22 2
 Comm: FIB, Cs+ 13keV, gly
 Mode: FAB +VE +HMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: wv Client: Z. Janeczko-UJ Inlet :
 Base: 132.9 Inten: 1380705 Masses: 100 > 1496
 Norm: 132.9 RIC: 9298706 #peaks: 1322
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: AVER 1 Scans 1-10 from /usr/users/finnigan/data/ab517ujk.dat



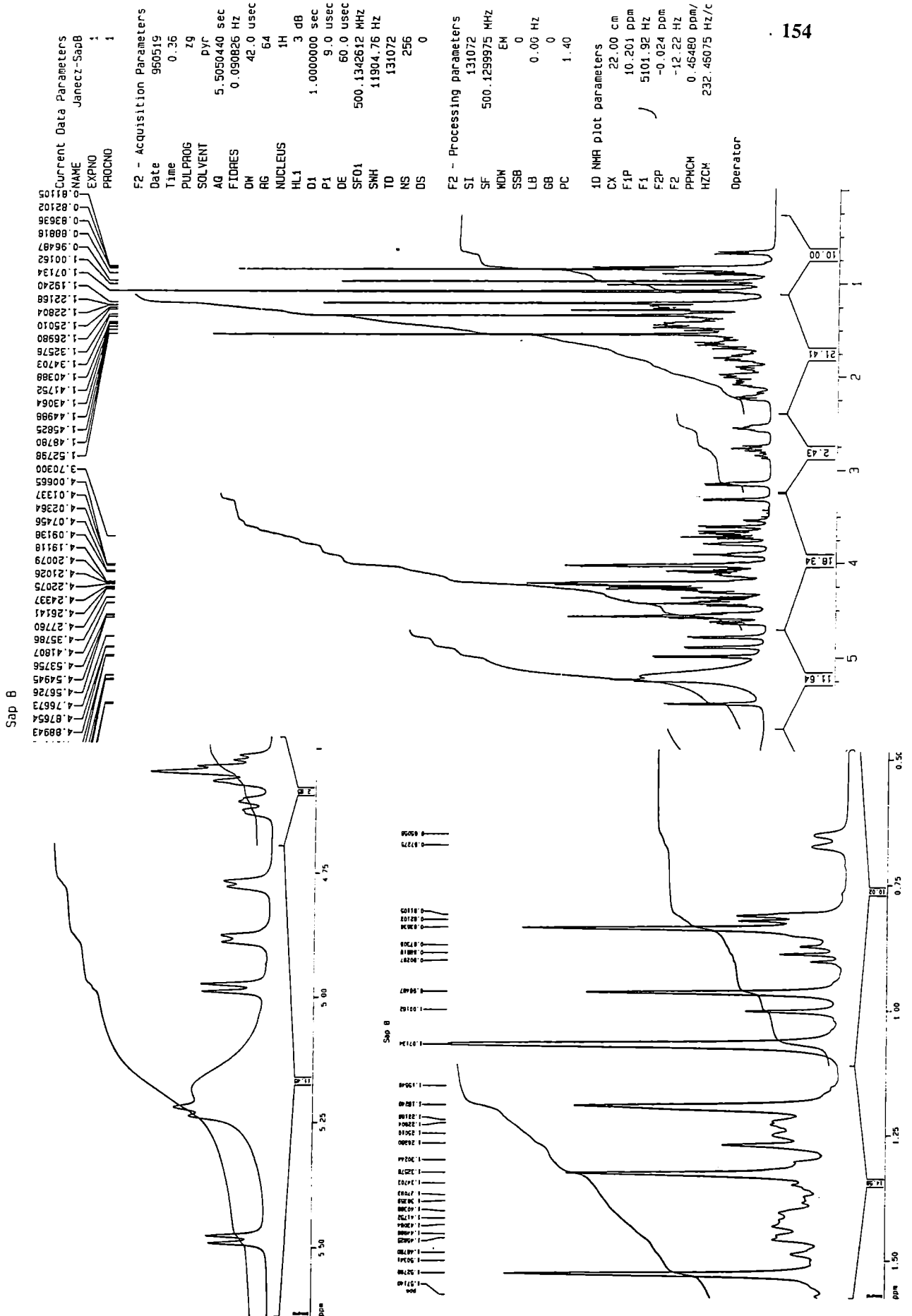
SPEC: mb517ujk 16-Jun-94 Elapse: 00:02:23.1 2
 Samp: 3 Start: 12:34:22 2
 Comm: FIB, Cs+ 13keV, gly
 Mode: FAB -VE -HMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: wv Client: Z. Janeczko-UJ Inlet :
 Base: 1045.3 Inten: 65216 Masses: 100 > 1499
 Norm: 1045.3 RIC: 707298 #peaks: 1467
 Peak: 1000.00 mmu
 Data: AVER 1 Scans 11-20 from /usr/users/finnigan/data/ab517ujk.dat



Rys. 64 Widmo FAB-MS saponozydu B.



Rys. 65 Widmo ^1H NMR saponozydu B (metanol- d_4 , 200 MHz).

