التشخيص النوعي والكمي لبعض المركبات الثانوية في قشرة أشجار الصفصاف الأبيض (*Salix alba* L.) النامية طبيعياً في دهوك باستخدام تقنية HPLC

طلال قاسم التكاي[1] أياد جاجان الداودي[2] وليد عبودي قصير[1]

مدرس أستاذ أستاذ

[1] قسم الغابات / كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل/ العراق

[2] قسم علوم الحياة/كلية التربية بنات/ جامعة الموصل / العراق

E-mail: talaltakay@yahoo.com

المستخلص:

استخدمت طريقة الاستخلاص التعاقبي باستعمال جهاز الاستخلاص المستمر بواسطة مذيبين مختلفي القطبية (الايثرالبترولي كمذيب غير قطبي والايثانول 95 % كمذيب قطبي) ، واستعمل جهاز المبخر الدوار للحصول على المستخلص الخام لكل مذيب وأجريت لهما عملية التحلل الحامضي ثم استعملت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) لفصل وتشخيص بعض المركبات الثانوية في قشرة أشجار الصفصاف الأبيض *Salix alba* L. النامية طبيعيا في مدينة دهوك ، وتقدير النسب المئوية لتواجدها في المستخلص الخام لكلا المذيبين ، لقد تباين المذيبان في نوعية المركبات المفصولة وعددها ونسبها المئوية ، وقد شخصت الأحماض الآتية : حامض الستريك وحامض السينامك في المستخلص الخام لكلا المذيبين واستايل حامض السالسليك في المستخلص الخام للايثر البترولي فقط ، وقد تم عزل استايل حامض السالسليك (الأسبرين) لأول مرة من قشرة أشجار الصفصاف الأبيض .

الكلمات المفتاحية: الصفصاف الأبيض ، حامض الستريك ، الأسبرين ، حامض السينامك ، HPLC .

Qualitative and quantitive identification of some secondary compounds in the bark of (*Salix alba* l.) Naturally growing in dohuk by using HPLC .

Talal K. Al-Takay[1] Ayad C. Al-Daody[2] Walid A. Kasir[1]

Lecturer Professor Professor

[1]Forestry Department/ College of Agriculture and Forestry/ University of Mosul.

[2] Biology Department/ Education College for Girls/ University of Mosul.

Abstract:

Separation of some secondary compounds in the bark of *Salix alba* L. trees was carried out. Sequence extraction with two different polar solvents (Petroleum ether as a non polar solvent and Ethanol 95 % polar solvent) was done using Soxhlet apparatus in order to prepare the crude extract. High performance liquid chromatography (HPLC) was used for chromatographic separation**,** identification and also determination of some secondary compounds and its percentages. The results were showed a remarkable variation in the kind, number, percentage and the peak area (represented the concentration) of each separated compound. Citric acid, Acetylsalicylic acid and

also Cinnamic acid were identified. Acetylsalicylic acid (Aspirin) was isolated for the first time from the bark of *Salix alba* L. trees .

Key words: *Salix alba*, HPLC, Citric acid, Acetylsalicylic acid, Cinnamic acid.

المقدمة

الصفصاف الأبيض .*Salix alba* L شجرة يصل ارتفاعها (11 إلى 25 متر) وهي معمرة ومتساقطة الأوراق ، تزرع بواسطة الأقلام بالقرب من الجداول والسواقي والبرك والبحيرات لأنها تحتاج إلى الكثير من المياه ، تتواجد بشكل طبيعي في شمال العراق ، وتنتمي إلى العائلة الصفصافية Salicaceae ، لقد ورد في الحضارات القديمة إمكانية الحصول على مسحوق أبيض من قشرتها يمكنه إزالة الالتهاب وتخفيف الحمى وقد بينت الأبحاث بان المادة الفعالة المتواجدة فيها هي Salicin الذي يتحول بعد أكسدته إلى حامض السالسليك Salicylic acid وهو من الأحماض الفينولية ، كما يشبه تركيبه الأسبرين Acetyl Salicylic acid إذ يمكن تحضير الأسبرين من أسترة مجموعة الهيدروكسيل الفينولية لحامض السالسليك بواسطة ايون الخلات من انهيدريد الخليك ، وتعرف أسترات وأملاح حامض السالسليك بـ Salicylates ، لذلك يسمى الصفصاف الأبيض بالأسبرين الطبيعي ، يعمل حامض السالسليك في النبات كهرمون نباتي فهو يؤدي دوراً في نمو وتطور النبات إذ يساهم في عملية التركيب الضوئي والتنفس واخذ الايونات والنتح والتزهير [15] ويمكنه إحداث تغيرات نوعيه في تشريح الورقة ، كما يقوم بنقل الإشارات الجينية ويؤدي دور الوسيط في الدفاع عن النبات ضد الإصابات المرضية ويحث على إنتاج البروتينات الدفاعية المضادة كما يساهم في إكساب المناعة النظامية للنبات ، فعند إصابة جزء من النبات فانه يكسب بقية الأجزاء المناعة ضد الإصابة ، ويمكن أن ينتقل تأثيره إلى النباتات المجاورة عن طريق تحوله إلى استر طيار يدعى Methyl Salicylate ، ويستخدم كدواء مضاد للالتهابات [18] ، إذ يصنف كفيتامين S [8] وكمادة معقمة وفي حفظ الأطعمة ، تحوي قشرة الصفصاف على تانينات وفلافينويدات وفينولات كلايكوسيدية ومضاد للالتهاب ومخفف الحمى مثل Salicylate ، إن تركيز التانينات في قشرة الصفصاف الأبيض عالي (8–20%) ، وتحوي القشرة أيضاً على مواد فعالة [8 , 18 , 25] ، يوجد Salicylates في أنواع القوغ أيضا وأنواع أخرى غير الصفصاف الأبيض إذ تكون نسبته عالية (1–10 %) في قشرة *Salix fragilis* و(3– 9 %) في *Salix purpurea* [1 , 39] إذ يمكن لأشجار الصفصاف تصنيعه في قشرتها [16 , 23] ويختلف محتواه ضمن النوع الواحد باختلاف ظروف النمو والعمليات التنموية المختلفة وطرق التحضير[8 , 27] إذ تؤثر فترة الإضاءة ووفرة المواد الغذائية في وجود الأحماض المرتبطة بالسكر [10 , 30] وتؤدي عملية انتخاب الكلونات من أشجار الصفصاف وزراعتها إلى زيادة المركبات الفينولية في القشرة [2 ,30 ,31] ولنوع التربة تأثير مماثل [33] . يوجد البارا هيدروكسي حامض السيناميك في مختلف أجزاء أشجار الغابات لأنه من البوادئ المكونة للكنين ، ويعد الجزء الفليني من القشرة مصدر غني لحامض السيناميك [3] ، وهو من العوائق الفيزيائية ضد آكلات النباتات والجفاف والتأثيرات المتعددة الأخرى ، كما يعمل أيضاً على منع دخول الفطريات (عائق كيميائي) ، إن وجود Cinnamic acid ومشتقاته في النبات يعمل على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية ويمنعها من الدخول إلى الخلية والوصول إلى النواة والتسبب بحصول طفرات

