

АНАЛІЗ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ВЕРБИ ПРУТОВИДНОЇ МЕТОДОМ ВЕРХ

Наталія Бородіна¹, Олена Голембіовська²,
Наталія Фізор³

¹Національний фармацевтичний університет,

²Національний технічний університет України

"Київський політехнічний інститут імені Ігоря
Сікорського",

³Одеській національний медичний університет

Вступ. Родина деревних рослин *Salicaceae* Mirb. охоплює кілька сотень видів роду *Salix* L., а також значну кількість природних гібридів і мультигібридних комбінацій. Деякі представники цього роду включені у державні фармакопеї європейських країн. Сировина окремих видів *Salix* L. (*Salix purpurea* L., *Salix fragilis* L., *Salix daphnoides* L.) включена до Британської трав'яної фармакопеї, Французької фармакопеї, Європейської фармакопеї, а з 2014 року – до Державної фармакопеї України [1]. Основними біологічно активними компонентами сировини верби є фенольні глікозиди, похідні саліцилової кислоти, гідроксикоричні кислоти та флавоноїди. [2, 3, 4, 5].

Наразі в Україні інтенсивно створюють спеціальні енергетичні плантації швидкозростаючих високопродуктивних форм верби. Найчастіше використовують сорти та гібриди верби прутувидної вітчизняної та шведської селекції. [6]. Глобальні програми розведення верби дозволили створити широкий спектр комерційних генотипів, які мають необхідні властивості для легкості посадки та збору врожаю. Такі культивари мають додаткову перевагу – підвищені рівні біологічно активних сполук, зокрема саліцину, що міститься у корі, і які можна буде використовувати в медицині та ветеринарії після проведення відповідних досліджень [7, 8].

У наукових публікаціях останнім часом висвітлюється багато наукових досліджень щодо визначення хімічного складу рослин родини *Salicaceae* Mirb. [9, 10, 11, 12]. Загалом у роді *Salix* L. за даними огляду науковців з Німеччини, Єгипту та Марокко було охарактеризовано 322 вторинних метаболіти, включаючи 94 флавоноїди (флавоноли, флаволи, флаванони, ізофлаволи, флаван-3-оли (катехіни та проціанідини), халкони, дигідрофлаванони, антоціани, дигідрофлавоноли), фенольні глікозиди (76), органічні кислоти (28), а також нефенольні глікозиди (17), стерини та терпени (17), прості фенольні сполуки (13), лігнани (7), леткі речовини та жирні кислоти (69) [13]. Під час скринінгу 86 видів *Salix* L., що містяться в Національній колекції верби Великобританії, вчені Кларіс Нолето-Діас, Джейн Л. Уорд, Еліс Беллізай, Шарлотта Ломакс, Майкл Х. Біл виявили, виділили та повністю охарактеризували новий природний саліциноїд – саліцин-7-сульфат. [14]. Михайло Віктор Куртасу, Наталя П. Норсков, вчені Орхуського

університету Данії, дослідили кількісний розподіл флаван-3-олів, проціанідинів, флавонолів, флаванону та саліцилової кислоти в п'яти сортах органічних *Salix* spp. (*Salix daphnoides* Vill., *Salix fragilis* L., *Salix viminalis* L., *Salix dasyclados* Wimm., *Salix dasyclados* x *viminalis*) методом LC-MS/MS [15]. Екстракти *Salix* L. та деякі його компоненти виявляють виражені антиоксидантні, протизапальні, антипроліферативні та антимікробні властивості, що підтверджує традиційне використання екстрактів верби в традиційній медицині. Крім того вони продемонстрували значні успіхи щодо придушення запалення як у профілактиці та лікуванні раку, так і в терапії інших хронічних захворювань [16, 17]. Група вчених з Тайваню у 2023 році на основі систематичного огляду та проведеного мета-аналізу використання кори верби (*Salix* spp.) для лікування болю у пацієнтів з артритом та побічних ефектів оцінила знеболювальний ефект, фізичне полегшення та безпечність кори верби [18]. Можливо, через успіх аспірину потенціал для відкриття нових фармакологічно активних сполук у *Salicaceae* Mirb. недостатньо досліджений. Хоча нещодавно було висловлено припущення, що біологічна активність рослинних екстрактів верби не можна пояснити лише вмістом саліцину [19]. Сучасні дослідження науковців Німеччини *in vitro* свідчать про значну протизапальну активність водного екстракту кори верби STW 33-1 та його водорозчинної фракції у порівнянні з добре відомими нестероїдними протизапальними препаратами, такими як аспірин і диклофенак. Були запропоновані різні механізми дії протизапального ефекту екстракту кори верби. [20].

Аналіз даних сучасних інформаційних джерел свідчить, що рослини роду *Salix* L. широко використовують у різних сферах життєдіяльності. Китайськи вчені за допомогою експериментів з моделювання гідропоніки дослідили потенціал використання *Salix matsudana* Koidz. у фіторе mediaції забруднених стічних вод [21]. Єгипетські вчені показали в своїх роботах доцільність добавки екстракту листя верби на рівні 450 мг/кг до раціону домашньої птиці як доступну альтернативу стимуляторам росту, антибіотикам [22, 23].

Однак з аналізу доступних наукових джерел очевидно, що дані про фармакогностичні дослідження сировини «енергетичної верби» суттєво обмежені.

Мета нашої роботи полягала в аналізі складу фенольних сполук витягів верби прутувидної, отриманих з сировини зібраної на енергетичній плантації.