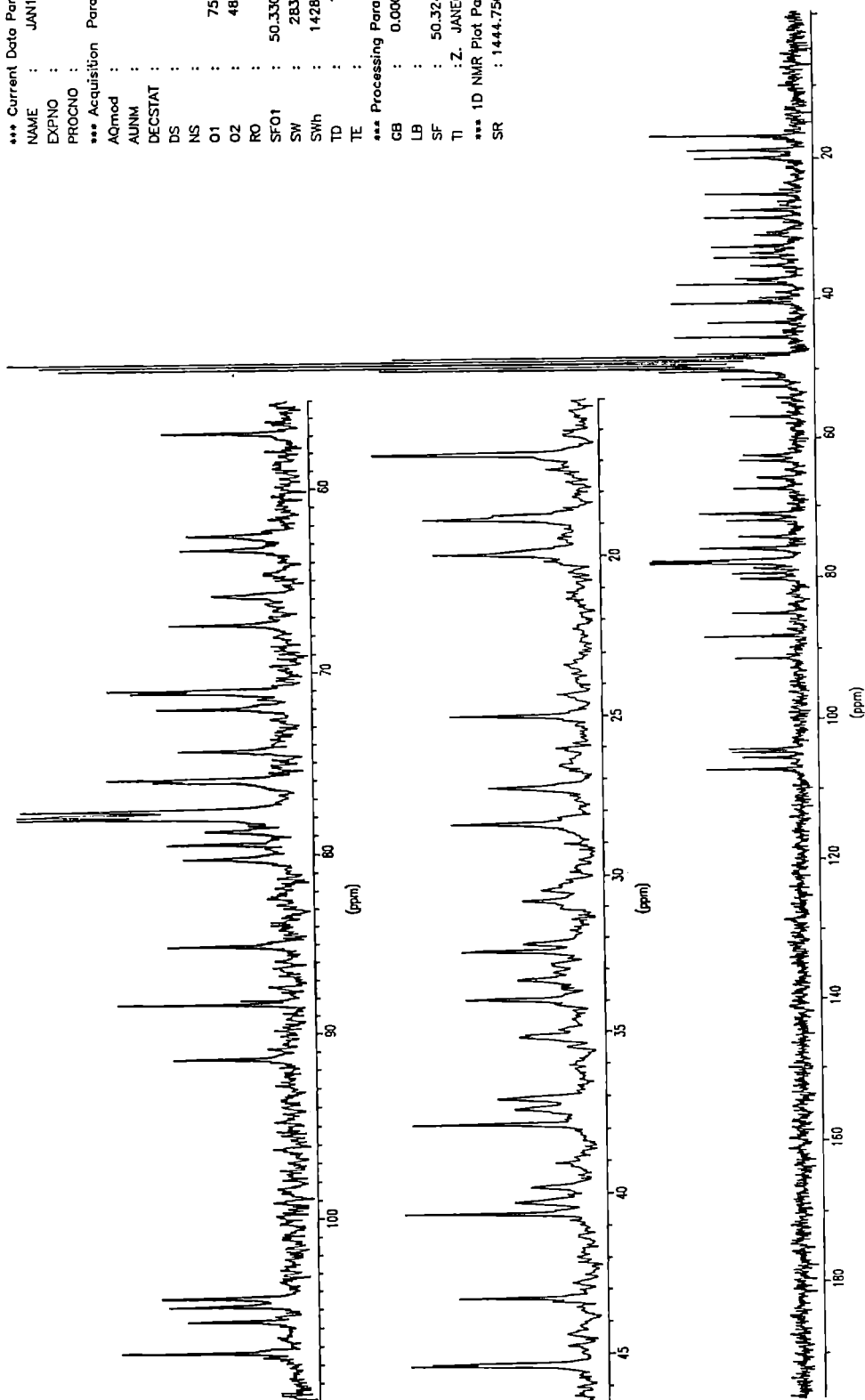


Rys. 66 Widmo ¹H NMR saponozydu B (pirydyna-d₅, 500.13 MHz).


```

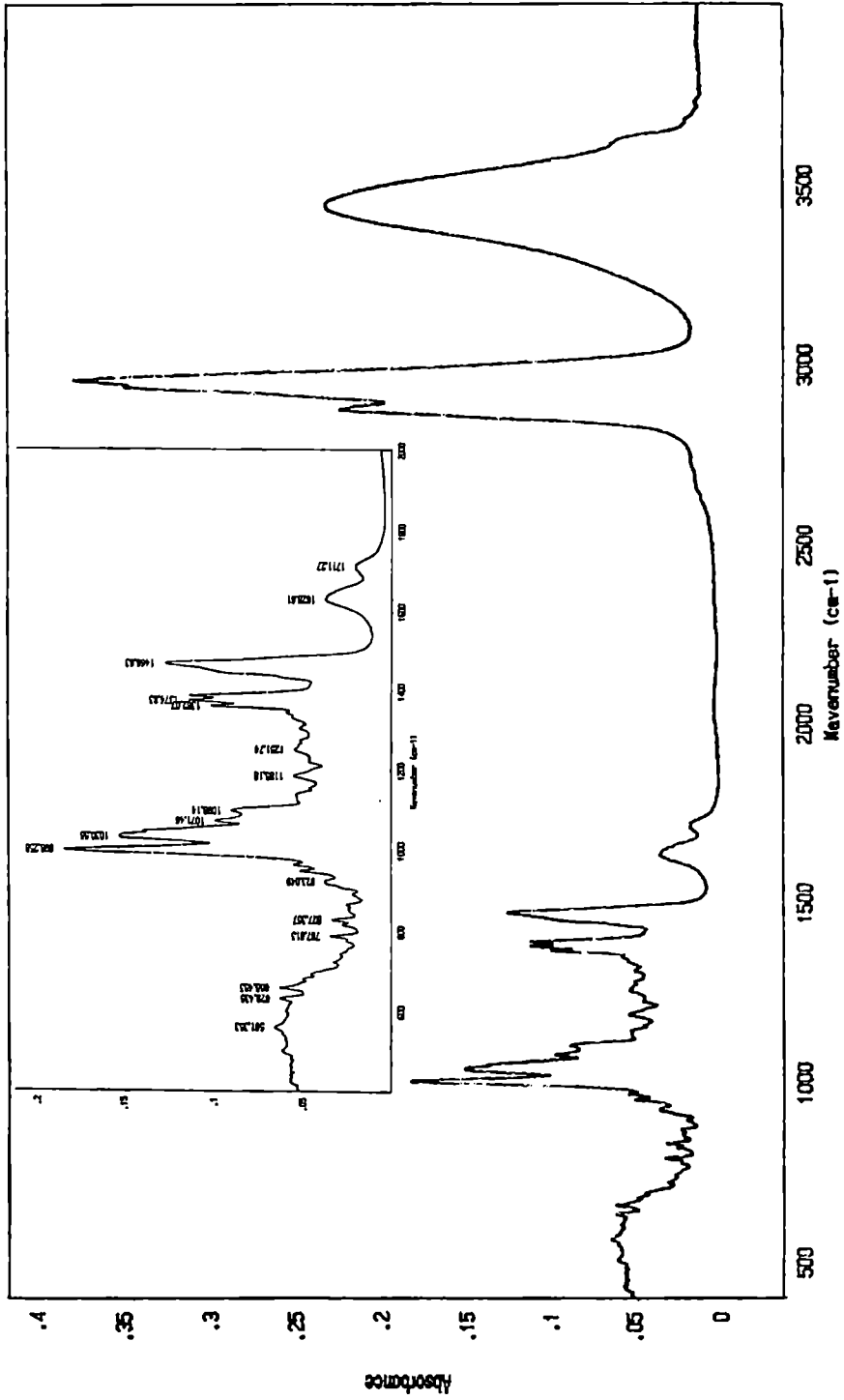
*** Current Data Parameters ***
NAME      : JAN11406
EXPNO     : 2
PROCNO    : 1
*** Acquisition Parameters ***
AQmod     : qseq
AUNM      : .
DECSTAT   : PO
DS        : 0
NS        : 1300
O1        : 7510.00 Hz
O2        : 4892.02 Hz
RO        : 84 Hz
SFO1      : 50.3309509 MHz
SWH       : 283.8356 ppm
SWh       : 14285.714 Hz
TD        : 16384
TE        : 297 K
*** Processing Parameters ***
GB        : 0.0000000
LB        : 2.00 Hz
SF        : 50.3248856 MHz
TI        : Z. JANEZKO =3=
*** 1D NMR Plot Parameters ***
SR        : 1444.7508545 Hz

```

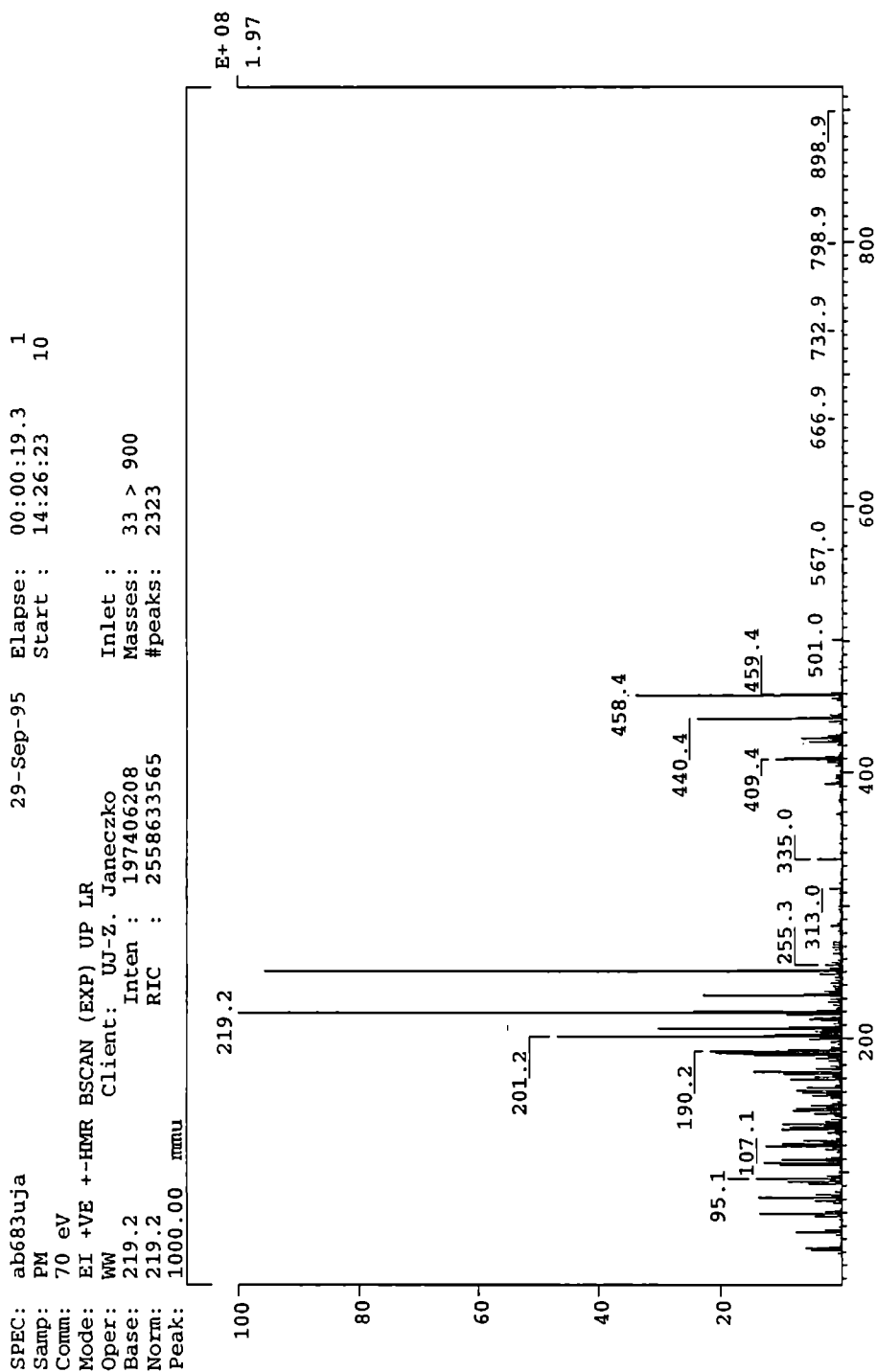


Rys. 67 Widmo ^{13}C NMR saponozylu B.

