

\*Marcin Szymański<sup>1</sup>, Paulina Turczynowicz<sup>1</sup>, Arkadiusz Szymański<sup>2</sup>

## Badania wyciągów z liści, kwiatów, owoców i gałązek *Padus avium* Mill.

### Research on extracts from leaves, flowers, fruits and twigs of *Padus avium* Mill.

<sup>1</sup>Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Dyrektor Centrum: prof. dr hab. n. chem. Bronisław Marciniak

<sup>2</sup>Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Dziekan Wydziału Chemii: prof. dr hab. n. chem. Maciej Kubicki

---

#### SUMMARY

**Introduction.** The bird cherry (*Padus avium* Mill.) belongs to the Rosaceae family and is common in Poland. In various parts of the plant, among others, flavonoids, anthocyanins, phenolic compounds, cyanogenic glucosides, tannins, essential oil, organic acids and sugars are present. They determine astringent, anti-inflammatory, estrogenic, anesthetic, antidiabetic, cytotoxic and antibacterial properties.

**Aim.** Determination of antioxidant activity and sum of polyphenols in leaves, flowers, fruits and young branches of bird cherry, as well as confirmation of the presence of selected flavonoids and phenolic acids.

**Material and methods.** The research material was leaves, flowers, fruit and young twigs of *Padus avium*, collected from a natural site in the Noteć Forest (near Sieraków). The contents of the sum of polyphenols in the prepared extracts were determined by spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu (FC) reagent and the antioxidant activity by the DPPH radical method and the FRAP method, and the presence of selected flavonoids and phenolic acids was confirmed by thin-layer and paper chromatography.

**Results.** In water and methanol extracts, the highest content of polyphenols (%) in terms of coffee acid was found in leaves ( $6.91 \pm 0.30\%$ ;  $9.02 \pm 0.34\%$ ), and the lowest in fruits ( $2.05 \pm 0.11\%$ ;  $3.11 \pm 0.11\%$ ). Water and methanol extracts from leaves showed the highest antioxidant activity and the weakest water extracts from fruit (DPPH and FRAP methods). 1D-TLC, 2D-TLC and tissue paper (PC) analysis revealed the presence of rutoside in flowers and twigs, hyperoside in leaves, flowers, fruits and twigs, and most likely ferulic and vanillic acids in fruits and twigs, chlorogenic and coffee acids in all raw materials from the bird cherry.

**Conclusions.** The highest content of polyphenolic compounds was determined in black cherry leaves, both in water and methanol extracts. The water and methanol extracts from the leaves showed the strongest antioxidant activity. The presence of rutoside, hyperoside and some phenolic acids was confirmed in the tested raw materials.

---

**Keywords:** *Padus avium*, polyphenols, antioxidant activity, TLC, PC

---

#### STRESZCZENIE

**Wstęp.** Czeremcha zwyczajna (*Padus avium* Mill.) należy do rodziny Rosaceae i występuje pospolicie w Polsce. W różnych częściach rośliny obecne są m.in.: flawonoidy, antocyjany, związki fenolowe, glikozydy cyjanogenne, garbniki, olejki eteryczne, kwasy organiczne i cukry. Warunkują one właściwości ściągające, przeciwzapalne, estrogenne, znieczulające, przeciwcukrzycowe oraz przeciwbakteryjne.

**Cel pracy.** Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej oraz sumy polifenoli w liściach, kwiatach, owocach i młodych gałązkach czeremchy zwyczajnej, a także potwierdzenie obecności wybranych flawonoidów i kwasów fenolowych.

**Materiał i metody.** Materiałem do badań były liście, kwiaty, owoce oraz młode gałązki *Padus avium*, zebrane z naturalnego stanowiska w Puszczy Noteckiej (okolicie Sierakowa). W sporządzonych wyciągach oznaczono metodą spektrofotometryczną zawartość sumy polifenoli z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC) oraz aktywność antyoksydacyjną metodą z rodnikiem DPPH i metodą FRAP, a przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej i bibułowej potwierdzono obecność wybranych flawonoidów i kwasów fenolowych.