Матеріали та методи. Пагони верби прутувидної (*Salix viminalis* L.) заготовлені на енергетичній плантації у Рівненській області. Верхівки пагонів (довжиною 40-50 см), які включали листя і стебла, відрізали від рослин верби і сушили. Пагони верби були зібрані щонайменше з десяти різних дерев і сформовано комбіновану пробу. Зразки рослинної сировини сушили при кімнатній температурі протягом 10 днів, висушений рослинний матеріал зберігали у добре закритих мішках (паперових, або тканинних) при кімнатній температурі. Дослідження

фенольних сполук проводили у витягах з пагонів верби прутівидної. Екстрагентом для приготування дослідних зразків обрали водно-etanoльні суміші із вмістом етанолу 50%, 70%, 96% та спирту метанолу 80%. Одержання дослідних зразків екстрактів верби проводили методом дробної мацерації, яка відрізняється від класичної мацерації розділенням екстрагента на частини. В ємність завантажували подрібнену висушену сировину з розміром частинок 1–3 мм, співвідношення сировина – екстрагент 1:10, заливали відповідним екстрагентом до повного покриття сировини (до "дзеркала" товщиною 10–20 мм). Настоявали при кімнатній температурі 24 години при періодичному струшуванні. Через добу витяг зливали повністю, а сировину знову заливали свіжим екстрагентом до "дзеркала" і після настоювання протягом 2 годин одержували другий злив. Аналогічно одержували третій злив через 2 години. Усі отримані витяги об'єднували і для очищення відстоювали при температурі не вище 10°C впродовж 48 год з метою усунення баластних речовин. Екстракти перед ВЕРХ аналізом фільтрували з

використанням шприцевого фільтра Supelco Iso-Disc Filters PTFE 25-4 (25mm x 0,45 µm).

Дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) проводили на хроматографі рідинному Shimadzu HPLC-system обладнаному діодноматричним детектором в таких умовах:

колонка Phenomenex Luna C18(2), розміром 250 мм x 4,6 мм, розмір часток 5 мкм;

температура колонки – 35 °C;

довжина хвилі детектування – 330 нм (для гідроксикорчних кислот, глікозидів флавоноїдів), 370 нм (для агліконів флавоноїдів), 280 нм (для дубильних речовин), 340 нм (кумарини);

швидкість потоку рухомої фази – 1 мл/хв;

об'єм проби, що вводився – 5 мкл;

Рухома фаза:

Елюент А: 0.1 % розчин трифтороцтової кислоти у воді;

Елюент Б: 0.1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі.

Градентне елюювання проводили шляхом змішування рухомих фаз А і Б за методикою О. Голембіовської [24] (таблиця 1).

Таблиця 1. Градентний режим хроматографування

Час хроматографування (хв)	Рухома фаза А (об. %)	Рухома фаза Б (об. %)
0–5	95	5
5–35	95 → 75	5 → 25
35–40	75	25
40–60	75 → 50	25 → 50
60–65	50 → 20	50 → 80
65–70	20	80
70–85	95	5

Ідентифікацію компонентів в дослідних екстрактах проводили шляхом порівняння часу утримування та за

відповідністю спектральних характеристик досліджуваних речовин стандартним зразкам (табл.2).

Таблиця 2. Результати ідентифікації компонентів за часом утримування та відповідністю УФ-спектрів речовинам-стандартам

Сполука	Час утр., хв	λ_{max} , нм
Рутин	30.9-31.0	256, плече 265, 353
Гіперозид	31.8-32.4	255, плече 265, 354
Астрагалін (3-О-глюкозид кемпферола)	34.5	265, 350
Кверцитрин	35.5-35.9	255, плече 265, 348
Апігенін-7-глюкозид	36.0-36.4	266, 337
Акацетин-7-глюкозид	45.5	267, 338
Лютеолін	47.0	254, плече 265, 367
Кверцетин	46.6-47.2	256, 370
Апігенін	52.3-52.4	266, 337
Кемпферол	53.0-53.2	265, 366
Ізокверцитрин	54.0	254, 368
Ізорамнетин	54.5	368

Сполука	Час утр., хв	$\lambda_{\max}$, нм
Галова кислота	6.8	266
Неохлорогенова кислота	14.8-15.0	216, 235, плече 290, 325
Хлорогенова кислота	20.0-20.4	216, 235, плече 290, 325
п-Кумарова кислота	21.0-21.2	216, 235, плече 290, 327
Кофейна кислота	21.8-22.0	216, 235, плече 290, 323
Елагова кислота	30.8-31.0	253, 367
Ферулова кислота	31.4-31.6	217, 234, плече 290, 322
3,5-дикафеоліхінна кислота	35.0	216, 235, плече 290, 330
4,5-дикафеоліхінна кислота	37.0	216, 235, плече 290, 330
Розмаринова кислота	37.8-38.2	Плече 285, 330
Умбеліферон	29.4-30.1	232
Скополетин	30.0-30.9	229, плече 296, 344
Катехін	19.4	213, 267, 337
Похідні кверцетину	-	254-255, плече 265, 354 (моноглікозиди) 254-255, плече 265, 348 (диглікозиди) 254-255, плече 265, 344 (триглікозиди) 254-255, плече 265, 346 – 6-глікозиди 254-255, плече 265, 336 – 4-глікозиди
Похідні кемпферолу	-	265, 348 (моноглікозиди) 265, 341 (диглікозиди) 267, 344 – 5-глікозиди 265, 319, 338 (триглікозиди)
Похідні лютеоліну		254, 350 (моноглікозиди) 268, 342 (диглікозиди)
Похідні апігеніну		267, 337 (моноглікозиди)

Під час аналізу фенольних сполук використовували стандарти виробництва «Sigma-Aldrich» з такими спектральними характеристиками рис 1.