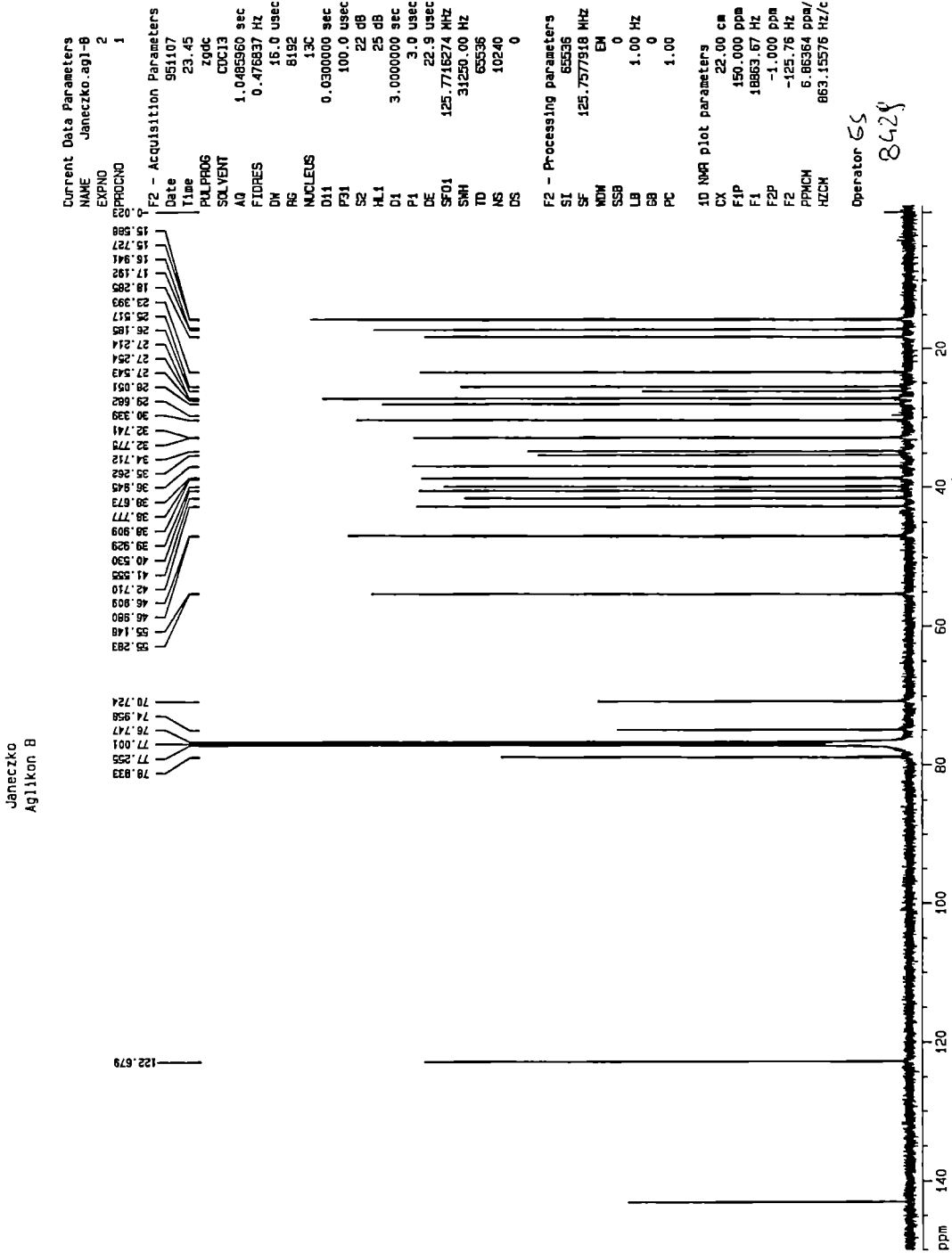




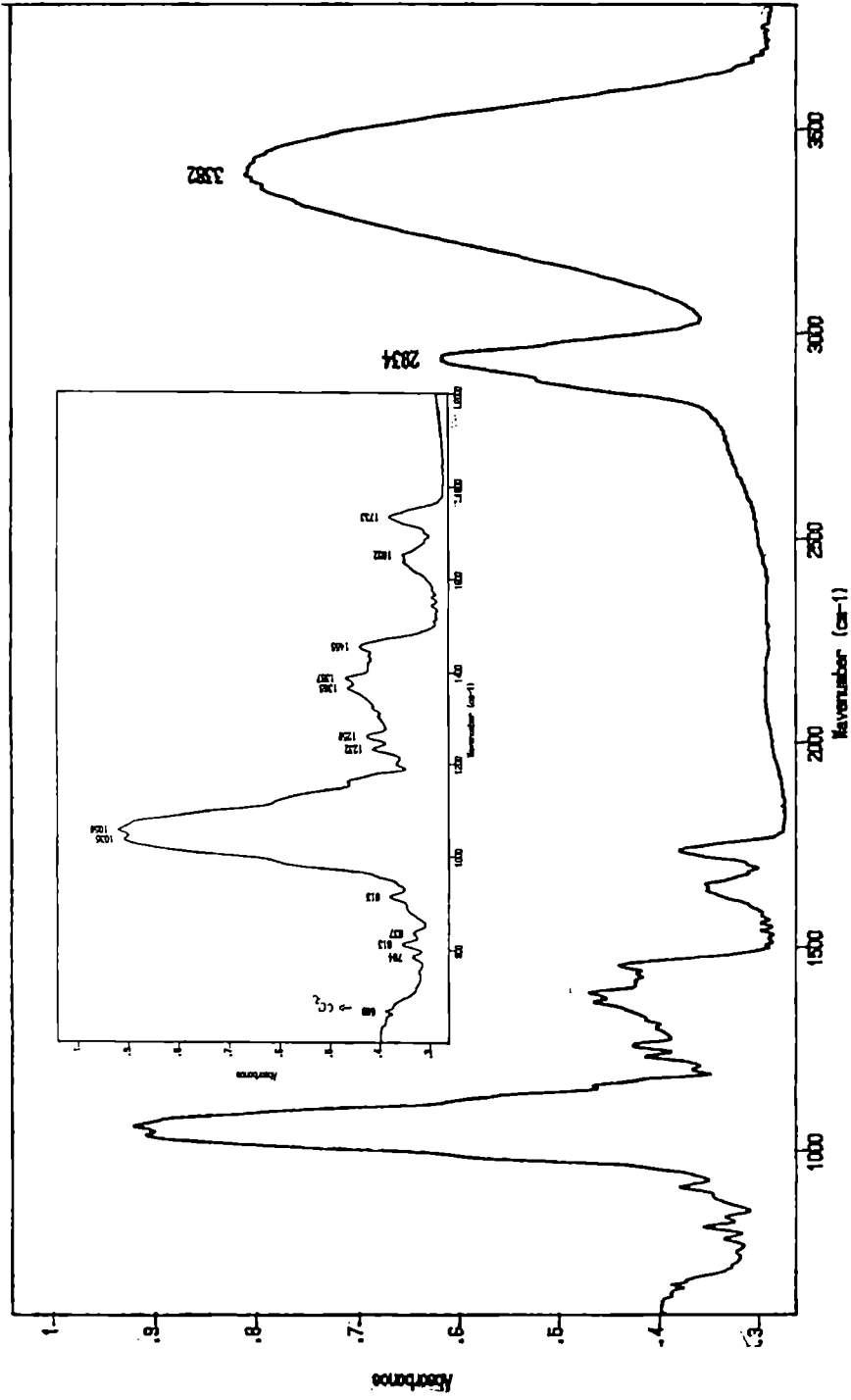
Rys. 68 Widmo IR aglikonu saponozydu B.