**Wyniki.** W wyciągach wodnych i metanolowych najwyższą zawartość polifenoli (%) w przeliczeniu na kwas kawowy stwierdzono w liściach ( $6,91 \pm 0,30\%$ ;  $9,02 \pm 0,34\%$ ), a najniższą w owocach ( $2,05 \pm 0,11\%$ ;  $3,11 \pm 0,11\%$ ). Wyciągi wodne i metanolowe z liści wykazywały najwyższą aktywność antyoksydacyjną, a najslabszą wyciągi wodne z owoców (metoda DPPH i FRAP). Analiza metodą 1D-TLC, 2D-TLC oraz bibułową (PC) pozwoliła wykazać obecność rutozydu w kwiatach i gałązkach, hiperozydu w liściach, kwiatach, owocach i gałązkach oraz najprawdopodobniej kwasu ferulowego i wanilinowego w owocach i gałązkach, kwasu chlorogenowego i kawowego we wszystkich surowcach z czeremchy zwyczajnej.

**Wnioski.** Największą zawartość związków polifenolowych oznaczono w liściach czeremchy, zarówno w wyciągach wodnych, jak i metanolowych. Najsilniejszą aktywność antyoksydacyjną wykazywały wyciągi wodne i metanolowe z liści. W badanych surowcach potwierdzono obecność rutozydu, hiperozydu i niektórych kwasów fenolowych.

**Słowa kluczowe:** *Padus avium*, polifenole, aktywność antyoksydacyjna, TLC, PC

## Wstęp

Czeremcha zwyczajna (*Padus avium* Mill.) jest rośliną należącą do rodzaju *Prunus* z rodziny *Rosaceae* (1). Rodzaj ten obejmuje 10 podrodzajów, tj.: *Amygdalus*, *Armeniaca*, *Cerasus*, *Emplectocladus*, *Laurocerasus*, *Maddenia*, *Padus*, *Persica*, *Prunus* i *Pygeum* oraz ponad 200 gatunków, w tym popularne rośliny ozdobne oraz owocowe (2). Do najbardziej znanych drzew owocowych z tej grupy należą m.in. brzoskwinia zwyczajna (*Prunus persica*), śliwa domowa (*Prunus domestica*), śliwa wiśniowa (*Prunus cerasifera*), morela pospolita (*Prunus armeniaca*), migdałowiec pospolity (*Prunus communis*), wiśnia ptasia – czereśnia (*Prunus avium*) i wiśnia piłkowana (*Prunus serrulata*) (3, 4).

Czeremcha zwyczajna znana była już w starożytności. Po raz pierwszy opisał ją i nadał jej łacińską nazwę Linneusz w 1743 roku (5).

Czeremcha zwyczajna występuje w całej Europie, od północnej Skandynawii i północnej Rosji, aż po góry w Hiszpanii i Portugalii. Rozpowszechniona jest także w Szkocji, północnej Anglii i Walii, w północno-zachodnich Włoszech, w Chorwacji i Bułgarii. Obecna jest również w Azji Mniejszej oraz na obszarach rozciągających się od Syberii po Kaukaz i Himalaje. Nie występuje w zachodniej części Francji, nad Morzem Śródziemnym i w południowo-wschodniej Rosji (1).

Czeremcha zwyczajna występuje jako duży krzew lub drzewo (6), a wysokość dojrzałych osobników waha się pomiędzy 3 a 15 m. Najniższa czeremcha zwyczajna została opisana w Rosji i miała 0,6 m wysokości. Podgatunki *borealis* i *petraea* są krzewami i rzadko mają więcej niż 3 m. Korona młodych osobników jest zazwyczaj otwarta i rozgałęziona, o stożkowym kształcie, a górne gałęzie rosną ku górze. Starzenie się rośliny powoduje, że gałęzie zaczynają opadać, korona staje się okrągła lub wydłużona. W cieniu młode gałązki mają barwę czerwono-purpurową, natomiast w słońcu czerwoną lub czerwono-brązową. Kora jest zazwyczaj błyszcząca o silnym zapachu garbników. Długość pączków wynosi 2-10 mm, a szerokość – ok. 2 mm. Liście są omszone, mają zwykle 5-10 cm długości i 3-6 cm szerokości. Mogą mieć kształt eliptyczny, jajowaty lub odwrotnie jajowaty, są szpiczaste, zaokrąglone lub sercowate u podstawy. Brzegi blaszek są

zazwyczaj ząbkowane. Liście sztywne, skórzaste, najczęściej matowe. Zazwyczaj gładkie i ciemnozielone po górnej stronie, jasne lub z białymi włoskami od spodu. W kwiatostanie występuje 10-35, czasem nawet 40 kwiatów, korona najczęściej jest 5-płatkowa. Płatki mają kształt owalny lub jajowaty, najczęściej są białe, czasem bladoloróżowe. Pręciki (20-33) są o połowę dłuższe niż płatki, ale krótsze niż działki kielicha. Owoce są prawie kuliste lub kulisto-owalne o długości 6-8 mm i szerokości ok. 5 mm, zazwyczaj czarne lub ciemnofioletowe (1, 5).