Розрахунки проводили за формулою, %:

$$X, \% = \frac{A_{pr} \times m_{st} \times V_{pr} \times P \times 100}{A_{st} \times V_{st} \times m_{pr} \times 100}$$

A_{pr} – площа піку речовини на хроматограмі досліджуваного розчину;

A_{st} – площа піку речовини на хроматограмі стандартного розчину;

m_{st} – маса стандартного зразка речовини в стандартному розчині, мг;

m_t – маса препарату, мг;

V_{pr} – розведення досліджуваного розчину, мл;

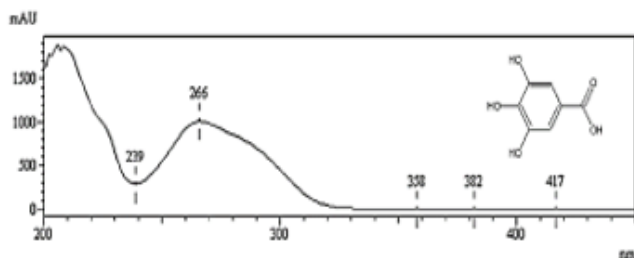
V_{st} – розведення стандартного розчину, мл;

P – активність стандарту, %

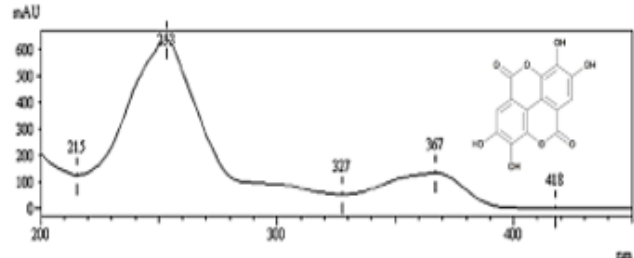
Хроматограми, одержані при визначенні вмісту речовини фенольної природи в витягах з пагонів верби прутівидної, наведені на рис. .2-5.

Результати та обговорення. Вивчення фенольних сполук верби прутівидної витягів було проведено методом ВЕРХ. Речовини ідентифікували за часом утримування у порівнянні зі стандартними зразками. У досліджуваних витягах достовірно ідентифіковано по 12 фенольних сполук (рис.2-5, таблиця 3). Як відомо, від обраного екстрагенту залежить максимальне вилучення фенольних сполук з рослинної сировини. При одержанні екстрактів у фармацевтичній промисловості широко використовують етанол у різних концентраціях. Як екстрагент суміші етанолу з водою мають широкий діапазон вилучення біологічно активних речовин фенольної природи. Екстракційна здатність сумішей етанолу залежить від його концентрації. Окрім того, при високих концентраціях етанолу менше проходять гідролітичні процеси та відбувається інактивація ферментів, що дозволяє зберегти оригінальний склад фенольних сполук лікарської рослинної сировини.