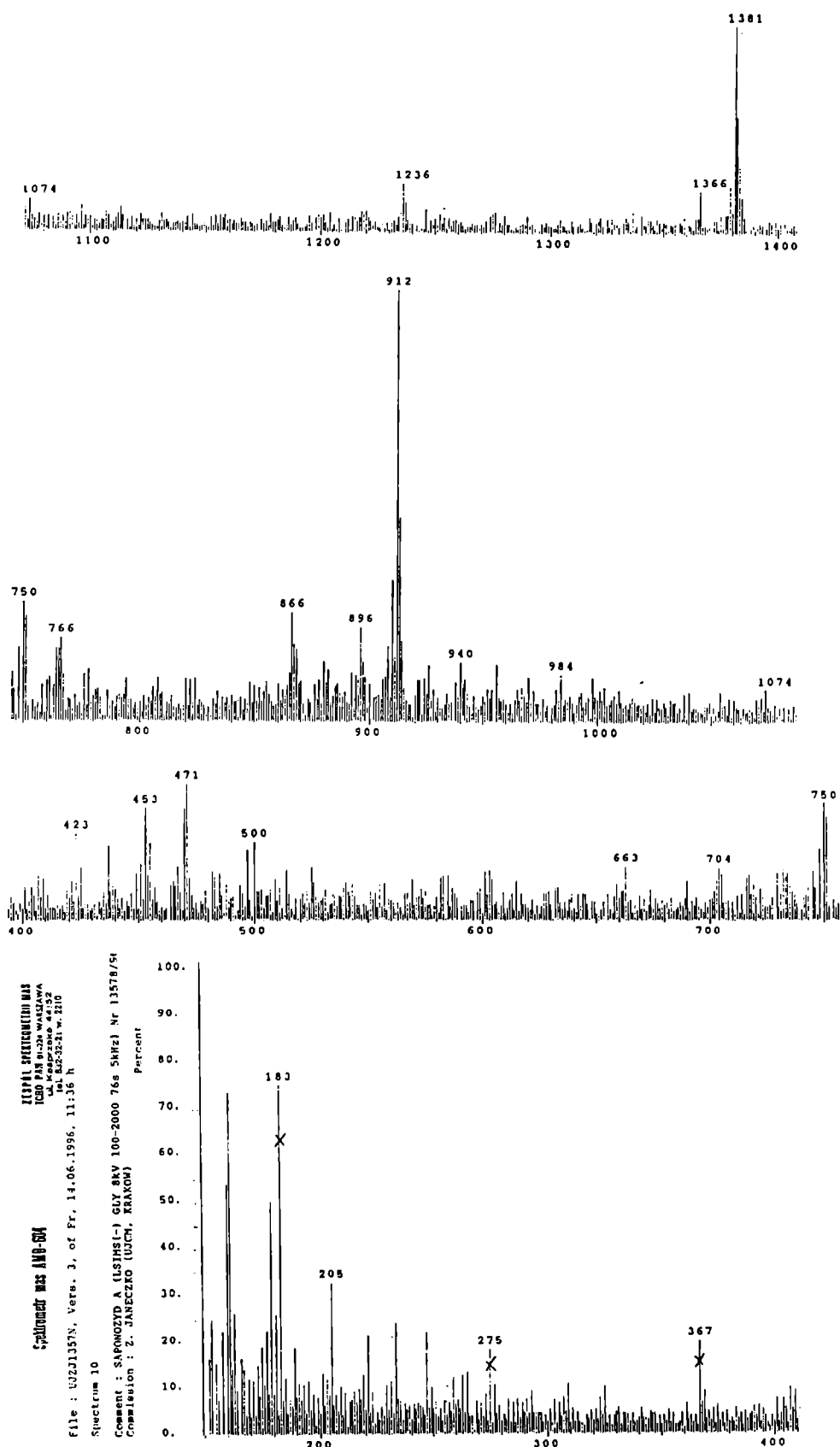
Rys. 69 Widmo EIMS aglikonu saponozydu B.



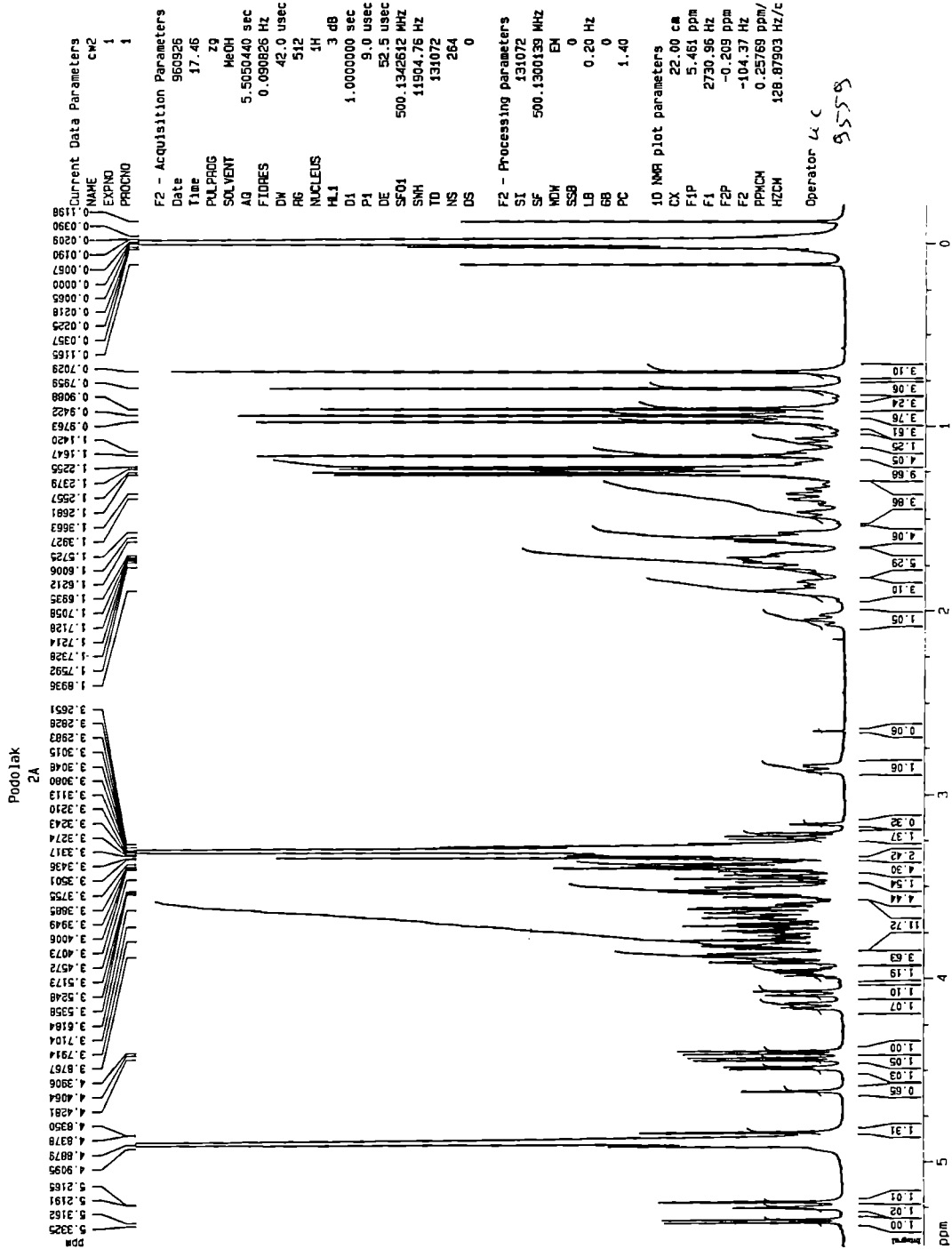
Rys. 71 Widmo ¹³C NMR aglikonu saponozydu B.



Rys. 72 Widmo IR saponozydu A.



Rys. 73 Widmo LSIMS saponozydu A.



Rys. 74 Widmo ¹H NMR saponozydu A (metanol-d₄).