Do głównych grup związków chemicznych występujących w tej roślinie możemy zaliczyć: flawonoidy, antocyjany, związki fenolowe, glikozydy cyjanogenne, garbniki, olejek eteryczny, kwasy organiczne i cukry. Flawonoidy zostały wyodrębnione z różnych części czeremchy zwyczajnej (liście, kwiaty, owoce i kora) (5). Zestawienie flawonoidów z podziałem na budowę chemiczną przedstawiono w tabeli 1.

Kwasy fenolowe wyodrębnione z liści czeremchy zwyczajnej są pochodnymi kwasu cynamonowego (kwas: p-kumarowy, kawowy, synapinowy i ferulowy) oraz kwasu benzoowego (kwas: p-hydroksybenzoowy i wanilinowy) (5). Zidentyfikowany został także kwas chlorogenowy (5-kawoilochinowy) (7). W owocach czeremchy znajdują się pochodne kwasu cynamonowego: kwas p-kawoilochinowy, heksozyd kwasu kawowego, heksozyd kwasu p-kumarowego, kwas 5-kawoilochinowy, kwas dikawoilochinowy (9). W niedojrzałych liściach czeremchy zwyczajnej zidentyfikowano glukozyl cyjanogeny – prunazyne. W kwiatach znajduje się olejek eteryczny, w skład którego wchodzi: lupeol, benzaldehyd, alkohol 2-fenyloetylowy, fenyloacetaldehyd, fenyloacetonitryl, linalol, związki zawierające azot: indol, antranilan metylu, aldehyd antranilowy, 2-aminoacetofenon i aldehyd nikotynowy, estry metylowe N-formyloleucyny i N-formyloizoleucyny, N-(2-acetylofenylo)-formamid i 1,4-dihydro-2-metylo-2H-3,1-benzoksazyna (13). W owocach czeremchy znajdują się garbniki oraz związki magnezu, wapnia, fosforu oraz żelaza (5), ponadto cukry (glukoza, fruktoza, sorbitol), karotenoidy ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, luteina), tokoferole ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), kwasy: jabłkowy, cytrynowy, chinowy, szikimowy i fumarowy (9, 14). W nasionach występuje glikozyl cyjanogeny – amygdalina (5). Z kory zostały

Tab. 1. Flawonoidy w *Padus avium*

Typ flawonoidu	Nazwa flawonoidu	Surowiec	Literatura
Flawonole (w tym ich glikozydy)	Kwercetyna, rutozyd, hiperozyd, 3-O- $\beta$ -ksylopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -galaktopiranozyd kwercetyny i 3-O- $\beta$ -ksylopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny, kemferol i pochodne: astragalina (3-O- $\beta$ -D-glukozyd kemferolu), pochodne izoramnetyny: 3-O- $\beta$ -ksylopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -galaktopiranozyd izoramnetyny, dihydrowogonina, pinostrobin, padmatyna	Liście	(5, 7)
	Kwercetyna i pochodne: hiperozyd (3-galaktozyd), astragalina, trioza kwercetyny z galaktozą, ksylozą i glukozą	Kwiaty	(8)
	Rutyna, hiperozyd, 3-rutynozyd izoramnetyny	Owoce	(9, 10)
Flawony	Chryzyna, genkwanina, luteolina, tektochryzyna, skutelaryna, apigenina	Liście	(5, 7)
	Ramnozyd apigeniny	Owoce	(9, 10)
Flawanony	Eriodyktiol, hesperetyna, izosakuranetyna, sakuranetyna, naryngenina, pinocebryna	Liście	(5, 7)
Flawanonol	Aromadendryna, taksyfolina	Liście	(5,7)
Katechiny	Epikatechina	Owoce	(9, 10)
Antocyjanidyny	Ramnozylo-heksozyd cyjanidyny, 3-glukozyd cyjanidyny, 3-rutynozyd cyjanidyny, 3-galaktozyd cyjanidyny	Owoce	(9, 11, 12)
Dihydrochalkon	Florydzyna	Owoce	(9, 10)

wyodrębnione glukozydy cyjanogenne (prunazyne, prunaurazyne), które mogą też występować w niedojrzałych owocach (5). Z gałązek (kory) wyizolowano dwa ksylozydy lignanów – ssioryzyd i prupazyd (16).