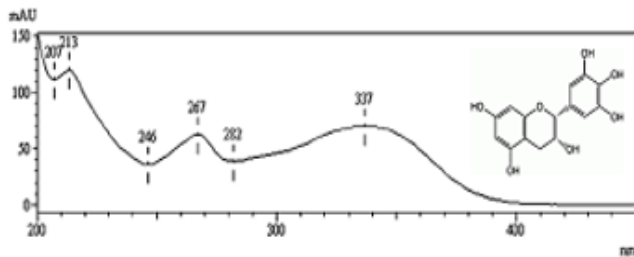
гало́ва кислота́



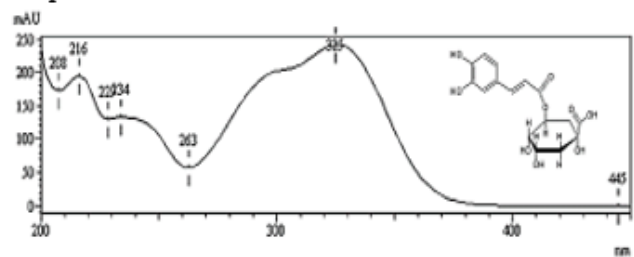
ела́гова кислота́



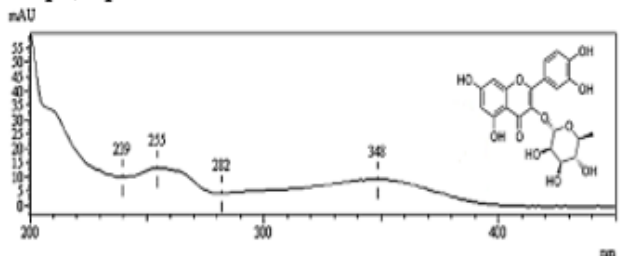
катехі́н



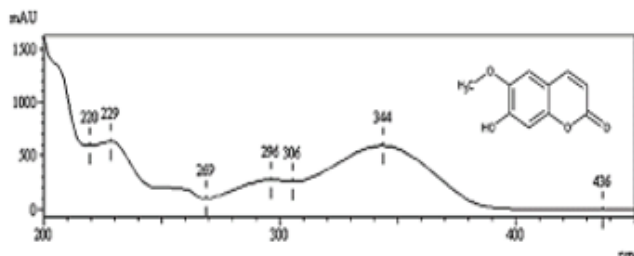
хло́рогенова кислота́



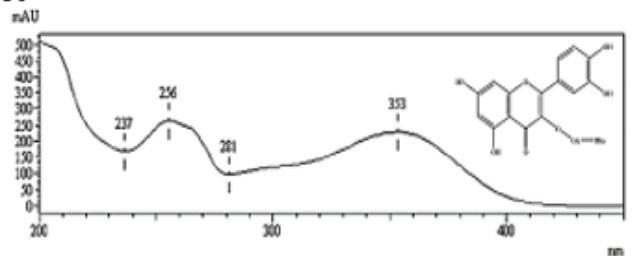
кве́рцетрин



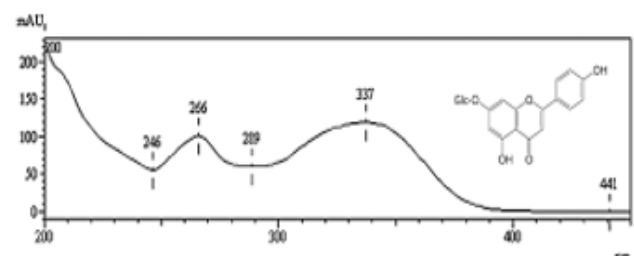
скопо́летин



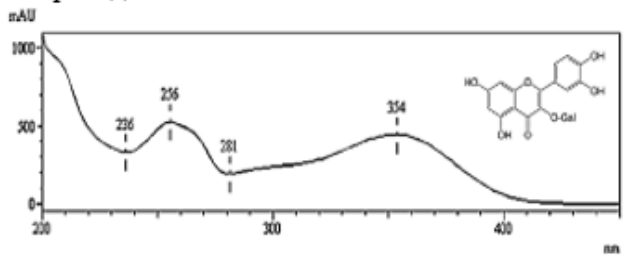
рути́н



апе́гінін-7-глюко́зид



гіпе́розид



кофе́йна кислота́

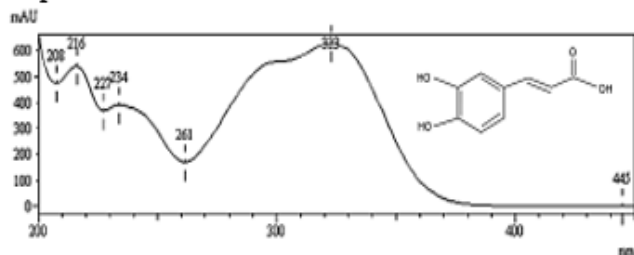


Рис.1 Типові спектральні властивості фенольних сполук, які присутні у верби прутувидної витягах.

Витяги одержано етанолом в концентрації 50%, 70 %, 96%. Експериментальні дослідження показали, що концентрація поліфенолів зазвичай вища в метанольних

екстрактах порівняно з етанольними, тому ми також використали 80% метанол як екстрагент для дослідження фенольного складу сировини верби. [25].

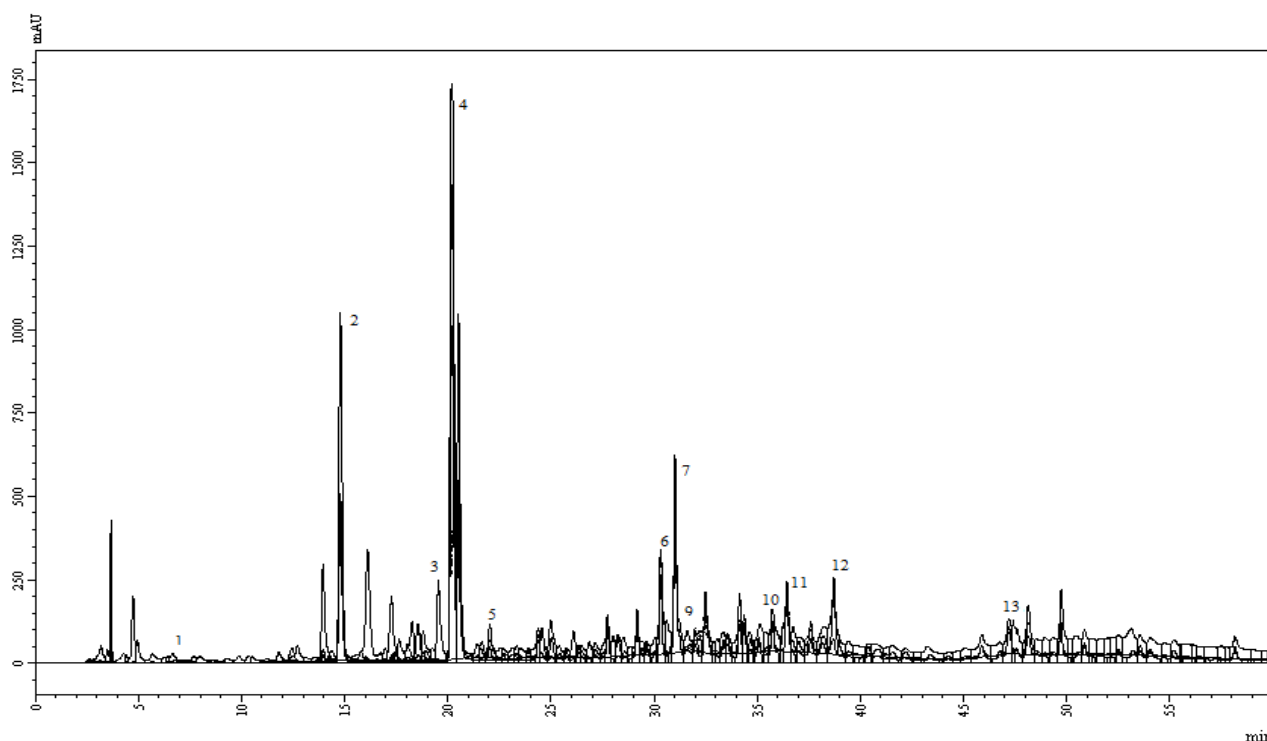


Рисунок 2. ВЕРХ-хроматограма фенольних сполук верби прутовидної витягу (екстракція 50% етанолом): 1 - галова кислота, 2 - неохлорогенова кислота, 3 - катехін, 4 - хлорогенова кислота, 5 – кофейна кислота, 6 – скополетин, 7 – рутин, 8 – елагова кислота, 9 – гіперозид, 10 – кверцитрин, 11 – апегінін-7-глюкозид, 12 – похідні саліцилової кислоти, 13 – кверцетин.