Saponina A
COSY45

Current Data Parameters
NAME JMWCT-SGA
EXPNO 1
PROCNO 1

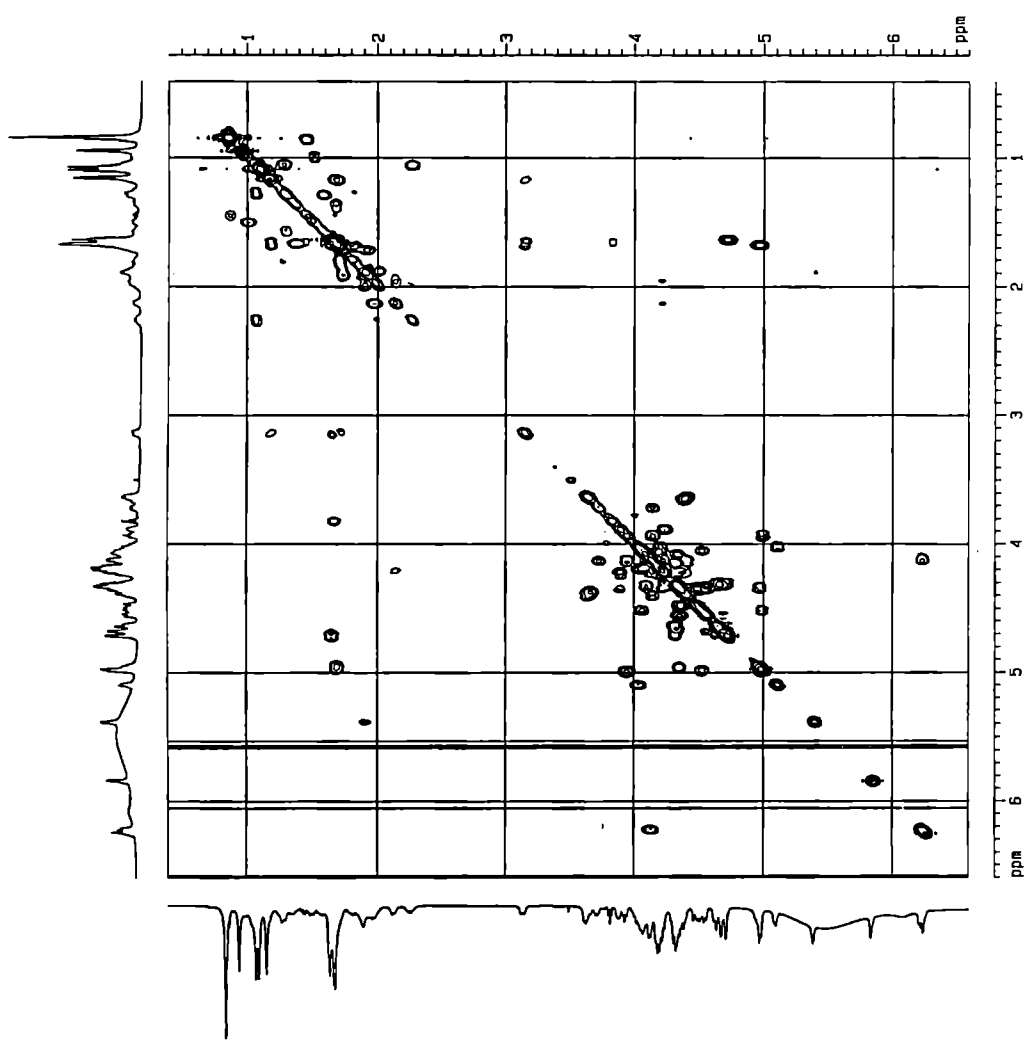
F2 - Acquisition Parameters
Date_ Time 060519
PULPROG zgpg30
PROBHD 5mm QNP 1H/13
P1 12.00
PL2 19.00
PL3 19.00
PL4 19.00
PL5 19.00
PL6 19.00
PL7 19.00
PL8 19.00
PL9 19.00
PL10 19.00
PL11 19.00
PL12 19.00
PL13 19.00
PL14 19.00
PL15 19.00
PL16 19.00
PL17 19.00
PL18 19.00
PL19 19.00
PL20 19.00
PL21 19.00
PL22 19.00
PL23 19.00
PL24 19.00
PL25 19.00
PL26 19.00
PL27 19.00
PL28 19.00
PL29 19.00
PL30 19.00
PL31 19.00
PL32 19.00
PL33 19.00
PL34 19.00
PL35 19.00
PL36 19.00
PL37 19.00
PL38 19.00
PL39 19.00
PL40 19.00
PL41 19.00
PL42 19.00
PL43 19.00
PL44 19.00
PL45 19.00
PL46 19.00
PL47 19.00
PL48 19.00
PL49 19.00
PL50 19.00
PL51 19.00
PL52 19.00
PL53 19.00
PL54 19.00
PL55 19.00
PL56 19.00
PL57 19.00
PL58 19.00
PL59 19.00
PL60 19.00
PL61 19.00
PL62 19.00
PL63 19.00
PL64 19.00
PL65 19.00
PL66 19.00
PL67 19.00
PL68 19.00
PL69 19.00
PL70 19.00
PL71 19.00
PL72 19.00
PL73 19.00
PL74 19.00
PL75 19.00
PL76 19.00
PL77 19.00
PL78 19.00
PL79 19.00
PL80 19.00
PL81 19.00
PL82 19.00
PL83 19.00
PL84 19.00
PL85 19.00
PL86 19.00
PL87 19.00
PL88 19.00
PL89 19.00
PL90 19.00
PL91 19.00
PL92 19.00
PL93 19.00
PL94 19.00
PL95 19.00
PL96 19.00
PL97 19.00
PL98 19.00
PL99 19.00
PL100 19.00

F1 - Acquisition Parameters
NUC1 13C
NUC2 1H
P1 12.00
PL2 19.00
PL3 19.00
PL4 19.00
PL5 19.00
PL6 19.00
PL7 19.00
PL8 19.00
PL9 19.00
PL10 19.00
PL11 19.00
PL12 19.00
PL13 19.00
PL14 19.00
PL15 19.00
PL16 19.00
PL17 19.00
PL18 19.00
PL19 19.00
PL20 19.00
PL21 19.00
PL22 19.00
PL23 19.00
PL24 19.00
PL25 19.00
PL26 19.00
PL27 19.00
PL28 19.00
PL29 19.00
PL30 19.00
PL31 19.00
PL32 19.00
PL33 19.00
PL34 19.00
PL35 19.00
PL36 19.00
PL37 19.00
PL38 19.00
PL39 19.00
PL40 19.00
PL41 19.00
PL42 19.00
PL43 19.00
PL44 19.00
PL45 19.00
PL46 19.00
PL47 19.00
PL48 19.00
PL49 19.00
PL50 19.00
PL51 19.00
PL52 19.00
PL53 19.00
PL54 19.00
PL55 19.00
PL56 19.00
PL57 19.00
PL58 19.00
PL59 19.00
PL60 19.00
PL61 19.00
PL62 19.00
PL63 19.00
PL64 19.00
PL65 19.00
PL66 19.00
PL67 19.00
PL68 19.00
PL69 19.00
PL70 19.00
PL71 19.00
PL72 19.00
PL73 19.00
PL74 19.00
PL75 19.00
PL76 19.00
PL77 19.00
PL78 19.00
PL79 19.00
PL80 19.00
PL81 19.00
PL82 19.00
PL83 19.00
PL84 19.00
PL85 19.00
PL86 19.00
PL87 19.00
PL88 19.00
PL89 19.00
PL90 19.00
PL91 19.00
PL92 19.00
PL93 19.00
PL94 19.00
PL95 19.00
PL96 19.00
PL97 19.00
PL98 19.00
PL99 19.00
PL100 19.00

F2 - Processing Parameters
SI 32768
SF 500.125000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing Parameters
SI 65536
SF 500.125000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0
GB 0
PC 1.40

2D NMR Data Parameters
DSZ 15.00 cm
DSX 15.00 cm
F2P1 0.500 ppm
F2P2 300.000 Hz
F2P3 0.400 ppm
F2P4 200.000 Hz
F2P5 300.000 Hz
F2P6 0.400 ppm
F2P7 200.000 Hz
F2P8 0.41303 ppm/cm
F2P9 200.7000 Hz/cm
F2P10 0.41303 ppm/cm
F2P11 200.7000 Hz/cm
F2P12 0.41303 ppm/cm



Rys. 77 Widmo korelacyjne ¹H - ¹H COSY saponozydu A.

Janeczko
Sap A noesy

Current Data Parameters
 Jmccz-sapA
 EXPNO 1
 PROCNO 1

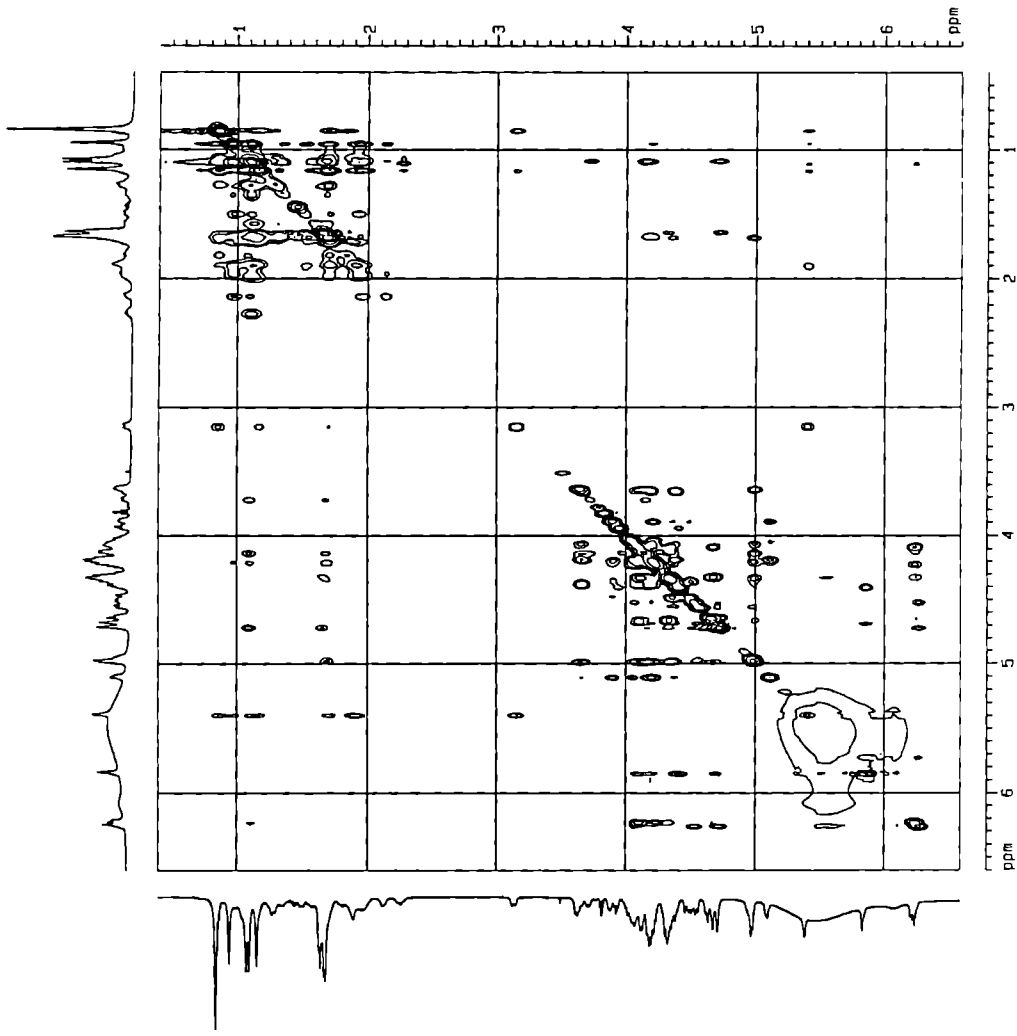
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 901230
 Time 4.10
 Operator jmccz
 SOLVENT CDCl3
 AR 0.000150 sec
 FIDRES 0.100775 Hz
 CW 79.0 uHz
 RB 64
 NUC1 1H
 NUC2 13C
 P1 4.500000 sec
 PL 0.5 uHz
 DD 0.000030 sec
 DE 0.000000 sec
 DE 56.0 uHz
 ST 500.122856 MHz
 SW 100.000000 MHz
 NS 16
 DS 15
 TD 0.000730 sec