Metanolowy wyciąg z liści oraz gałązek tej rośliny hamował  $\alpha$ -glukozydazę, wskazując na działanie przeciw cukrzycowe (17). Wykazano silne właściwości przeciwzapalne nie tylko w badaniach *in vitro*, ale także *in vivo* (zmniejszenie obrzęku zapalnego), oraz działanie przeciwbólowe przez mechanizm centralny i obwodowy (częściowo jako agonista receptora opioidowego), co może być wykorzystane w chorobach przewlekłych związanych ze stanami zapalnymi i bólem (15). Metanolowy wyciąg z gałązek czeremchy wykazywał silne działanie przeciwbakteryjne względem bakterii Gram-dodatnich (17).

Czeremcha zwyczajna jest od dawna wykorzystywana w medycynie tradycyjnej. Owoce wykazują właściwości ściągające, przeciwzapalne oraz fitoestrogenowe i są stosowane w zapaleniach jelit, niestrawności, kolkach oraz bieguncie, jako środek znieczulający i dezynfekcyjny (15), także w kaszlu, bólu głowy, jako środek uspokajający oraz korzystnie działający na cerę i wzrok. W jednostkach chorobowych, takich jak udar mózgu, nerwobóle czy zapalenie wątroby, odnotowano pozytywne skutki stosowania tej rośliny (17-22).

## Cel pracy

Celem pracy było oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej oraz sumy polifenoli w liściach, kwiatach, owocach i młodych gałązkach czeremchy zwyczajnej, a także potwierdzenie obecności wybranych flawonoidów i kwasów fenolowych.

## Materiał i metody badań

### Materiał do badań

Materiałem do badań były liście, kwiaty, owoce oraz młode gałązki *Padus avium* zebrane z naturalnego stanowiska w Puszczy Noteckiej (okolice Sierakowa) i wysuszone w temperaturze pokojowej w zacienionym i przewiewnym miejscu.

Przygotowanie wyciągów podstawowych do oznaczeń sumy polifenoli oraz aktywności antyoksydacyjnej metodą z DPPH i FRAP

Odważono 2,5000 g sproszkowanego surowca (waga analityczna Sartorius LE225D-OCE). Następnie przeniesiono do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml i dodano wodę (wyciąg wodny) lub metanol (wyciąg metanolowy). Ekstrahowano na łaźni wodnej, utrzymując wyciąg w stanie wrzenia przez 15 minut. Całość przesączono do próbek

miarowych. Sączi zawrócono do kolby i ekstrakcję powtórzono, zachowując takie same warunki, a następnie połączono, otrzymując wyciąg podstawowy wodny (WO) i metanolowy (ME).

Przygotowanie wyciągów do badań TLC i obliczenie procentowej zawartości suchego wyciągu

5,0000 g surowca odważono i umieszczono w kolbce okrągłodennej o pojemności 100 ml. Dodano 50 ml 50% metanolu i utrzymywano w stanie wrzenia przez 20 minut, a następnie wyciąg ochłodzono do temperatury pokojowej i przesączono przez watę. Ekstrakcję powtórzono, zawierając watę do kolby. Oba wyciągi połączono i odparowano na wyparce do sucha. Tabela 2 przedstawia obliczoną zawartość suchego wyciągu w poszczególnych surowcach.

W celu oczyszczenia wyciągu, suchą pozostałość zalano wrzącą wodą demineralizowaną i odstawiono na 16 godz. Przefiltrowano przez watę do rozdzielacza. Wytrząsano rozpuszczalnikami o wzrastającej sile elucji:

- chloroformem: ekstrakcja przeprowadzona była 4 porcjami odczynnika; ekstrakty połączono i przesączono przez sącze, na którym znajdował się 1 g bezwodnego siarczany sodu ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (usunięcie resztek wody). Przesącz odparowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w ok. 2 ml metanolu. Z wodnej pozostałości odparowano resztki chloroformu i kontynuowano ekstrakcję octanem etylu,

- octan etylu: ekstrakcja przeprowadzona była 4 porcjami odczynnika; ekstrakty połączono i przesączono przez sącze z bezwodnym siarczany sodu ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Odparowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w ok. 2 ml metanolu. Fazę wodną po ekstrakcji octanem etylu odparowano do sucha,
- metanol: do suchej pozostałości dodano metanol i utrzymywano w temperaturze wrzenia, cały czas intensywnie mieszając. Następnie ekstrakt ostudzono i przesączono. Przesącz odparowano na wyparce do sucha i rozpuszczono w ok. 2 ml metanolu,
- woda – pozostałość, która nie rozpuściła się w metanolu, rozpuszczono w ok. 2 ml wody destylowanej.