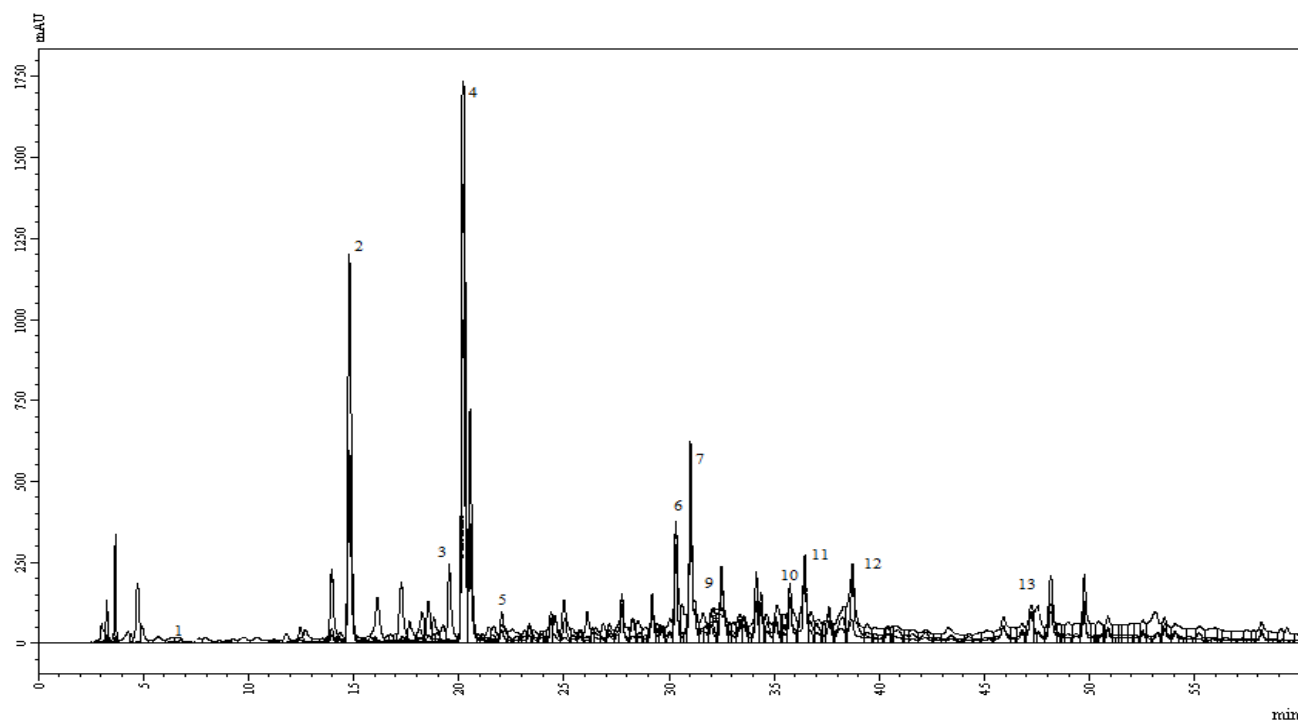


Рисунок 3. ВЕРХ-хроматограма фенольних сполук верби прутовидної витягу (екстракція 70% етанолом): 1 - галова кислота, 2 - неохлорогенова кислота, 3 - катехін, 4 - хлорогенова кислота, 5 – кофейна кислота, 6 – скополетин, 7 – рутин, 8 – елагова кислота, 9 – гіперозид, 10 – кверцитрин, 11 – апегінін-7-глюкозид, 12 – похідні саліцилової кислоти, 13 – кверцетин.

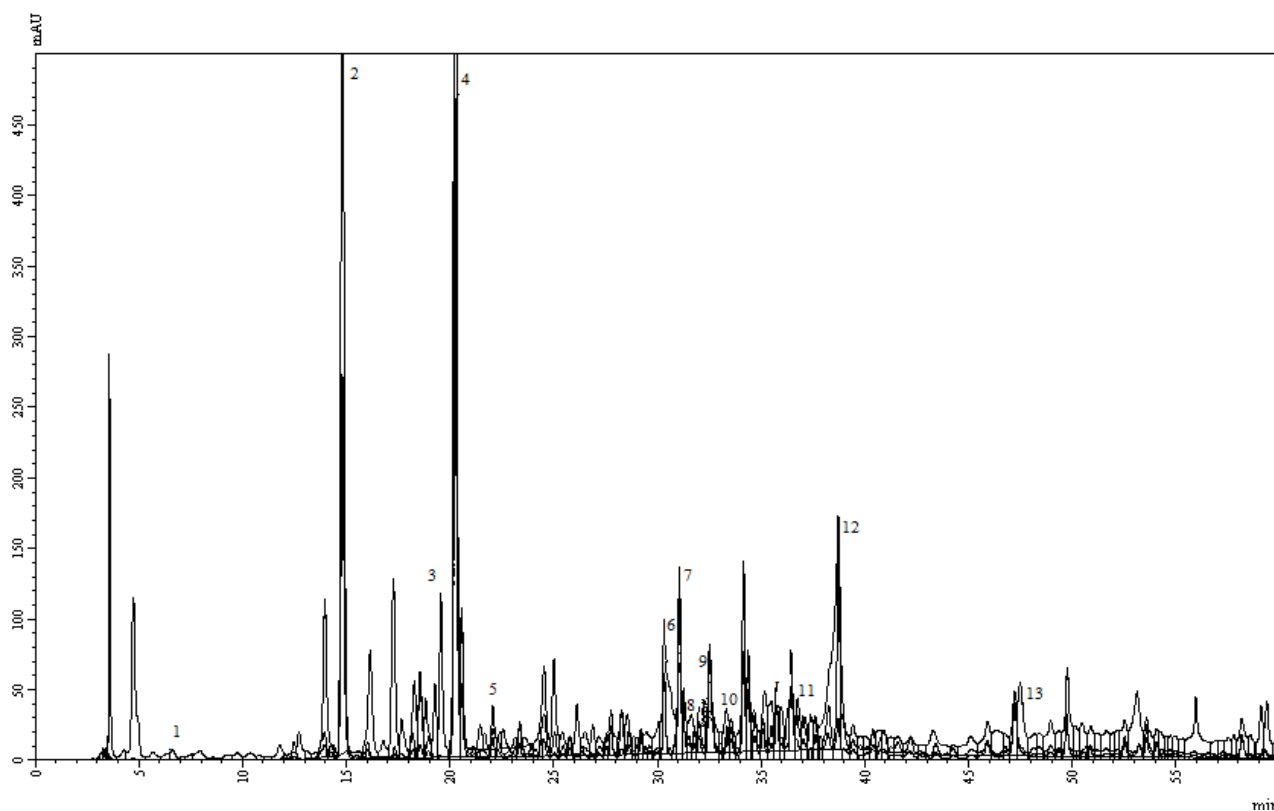


Рисунок 4. ВЕРХ-хроматограма фенольних сполук верби прутовидної витягу (екстракція 96% етанолом): 1 - галова кислота, 2 - неохлорогенова кислота, 3 - катехін, 4 - хлорогенова кислота, 5 – кофейна кислота, 6 – скополетин, 7 – рутин, 8 – елагова кислота, 9 – гіперозид, 10 – кверцитрин, 11 – апегінін-7-глюкозид, 12 – похідні саліцилової кислоти, 13 – кверцетин.