F1 - Acquisition Parameters
 NS 2
 TD 245
 SFO1 500.1320 MHz
 FIDRES 25.633160 Hz
 SW 12.825 ppm

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 500.122856 MHz
 MVM 2
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

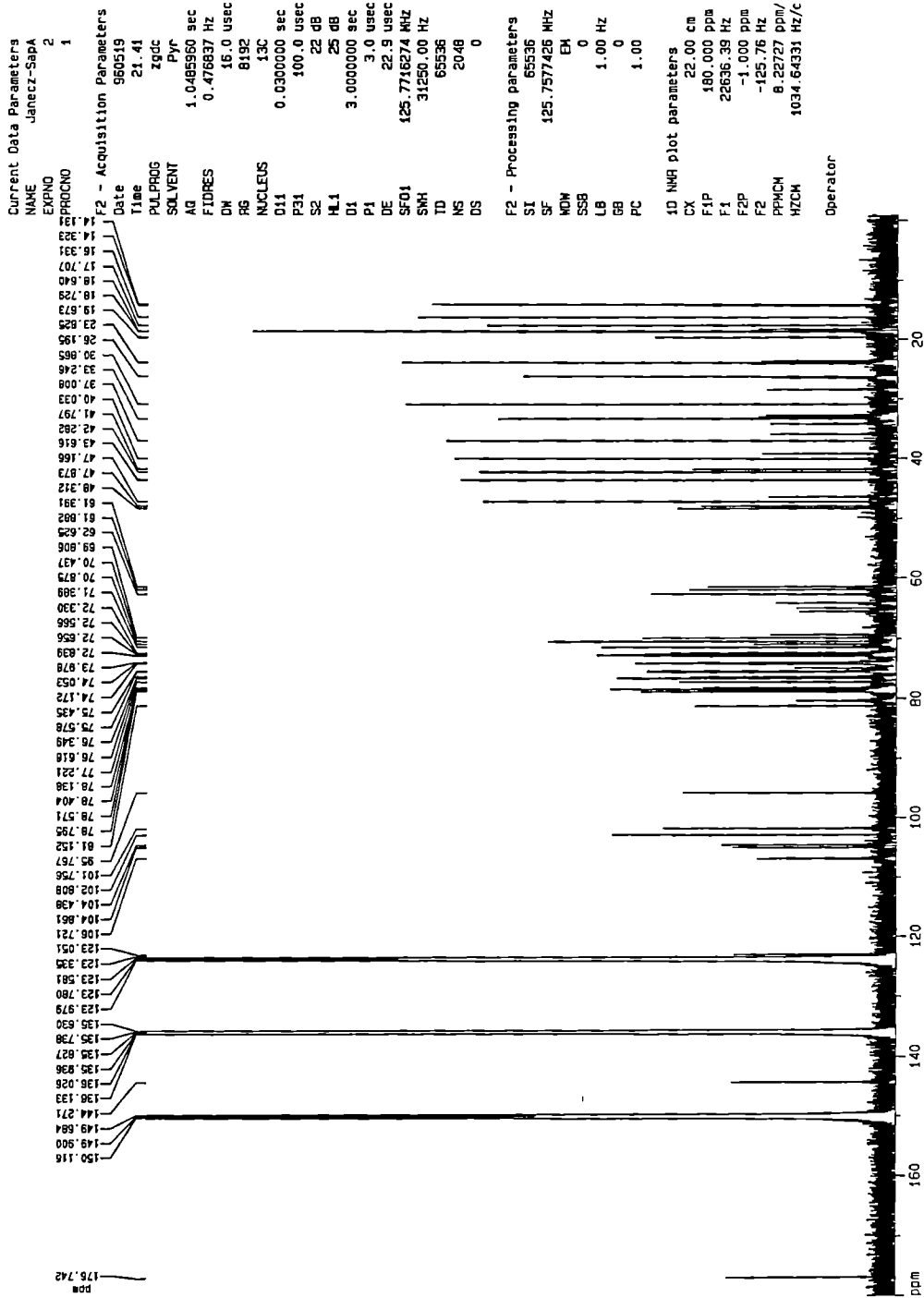
F1 - Processing parameters
 SI 512
 MZ 1791
 SF 500.122856 MHz
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0

20 NMR plot parameters
 CZ2 15.00 cm
 CX1 15.00 cm
 F2F1D 0.000 ppm
 F2F1E 33.000 ppm
 F2F1F 0.400 ppm
 F2QC 200.05 Hz
 F1F1D 0.000 ppm
 F1F1E 3300.86 Hz
 F1F1F 0.400 ppm
 F2PWH 20.000 Hz
 F2PWH 0.41333 ppm/cm
 F2ZCN 208.7200 Hz/cm
 F1PWH 0.41333 ppm/cm
 F1ZCN 208.7200 Hz/cm