W tabeli 3 przedstawiono oznaczenia poszczególnych wyciągów.

#### Metody badawcze

Oznaczenie zawartości sumy polifenoli z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC)

Oznaczenie sumy polifenoli wykonano metodą z wykorzystaniem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC) oraz 20% roztworu węglanu sodu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Jest to metoda kolorymetryczna opierająca się na pomiarze proporcjonalnie wzrastającego natężenia barwy roztworu w stosunku do zawartości w próbie związków fenolowych, reagujących z wyżej wymienionymi

Tab. 2. Zawartość suchego wyciągu w surowcach *Padus avium*

Surowiec – część <i>Padus avium</i>	Naważka surowca [g]	Masa suchego wyciągu [g]	Zawartość suchego wyciągu [%]
Liście	5,0152	1,5406	30,7
Kwiaty	5,0335	1,3653	27,1
Owoce	5,0500	2,9481	58,4
Gałązki	5,2111	0,7588	14,6

Tab. 3. Oznaczenie poszczególnych wyciągów

<i>Padus avium</i>	Wyciąg			
	Chloroform – CH	Octan etylu – OE	Metanol – ME	Woda – WO
Liście – L	LCH	LOE	LME	LWO
Kwiaty – K	KCH	KOE	KME	KWO
Owoce – O	OCH	OOE	OME	OWO
Gałązki – G	GCH	GOE	GME	GWO

odczynnikami. Absorbancję odczytywano przy długości fali  $\lambda_{\max} = 760$  nm (spektrofotometr UV VIS Lambda 35 Perkin-Elmer). Krzywą kalibracyjną sporządzono dla kwasu kawowego w zakresie od 0,1 do 1,0  $\mu\text{g}/2$  ml.

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem rodnika DPPH

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej zostało wykonane metodą spektrofotometryczną wobec roztworu rodnika DPPH. Pomiaru dokonano przy długości fali  $\lambda_{\max} = 515$  nm w kuwetach plastikowych o grubości 1 cm.

Oznaczenie całkowitej aktywności redukcji jonów żelaza (III) metodą FRAP

Oznaczanie przeprowadzono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyn). Opiera się ono na ocenie zdolności badanego roztworu do redukcji jonów  $\text{Fe}^{3+}$  do jonów  $\text{Fe}^{2+}$ . Zredukowane jony żelaza są następnie kompleksowane przez TPTZ i pojawia się niebieskie zabarwienie. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali  $\lambda = 593$  nm.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Faza stała: płytki aluminiowe pokryte warstwą celulozy (metoda 2D na kwasy fenolowe) lub żelem krzemionkowym (1D) o grubości 0,1 mm i wymiarze 20 x 20 cm.

Na płytki nanoszono punktowo za pomocą kapilar wyciągi lub roztwory wzorcowe. Nanoszone plamy miały średnicę ok. 5 mm. Płytki rozwijano metodą jednokierunkową (1D) z zastosowaniem mieszaniny: octan etylu-metanol-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda (80:10:1:1:8) oraz dwukierunkową (2D-TLC) w układach:

T<sub>1</sub>: toluen-lodowaty kwas octowy-woda (6:7:1) I kierunek,

T<sub>2</sub>: lodowaty kwas octowy-woda (15:85) II kierunek.

Odczynnik wywołujący w metodzie 1D: NA – Natursstoffreagens A (0,1% metanolowy roztwór kwasu difenyloborowego i etanoloaminy).

Odczynnik wywołujący w metodzie 2D: mieszanina dwuazowanego kwasu sulfanilowego i 20% węgla sodu (1:1) przygotowana *ex tempore*.

Rozwinięte chromatogramy pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Płytki rozwinięte metodą 1D zostały wywołane odczynnikami NA, analizowano je pod lampą UV, natomiast rozwinięte metodą 2D, po spryskaniu odczynnikami wywołującymi, analizowano w świetle dziennym.

Chromatografia bibułowa (PC)

Faza stała: bibuła chromatograficzna.

Na bibułę naniesiono punktowo wzorce oraz przygotowane wyciągi. Bibułę rozwinięto w 15% kwasie octowym, stosując technikę wstępującą. Wysuszono w temperaturze pokojowej i po wywołaniu odczynnikiem NA analizowano w świetle lampy UV.

Odczynnik wywołujący NA – Natursstoffreagens A (0,1% metanolowy roztwór kwasu difenyloborowego i etanoloaminy).