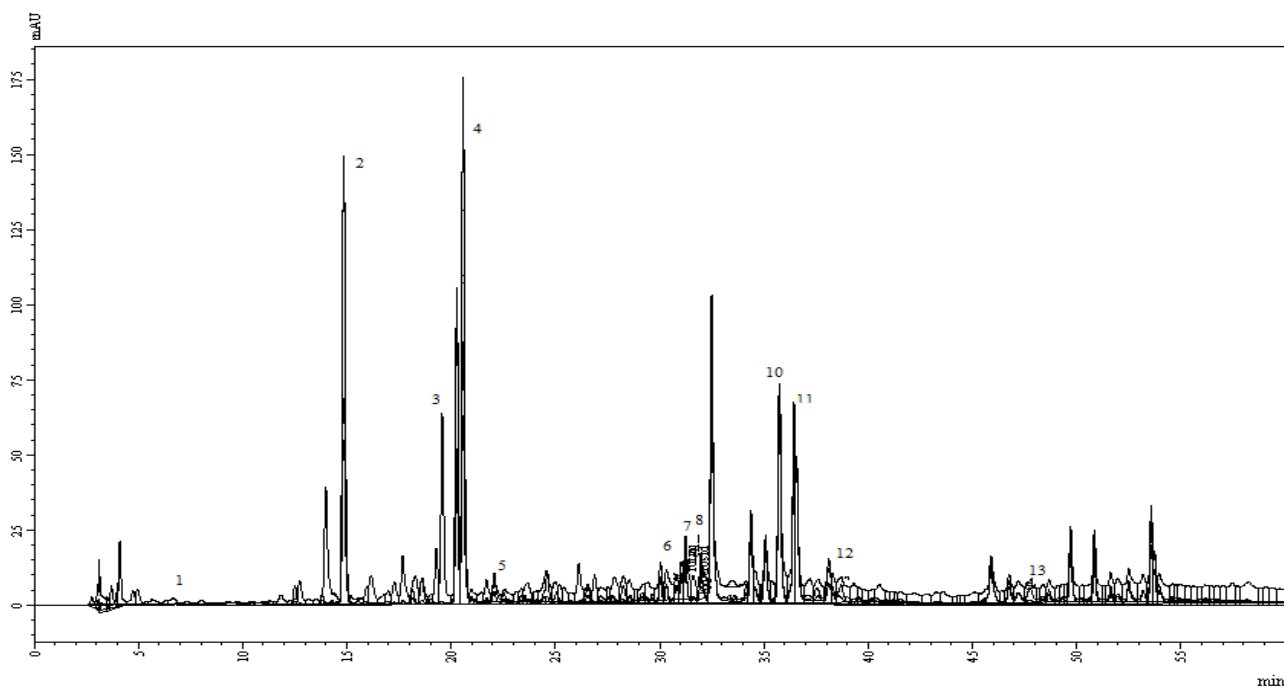


Рисунок 5. ВЕРХ-хроматограма фенольних сполук верби прутовидної витягу (екстракція 80% метанолом): 1 - галова кислота, 2 - неохлорогенова кислота, 3 - катехін, 4 - хлорогенова кислота, 5 – кофейна кислота, 6 – скополетин, 7 – рутин, 8 – елагова кислота, 9 – гіперозид, 10 – кверцитрин, 11 – апегінін-7-глюкозид, 12 – похідні саліцилової кислоти, 13 – кверцетин.

Фенольні сполуки екстрактів верби прутувидної пагонів.

Сполука	Час утр., хв.	Вміст у екстракті, %			
		50% етанол	70% етанол	96% етанол	метанол
Галова кислота	6.8	0.036	0.036	0.010	0.003
Неохлорогенова кислота	14.8-15.0	0.758	0.864	0.573	0.041
Катехін	19.4	0.254	0.138	0.061	0.029
Хлорогенова кислота	20.0-20.4	1.519	1.551	0.608	0.065
Кофейна кислота	21.8-22.0	0.049	0.063	0.016	0.005
Скополетин	30.0-30.9	0.087	0.125	0.021	0.002
Рутин	30.9-31.0	0.639	0.799	0.143	0.012
Елагова кислота	30.8-31.0	-	-	0.036	0.017
Гіперозид	31.8-32.4	0.244	0.539	0.217	0.019
Кверцитрин	35.5-35.9	0.239	0.585	0.101	0.199
Апегінін-7-глюкозид	36.0-36.4	0.366	0.552	0.079	0.077
Кверцетин	46.6-47.2	0.071	0.139	0.051	0.005

Примітка «-» не визначено

У таблиці наведені середні значення кількісного вмісту фенольних сполук.

Разом в витягах верби прутувидної виявлено не менш 49 речовин фенольної природи, ідентифіковано та кількісно визначено по 12 речовин. Окрім достовірно ідентифікованих фенольних сполук також встановлено за характерними УФ-спектрами наявність похідних хлорогенової кислоти, кверцетину, апігеніну та саліцилової кислоти. Домінантною сполукою серед флавоноїдів для досліджуваних етанольних витягів є рутин, серед гідроксикоричних кислот – хлорогенова кислота. Елагова кислота присутня лише в витягах, отриманих з використанням метанолу та 96% етанолу. Всі ідентифіковані методом ВЕРХ в витягах верби прутувидної сполуки не є новими, отримані дані узгоджуються з попередніми дослідженнями фенольних сполук рослин роду Верба, які наведені у наукових працях огляду літератури.