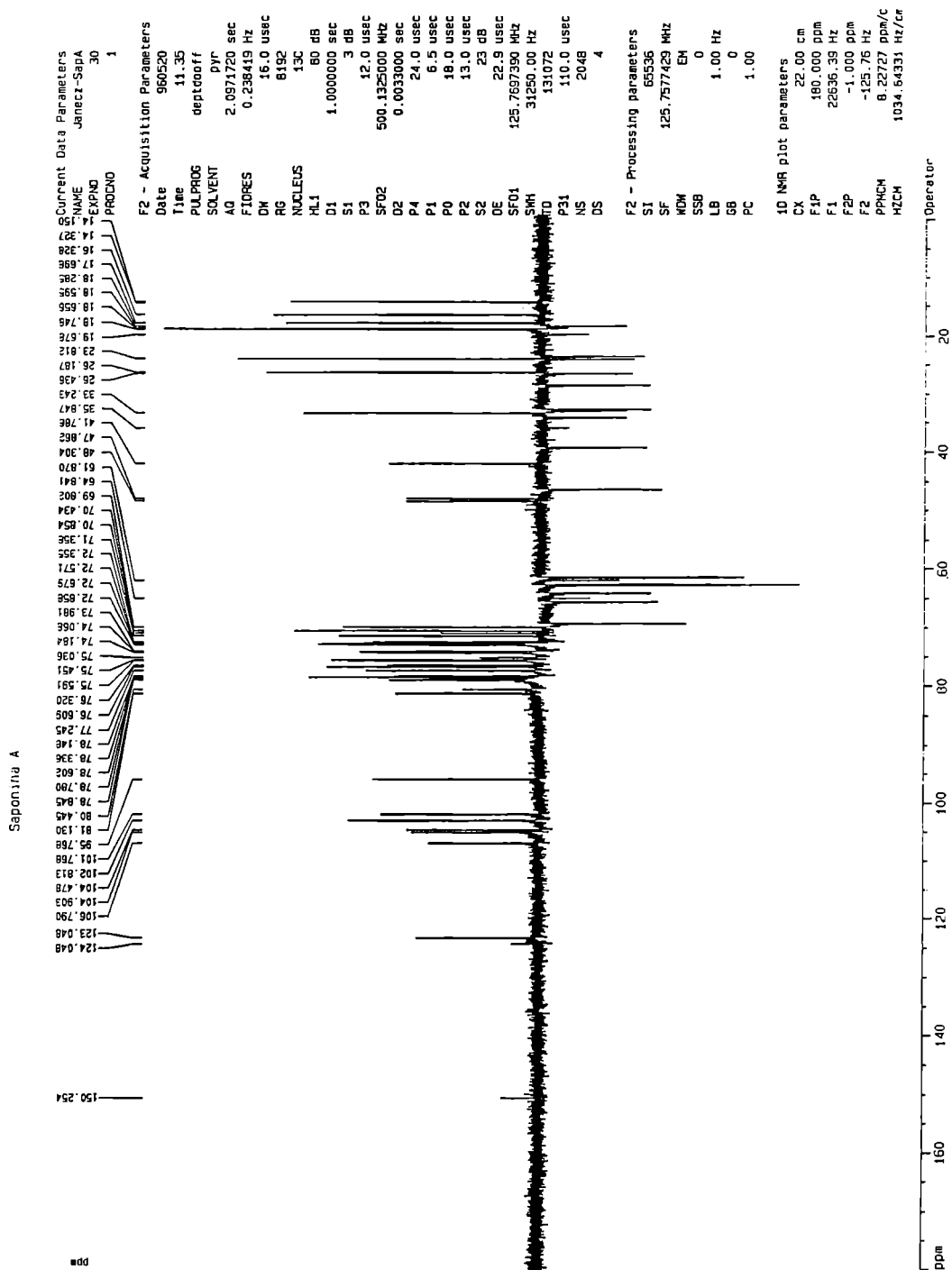


Rys. 78 Widmo NOESY saponozydu A.

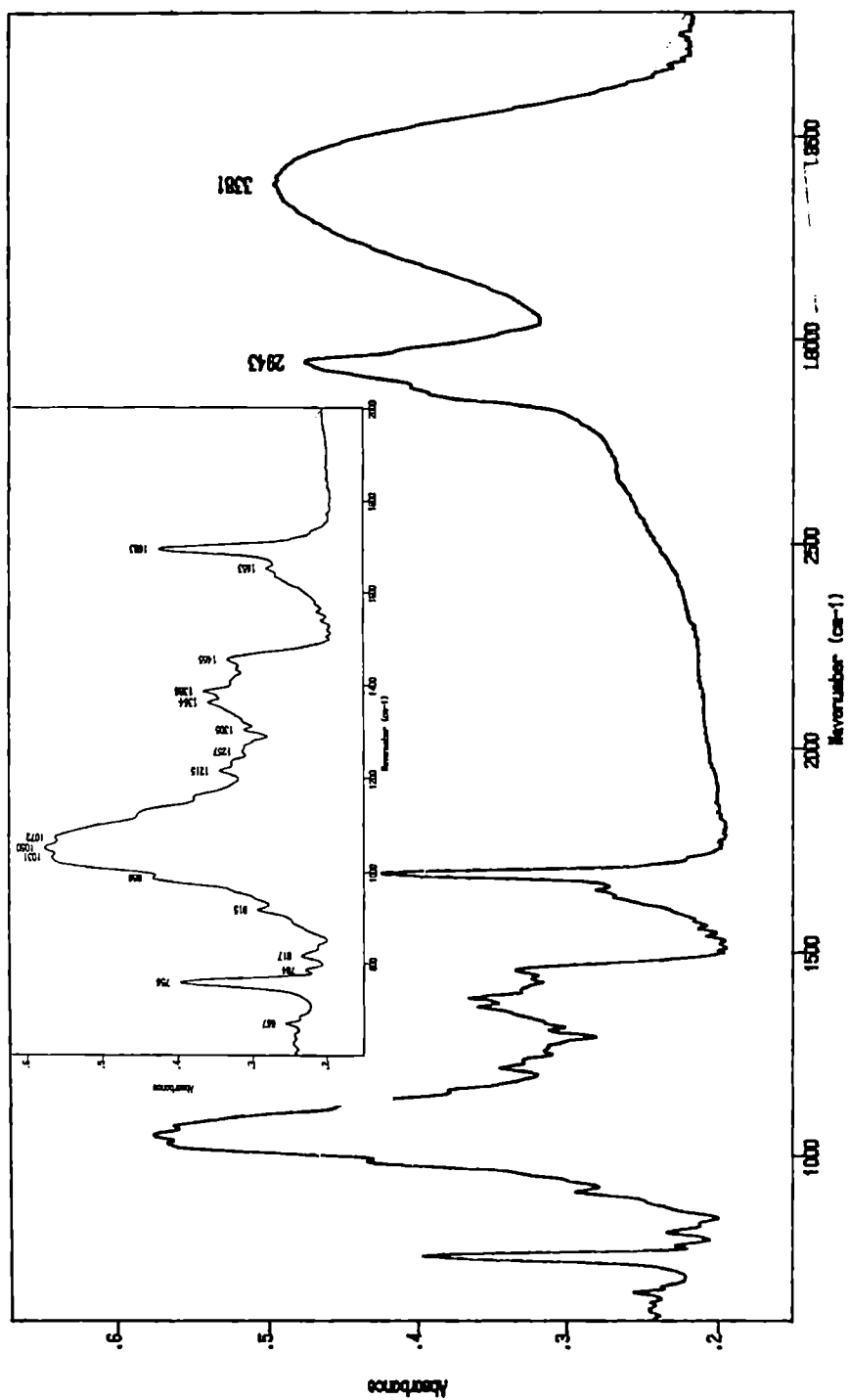
Saponina A



Rys. 79 Widmo ¹³C NMR saponozydu A.

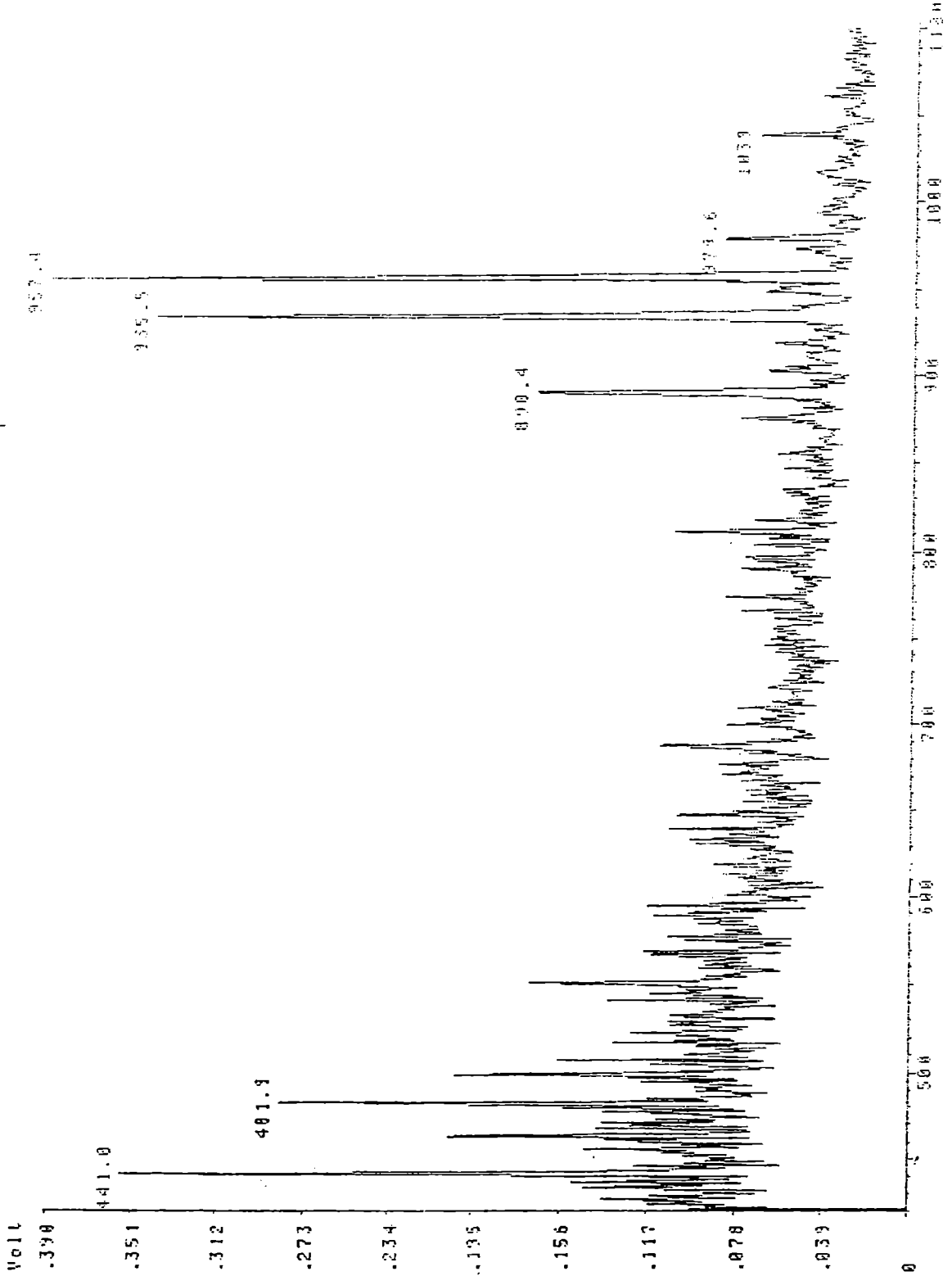


Rys. 80 Widmo DEPT saponozydu A.