## Wyniki i dyskusja

Sumę polifenoli (w %) wyznaczono z równania krzywej wzorcowej kwasu kawowego. Analizując wyniki badań dla wyciągów wodnych z liści, kwiatów, owoców oraz młodych gałązek czeremchy zwyczajnej, najwyższą zawartość polifenoli stwierdzono w liściach ( $6,91 \pm 0,30\%$ ), następnie w kwiatach ( $4,00 \pm 0,43\%$ ) i młodych gałązkach ( $2,71 \pm 0,27\%$ ), najniższą w owocach ( $2,05 \pm 0,11\%$ ). W wyciągach metanolowych najwięcej polifenoli oznaczono w liściach ( $9,02 \pm 0,34\%$ ), następnie w kwiatach ( $4,18 \pm 0,20\%$ ), młodych gałązkach ( $3,76 \pm 0,22\%$ ) i owocach ( $3,11 \pm 0,11\%$ ).

Najniższe wartości współczynnika  $\text{IC}_{50}$  (metoda z odczynnikami DPPH) wyznaczono dla wyciągów wodnych i metanolowych z liści, a najwyższe dla wyciągów wodnych z owoców. Oznacza to, że wyciągi z liści czeremchy zwyczajnej są najsilniejszymi antyoksydantami.

Badania metodą FRAP wykazały, że najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne posiadały wyciągi wodne i metanolowe z liści, a najsłabsze wyciągi wodne z owoców. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 4.

**Tab. 4.** Wartości współczynników  $\text{IC}_{50}$  z odchyleniem standardowym dla badanych wyciągów

Badane wyciągi	DPPH		FRAP	
	$\text{IC}_{50}$	SD	$\text{IC}_{0,5}$	SD
LWO	0,68	0,03	0,99	0,09
KWO	1,77	0,18	1,88	0,21
OWO	4,52	0,36	3,50	0,33
GWO	2,55	0,31	2,86	0,25
LME	0,60	0,01	0,84	0,05
KME	1,34	0,11	1,63	0,23
OME	1,63	0,20	1,76	0,10
GME	0,73	0,02	1,23	0,09

### Chromatografia w układzie 1D

W celu potwierdzenia obecności flawonoidów w kwiatach i liściach czeremchy zwyczajnej wykonano chromatografię cienkowarstwową w układzie 1D. Po wstępnych badaniach wyciągu chloroformowego, octanu etylu i metanolowego odrzucono wyciągi LCH i KCH. Do analizy wykorzystano wyciągi LOE, LME, KOE i KME. Wyciągi te oraz wzorce naniesiono punktowo na płytki i rozwinięto techniką wstępującą w układzie: octan etylu-metanol-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda (80:10:1:1:8). Wyniki przedstawiono w tabeli 5.

### Chromatografia w układzie 2D

W celu potwierdzenia obecności kwasów fenolowych w kwiatach, liściach, owocach i młodych gałązkach czeremchy zwyczajnej wykonano chromatografię cienkowarstwową w układzie 2D. Użyto wzorców

sześciu kwasów fenolowych: ferulowego (1), rozmarynowego (2), galusowego (3), chlorogenowego (4), kawowego (5) i wanilinowego (6). Wzorce i wyciągi zostały naniesione na płytki metodą punktową. Chromatogramy po wysuszeniu analizowano po wywołaniu zdwuazowanym kwasem sufaniłowym. W wyciągach GOE oraz OOE plama o barwie pomarańczowej (nr 1) jest najprawdopodobniej kwasem ferulowym, a pomarańczowa plama (nr 6) kwasem wanilinowym. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 6.

W celu potwierdzenia obecności związków flawonoidowych oraz kwasów fenolowych w wyciągach octanu etylu i metanolowej wyciągów z liści (LOE i LME), kwiatów (KOE i KME), owoców (OOE i OME) i młodych gałązek (GOE i GME) wykonano chromatografię bibułową. Użyto wzorców 3 flawonoidów: rutozydu (W1), hiperozydu (W2) i kwercetyny (W3) oraz dwóch kwasów fenolowych: chlorogenowego (W4) i kawowego (W5). Naniesiono

**Tab. 5.** Flawonoidy w wyciągach metanolowych i octanu etylu z liści i kwiatów

Nr plamy na chromatogramie	Flawonoidy	Rf wzorców	Fluorescencja UV po wywołaniu	Analizowane wyciągi			
				LOE	LME	KOE	KME
1	rutozyd	0,28	pom	-	+ (?)	+	+ (?)
2	hiperozyd	0,52	pom	+	+	+	+ (?)
3	kwercetyna	0,98	ż	-	-	+ (?)	-
Objaśnienia:	Fluorescencja plam: pom – pomarańczowa, ż – żółta - nie stwierdzono obecności + (?) przypuszczalnie występuje w wyciągu + stwierdzono obecność						