Висновки

1. Методом ВЕРХ було досліджено хімічний склад верби прутувидної витягів (екстрагенти 50%, 70%, 96% етанол та 80% метанол), ідентифіковано та кількісно визначено по 12 фенольних сполук: флавоноїди катехін, апігенін-7-глюкозид, кверцетин, рутин, гіперозид, кверцитрин, фенолкарбонові хлорогенову, неохлорогенову та кофейну кислоти, галову та елагову кислоти, кумарин скополетин.

2. Сполуками-маркерами для подальшої стандартизації верби прутувидної пагонів та фітопрепаратів на їхній основі можуть бути рутин та хлорогенова кислота.

3. Сировина «енергетичної верби» є перспективою рослинною сировиною джерелом біоактивних сполук для фармацевтичних цілей та потребує подальших досліджень.

Перспективи подальших досліджень. Отримані експериментальні дані сприятимуть оцінці можливості розширення сировинної бази рослин родини *Salicaceae* Мірб. за рахунок культивованих сортів «енергетичної верби».

Фінансування проведених досліджень за рахунок фізичних осіб.

Конфлікт інтересів: відсутній

Подяки

Автори хотіли б подякувати Людмилі Яківні Лукашук заступнику директора з наукової роботи Інституту сільськогосподарства Західного Полісся Національної академії аграрних наук України за сприяння в наданні сировини верби, яка необхідна для проведення цього дослідження.

Analysis of phenolic compounds of willow extracts by HPLC method

Nataliia Borodina, Olena HOLEMBIOVSKA, Nataliia FIZOR

In Ukraine, special energy plantations of fast-growing, highly productive willow varieties are being actively established. Most often, domestic and Swedish-selected varieties and hybrids of rod-shaped willow are used. An analysis of available scientific sources reveals that data on the pharmacognostic studies of 'energy willow' raw materials remain significantly limited. **The aim** of our work is to analyze the composition of phenolic compounds of willow extracts obtained from raw materials collected on an energy plantation. **Materials and methods.** Willow shoots were harvested from an energy plantation in the Rivne region. The samples were analyzed by HPLC using a Shimadzu HPLC system under the following conditions: a Phenomenex Luna C18(2) column (250 × 4.6 mm, particle size – 5 μm); column temperature – 35 °C; detection wavelengths – 330 nm (for hydroxycinnamic acids and flavonoid glycosides), 370 nm (for flavonoid aglycones), 280 nm (for tannins), and 340 nm (for coumarins); mobile phase flow rate – 1 ml/min; injection volume – 5 μl. The mobile phase consisted of eluent A (0.1% trifluoroacetic acid solution in water) and eluent B (0.1% trifluoroacetic acid solution in acetonitrile) in various ratios. Component identification was performed based on retention times and the compliance of UV spectra with reference substances.

Results. The chemical composition of willow bark extracts (50%, 70%, 96% ethanol and 80% methanol) was investigated by HPLC, and 12 phenolic compounds were

identified and quantified: flavonoids catechin, apigenin-7-glucoside, quercetin, rutin, hyperoside, quercitrin, phenolic acids chlorogenic, neochlorogenic and caffeic acids, gallic and ellagic acids, coumarin scopoletin. The raw material of "energy willow" is a promising plant raw material as a source of bioactive compounds for pharmaceutical purposes and requires further research.

Key words: *Salix viminalis* L. cormus, high performance liquid chromatography (HPLC), compounds of phenolic nature