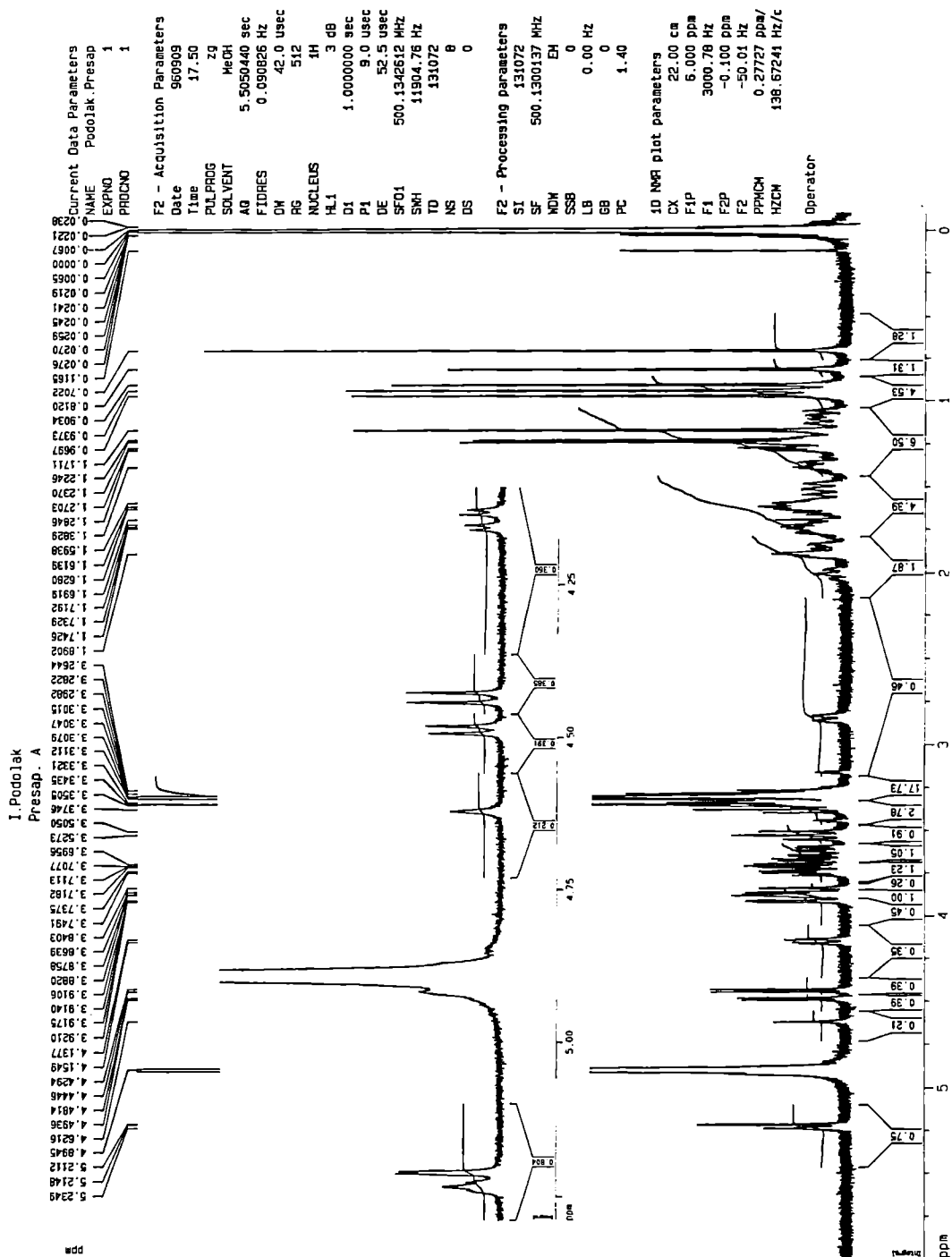


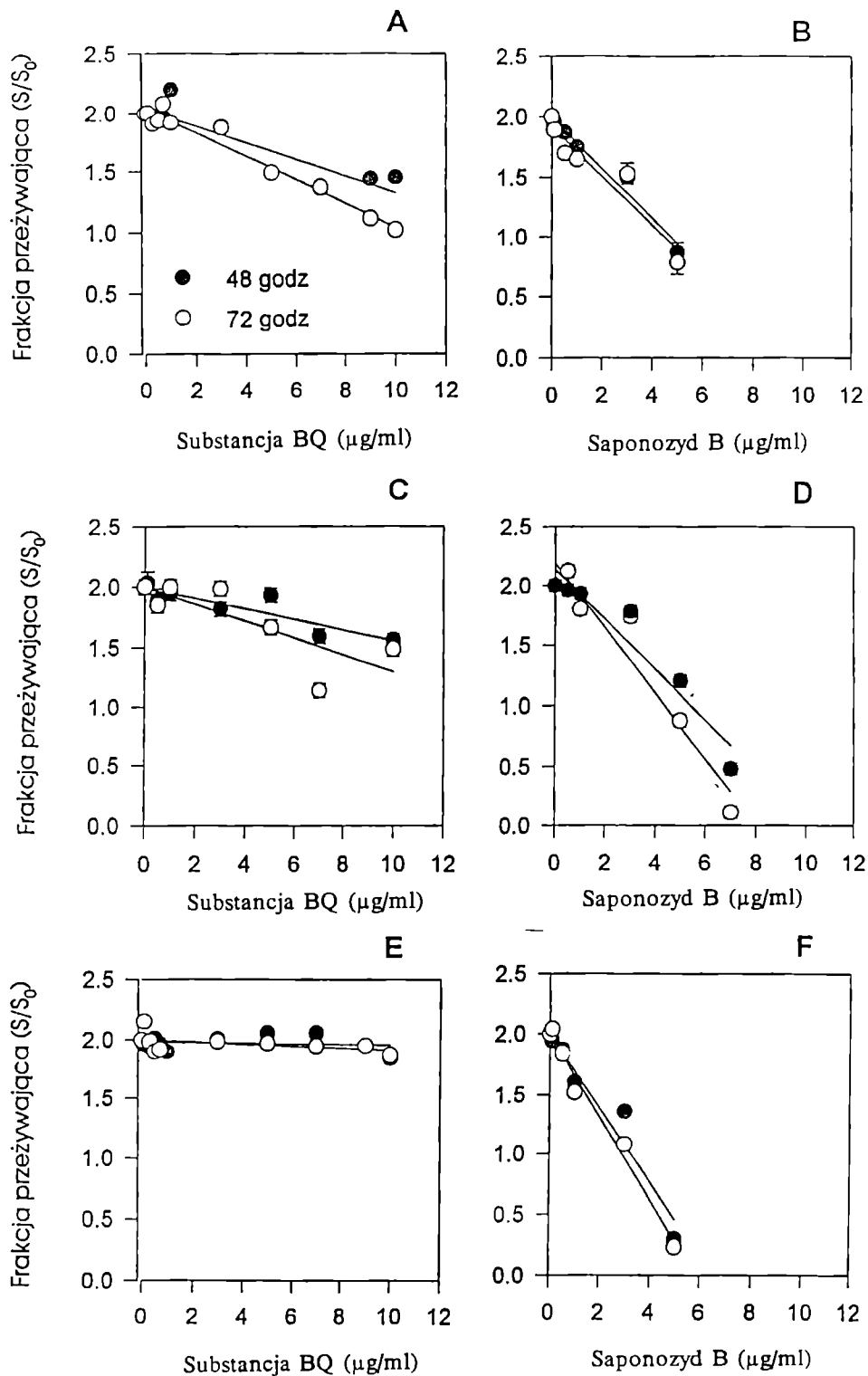
Rys. 81 Widmo IR prosapogeniny saponozydu A.

Analysis : UDCM1847L, Ver . 11, of No, 17.07.96 13:04
Comment : 2 (LSIMS+) HAN 80-1500 Ss 21171 Nr 1847990 , Sodaewo WasOAc



Rys. 82 Widmo LSIMS prosapogeniny saponozydu A.

Rys. 83 Widmo ^1H NMR prosapogeniny saponozydu A.



Rys. 84 Krzywe przeżywalności komórek linii:

1. CHO (wykresy A i B)
2. Melanomy mysiej S91 (wykresy C i D)
3. Melanomy ludzkiej BM (wykresy E i F)