**Tab. 6.** Kwasy fenolowe w badanych wyciągach

Nr plamy na chromatogramie	Kwasy fenolowe	Rf wzorców		Barwa po wywołaniu	Analizowane wyciągi	
		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>		OOE	GOE
1	ferulowy	0,66	0,89	pom	+(słabe)	+(słabe)
2	rozmarynowy	0,54	0,53	róż	-	-
3	galusowy	0,46	0,32	ziel	-	-
4	chlorogenowy*	0,70	0,51	ż	-	-
5	kawowy*	0,47	0,67	nieb	-	-
6	wanilinowy	0,66	0,89	pom	+(słabe)	+(intensywne)
Objaśnienia:	Barwa plam w świetle widzialnym: pom – pomarańczowa, ż – żółta, nieb – niebieska, ziel – zielona, róż – różowa +(słabe) obecny, słaba intensywność +(intensywne) obecny, duża intensywność - nie stwierdzono obecności					

\*kwasy występują w formie izomerów

**Tab. 7.** Flawonoidy i kwasy fenolowe w wyciągach metanolowych i octanu etylu z liści i kwiatów

Nr plamy na chromatogramie	Flawonoidy/kwasy fenolowe	Rf wzorców	Fluorescencja UV po wywołaniu NA	Analizowane wyciągi			
				LOE	LME	KOE	KME
1	rutozyd	0,57	pom	–	–	+ (?)	+ (?)
2	hiperozyd	0,39	pom	+	+	+	+
3	kwercetyna	0,05	ż-pom	–	–	–	–
4	kwask chlorogenowy*	0,76	nieb	–	+ (?)	–	+ (?)
5	kwask kawowy*	0,71	nieb	–	+ (?)	–	+ (?)
Objaśnienia:	Fluorescencja plam: pom – pomarańczowa, ż – żółta, nieb – niebieska						

\*kwasy występują w formie izomerów

**Tab. 8.** Flawonoidy i kwasy fenolowe w wyciągach metanolowych i octanu etylu z owoców i młodych gałązek

Nr plamy na chromatogramie	Flawonoidy/kwasy fenolowe	Rf wzorców	Fluorescencja UV po wywołaniu NA	Analizowane wyciągi			
				OOE	OME	GOE	GME
1	rutozyd	0,57	pom	–	–	–	+ (?)
2	hiperozyd	0,39	pom	+	–	+	–
3	kwercetyna	0,05	ż-pom	–	–	–	–
4	kwask chlorogenowy*	0,76	nieb	–	+ (?)	–	+ (?)
5	kwask kawowy*	0,71	nieb	–	+ (?)	–	+ (?)
Objaśnienia:	Fluorescencja plam: pom – pomarańczowa, ż – żółta, nieb – niebieska						

\*kwasy występują w formie izomerów

je punktowo na arkusz, na który naniesiono także badane wyciągi. Chromatogramy po wysuszeniu analizowano w świetle lampy UV po wywołaniu odczynnikiem NA. W wyciągach LOE, LME, KOE, KME, OOE i GOE zaobserwowano plamy, które fluoryzowały na pomarańczowo (hiperozyd i rutozyd). Porównując z wartościami Rf wzorców, można potwierdzić obecność hiperozydu w wymienionych wyciągach. Można przypuszczać, że w wyciągach KOE, KME i GME występuje rutozyd. Plamy fluoryzujące na niebiesko mogą sugerować, że w wyciągach LME i KME jest kwas kawowy i chlorogenowy. Wyniki analizy przedstawiono w tabelach 7 i 8.

## Wnioski

Liście, kwiaty, owoce i młode gałązki pochodzące z czeremchy zwyczajnej są bogate w związki polifenolowe. Największą zawartość związków polifenolowych, w przeliczeniu na kwas kawowy, oznaczono w liściach. Najsilniejszą aktywność antyoksydacyjną wykazywały wyciągi wodne i metanolowe z liści. Wyciągi o największej zawartości sumy polifenoli wykazywały jednocześnie najwyższą aktywność antyoksydacyjną.

Chromatografia TLC i PC wyciągów potwierdziła obecność rutozydu w kwiatkach i młodych gałązkach, hiperozydu we wszystkich częściach czeremchy.