References

1. The State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 volumes / State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines. - 2nd edition. - Kharkiv: State Enterprise 'Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines,' 2014; Vol. 3. 263-265, 732 p. ISBN 978-966-97390-0-1. In Ukraine.
2. Paul Baker, Adam Charlton, Chris Johnston, James J. Leahy, Kevin Lindegaard, Italo Pisano, John Prendergast, Dave Preskett, Campbell Skinner, A review of Willow (*Salix* spp.) as an integrated biorefinery feedstock, Industrial Crops and Products, Volume 189, 2022; 115823, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115823>
3. Borodina N.V. Pharmacognostic study of willow plants and creation of medicines based on them. Abstract of the dissertation of the Doctor of Pharmaceutical Sciences: 15.00.02. Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. Kharkiv. 2021; 42 https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/27573/1/a_vtoreferat-borodina-n.v..pdf.
4. Mgbeahuruik EE, Salih E, Prévost-Monteiro S, Sipari N, Väre H, Julkunen-Tiitto R, Fyhrqvist P. Polyphenol Analysis and Antibacterial Potentials of Twig Extracts of *Salix aurita*, *S. pyrolifolia*, and *S. caprea* Growing Naturally in Finland. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(22):11978. <https://doi.org/10.3390/ijms252211978>
5. Jang, Y.S.; Kang, D.-M.; Ko, Y.-J.; Ra, M.-J.; Jung, S.-M.; Ahn, M.-J.; Lee, S.; Kim, K.H. Discovery of Isograndidentatin D, a Novel Phenolic Glycoside, and Anti-Helicobacter Pylori Phenolics from *Salix koreensis* Twigs. Plants 2024; 13, 3603. <https://doi.org/10.3390/plants13243603>
6. Elin Anander, Pål Börjesson, Lovisa Björnsson, Kristina Blennow, Farmers' willingness to introduce short-rotation tree plantations on agricultural land: A case study in southern Sweden, Biomass and Bioenergy, Volume 191, 2024, 107424, ISSN 0961-9534, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107424>.
7. Santucci S, Eisenbies M, Volk T. Yield and Survival of 19 Cultivars of Willow (*Salix* spp.) Biomass Crops over Eight Rotations. Forests. 2024; 15(11):2041. <https://doi.org/10.3390/f15112041>
8. Zalesny Jr RS, Berndes G, Dimitriou I, et al. Positive water linkages of producing short rotation poplars and willows for bioenergy and phytotechnologies. WIREs Energy Environ. 2019; e345. <https://doi.org/10.1002/wene.345>
9. Amit Choudhary, Sunita Dudi, Minu Yadav, Chandan Singh, Manoj Kumar adalkha. A Promising drug review on ethanomedicinal plant of *Salix tetrasperma* Roxb. PIJAR 2024; volume-9 issue-4. DOI: <https://doi.org/10.47071/pijar.2024.v09i04.01>
10. Borodina N., Kovalyov V., Koshovyi O. Biologically active substances of *Salix purpurea* f. *gracilis* (Gren. & Godr.) C. K. Schneid. (Salicaceae). Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science» 2019; № 3 (19): 42–48. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2019.173459>
11. Borodina N., Raal A., Kovalyov V., Koshovyi O., Ilina T. Macro- and Microelements in the Branches of some *Salix* Genus Species in the Flora of Ukraine. International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences. 2020; Vol. 9, № 3: 71–80. ISSN : 2277-3657 CODEN(USA) : IJPRPM
12. Borodina N., Raal A., Kovalyov V., Osolodchenko T., Koshovyi O., Hoai Thi Nguyen, Komissarenko A. Phytochemical Research and Antimicrobial Properties of Lipophylic Extracts of Some Species of *Salix* L. Genus from Ukraine. The Open Agriculture Journal. 2020; Volume 14: 136-144. <https://doi.org/10.2174/1874331502014010136>
13. Tawfeek N, Mahmoud MF, Hamdan DI, Sobeh M, Farrag N, Wink M, El-Shazly AM. Phytochemistry, Pharmacology and Medicinal Uses of Plants of the Genus *Salix*: An Updated Review. Front Pharmacol. 2021; 12:593856. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.593856>
14. Clarice Noleto-Dias, Jane L. Ward, Alice Bellisai, Charlotte Lomax, Michael H. Beale, Salicin-7-sulfate: A new salicinoid from willow and implications for herbal medicine, Fitoterapia, 2018; Volume 127: 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.009>
15. Mihai Victor Curtasu, Natalja P. Nørskov, Quantitative distribution of flavan-3-ols, procyanidins, flavonols, flavanone and salicylic acid in five varieties of organic winter dormant *Salix* spp. by LC-MS/MS, Heliyon, Volume 10, Issue 3, 2024; e25129, ISSN 2405-8440, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25129>
16. Emilia I. Gligorić, Ružica Igić, Ljiljana Đ. Suvajdžić, Branislava D. Teofilović, Nevena N. Grujić-Letić, *Salix eleagnos* Scop. – a novel source of antioxidant and anti-inflammatory compounds: Biochemical screening and in silico approaches, South African Journal of Botany, Volume 128, 2020; 339-348, ISSN 0254-6299. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.018>.
17. Mgbeahuruik EE, Salih E, Prévost-Monteiro S, Sipari N, Väre H, Julkunen-Tiitto R, Fyhrqvist P. Polyphenol Analysis and Antibacterial Potentials of Twig Extracts of *Salix aurita*, *S. pyrolifolia*, and *S. caprea* Growing Naturally in Finland. International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(22):11978. <https://doi.org/10.3390/ijms252211978>
18. Lin, C.-R.; Tsai, S.H.L.; Wang, C.; Lee, C.-L.; Hung, S.-W.; Ting, Y.-T.; Hung, Y.C. Willow Bark (*Salix* spp.)

- Used for Pain Relief in Arthritis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Life* 2023, 13, 2058.
<https://doi.org/10.3390/life13102058>
19. Rashmi Saxena Pal, Yogendra Pal, Motamarri Venkata Naga Lalitha Chaitanya, Avijit Mazumder, Navneet Khurana and Prabin Kumar Tharu. Discerning the Multi-dimensional Role of Salicin: Bioactive Glycoside Beyond Analgesic: Different Perspectives Volume 19, Issue 7, 2024; 757 – 764. DOI: 10.2174/0115748855272391231114042540
20. Bonaterra G.A., Heinrich E.U., Kelber O., Weiser D., Metz J., Kinscherf R., Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages, *Phytomedicine*, Volume 17, Issue 14, 2010; 1106-1113, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.03.022>
21. Xie H, Fu Y, Fu D, Lin D, Zhou H, Fu G, Li H, Liu J, Zheng X, Li K. The Physiological Response of *Salix matsudana* for Water Pollution by 2,4-Dinitrophenol. *Toxics*. 2024;12(10):763.
<https://doi.org/10.3390/toxics12100763>
22. Saracila, M., Panaite, T. D., Predescu, N. C., Untea, A. E., & Vlaicu, P. A. Effect of Dietary Salicin Standardized Extract from *Salix alba* Bark on Oxidative Stress Biomarkers and Intestinal Microflora of Broiler Chickens Exposed to Heat Stress. *Agriculture*, 2023; 13(3), 698. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030698>
23. Farag SA, El-Keredy A, Abd El Gawad SA, Swelum AA, Tellez-Isaias G, Abouzeid AE. Impacts of willow (*Salix babylonica* L.) leaf extract on growth, cecal microbial population, and blood biochemical parameters of broilers. *Poult Sci*. 2024; 103(3):103386.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103386>
24. Golembiovskaja O. Simultaneous determination of flavonoids and phenolic acids in different parts of *Prunella vulgaris* L. by HPLC-DAD. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. ISSN: 2051-7858. 2014;29(1):1248-55
25. Shanaida M, Palamar O, HOLEMBIOVSKA O. Chromatographic Profile of Polyphenols in the *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze Herb: Evaluation of Optimal Extraction Efficiency. *Biomed Pharmacol J* 2024;17(1). DOI : <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2834>