## Piśmiennictwo

1. Leather SR. *Prunus Padus* L. J Ecol 1996; 84:125-32.
2. Pairon MC, Jacquemart AL. Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (*Rosaceae*). J Am Soc Hortic Sci 2005; 130(5):729-34.
3. Depypere L, Chaerle P, Vander Mijnsbrugge K i wsp. Stony endocarp dimension and shape variation in *Prunus* Section *Prunus*. Ann Bot 2007; 100:1585-97.
4. Shi S, Li J, Sun J. Phylogeny and classification of *Prunus sensu lato* (*Rosaceae*). J Integr Plant Biol 2013; 55(11):1069-79.
5. Uusitalo M. European bird cherry (*Prunus padus* L.) – a biodiverse wild plant for horticulture. Agrifood Research Reports 61, MTT Agrifood Research Finland, 2004: 82. [www.mtt.fi/met/pdf/met61.pdf](http://www.mtt.fi/met/pdf/met61.pdf).
6. Leather SR. Does the bird cherry have its 'fair share' of insect pests? An appraisal of the species – area relationships of the phytophagous insects associated with British *Prunus* species. Ecol Entomol 1985; 10:43-56.
7. Olszewska MA, Kwapisz A. Metabolite profiling and antioxidant activity of *Prunus padus* L. flowers and leaves. Nat Prod Res 2011; 25(12):1115-31.
8. Ostrowska B, Kowalewski Z. Flavonoidglykoside aus den Blüten von *Padus avium*. Planta Med 1971; 20(3):263-71.
9. Mikulic-Petkovsek M, Stampar F, Veberic R i wsp. Wild *Prunus* fruit species as a rich source of bioactive compounds. J Food Sci 2016; 81(8):1928-37.
10. Beketov EV, Pakhamov VP, Nesterova OV. Improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. Pharm Chem J 2005; 39(6):33-5.
11. Feng C, Su S, Wang L. Antioxidant capacities and anthocyanin characteristics of the black-red wild berries obtained in Northeast China. Food Chem 2016; 204:150-8.
12. Deineka V, Grigor'ev AM, Borzenko ON i wsp. HPLC analysis of anthocyanins: cyanidine glycosides from fruits of plants of the *Prunus* genus. Pharm Chem J 2004; 38(8):437-40.
13. Surburg H, Güntert M, Schwarze B. Volatile constituents of European Bird Cherry flowers (*Padus avium* Mill.). J Essent Oil Res 1990; 2(6):307-16.
14. Kucharska AZ, Oszmiański J. Anthocyanins in fruits of *Prunus padus* (bird cherry). J Sci Food Agric 2002; 82(13):1483-6.
15. Choi JH, Cha DS, Jeon H. Anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Prunus padus*. J Ethnopharmacol 2012; 144:379-86.
16. Yoshinari K, Sashida Y, Shimomura H. Two new lignan xylosides from the barks of *Prunus siori* and *Prunus padus*. Chem Pharm Bull 1989; 37(12):3301-3.
17. Hyun TK, Kim HC, Kim JS. *In vitro* screening for antioxidant, antimicrobial, and antidiabetic properties of some Korean native plants on Mt. Halla, Jeju Island. Indian J Pharm Sci 2015; 77(6):668-74.
18. Hwang D, Kim H, Shin H i wsp. Cosmetic effects of *Prunus padus* bark extract. Korean J Chem Eng 2014; 31(12):2280-5.
19. Kumarasamy Y, Coxa PJ, Jaspars M i wsp. Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. Fitoterapia 2004; 75:77-80.
20. Lenchuk LV, Kotov AG, Kyslychenko VS i wsp. Development of method of qualitative analysis of Bird cherry fruit for inclusion in the monograph of state Pharmacopoeia of Ukraine, 2016.
21. Pasko P, Makowska-Was J, Chlopicka J i wsp. South Siberian fruits: Their selected chemical constituents, biological activity, and traditional use in folk medicine and daily nutrition. J Med Plants Res 2012; 6(31):4698-706.
22. Sak K, Jürisoo K, Raal A. Estonian folk traditional experiences on natural anticancer remedies: From past to the future. Pharm Biol 2014; 52(7):855-66.

## Konflikt interesów

### Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 06.05.2021

zaakceptowano/accepted: 20.05.2021

Adres/address:

\*dr n. rol. Marcin Szymański

Centrum Zaawansowanych Technologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10

61-614 Poznań

e-mail: marcin.szymanski@amu.edu.pl