ضارة أو موت الخلية [17] وقد وجد حامض السيناميك في قشرة بعض الأنواع من جنس الصفصاف [22] ، هنالك اهتمام واسع في استعمال حامض الستريك وأحماض كاربوكسيلية أخرى لأنها ذات وظائف متعددة ، إذ تعمل على خلق أواصر عرضية لتحسين قوة المنتجات الورقية وتحسين الخواص الميكانيكية للورق [36 , 40] ، ويؤدي وجود حامض ألستريك في الخشب إلى زيادة مجاميع الهيدروكسيل [20] مما يؤدي إلى زيادة قابلية الخشب على امتصاص ايونات المعادن الثقيلة ، فتعمل على حرمان فطريات العفن البني والأبيض المفسخة للخشب من تكوين معقدات مع هذه المعادن بواسطة حامض الاوكزاليك إذ تعمل تلك المعقدات على تفسيخ الخشب ، يعد حامض ألستريك من الأحماض العضوية القوية [38] ، وقد يؤدي إلى تثبيط إنتاج حامض الاوكزاليك (الذي تنتجه الفطريات) أو يؤدي إلى ترسيبه على شكل بلورات ، ويفيد ذلك في زيادة مناعة الخشب ضد فطريات العفن البني ، إذ وجد [7] أن زيادة إنتاج حامض الاوكزاليك تؤدي إلى انخفاض الـ PH وهو أمر ضروري في المراحل الأولى لنمو فطريات العفن البني المفسخة للخشب ، لقد أبدت قشرة الصفصاف *Salix subserrata* تأثير مضاد للبكتريا والفطريات والاشنات [13] ، وبسبب سرعة نمو أشجار الصفصاف واحتوائها على تركيز عالي من salicylates فقد استعملت كمصدر لتصنيع الأدوية العشبية [2 ,34,32,11] ونظراً لتباين أشجار النوع الواحد في نسب المركبات بتباين الموقع الجغرافي وظروف النمو ضمن كل موقع والعمر والعمليات التنموية والإدارية المطبقة وطرق التحضير ولعدم وجود دراسة سابقة (في العراق) فقد هدف البحث إلى فصل وتشخيص بعض المركبات الثانوية من قشرة ساق أشجار الصفصاف الأبيض النامية طبيعياً بوساطة مذيبان مختلفان بالقطبية وباستعمال تقنية (HPLC) ، وقد تم العمل في مختبرات علوم الأخشاب وعلوم الأغذية في كلية الزراعة والغابات جامعة الموصل .

المواد وطرائق العمل :

أخذت القشرة من ثلاث أشجار بعمر سبع سنوات نامية بشكل طبيعي في مركز مدينة دهوك ، جففت هوائياً ثم طحنت وغربلت واستعملت الدقائق التي مرت من خلال المنخل (30 مش) واستقرت فوق المنخل (50 مش) ، اتبعت طريقة الاستخلاص التتابعي بجهاز الاستخلاص المستمر لأنها من أفضل الطرائق للحصول على أعلى ناتج [27] إذ تمت العملية باستعمال (20 غرام) من مسحوق القشرة و(300 مل) من مذيبين مختلفين في القطبية ، الايثر البترولي (60– 80°م) وهو مذيب غير قطبي والايثانول (95 %) وهو مذيب قطبي ، كل على حده ، واستعمل جهاز المبخر الدوار(بدرجة حرارة 60°م) للحصول على (25 مل) من المستخلص الخام للمذيبات أنفة الذكر، أجريت عملية التحلل الحامضي لفصل المركبات المرتبطة بالسكر [28] ، ثم فصلت المركبات باستخدام تقنية (HPLC) بعد إعداد المحاليل القياسية التي حصل عليها من المخزن الكيميائي لكلية العلوم والتربية والطب البيطري في جامعة الموصل وهي مرخصة من شركة BDH الألمانية وشركة Fluka السويسرية ، وقد حقن (3 مايكروليتر) من كل محلول قياسي في جهاز HPLC (ياباني الصنع من طراز Lc–2010A SHMADZU) وباستعمال عمود الفصل C18 [29] واستخدم الطور الناقل اسيتونيتريل : ماء (20:80) بسرعة جريان (1.3 مل/ دقيقة) وكشف عن الاستجابات الكروماتوغرافية عند طول موجي (280

نانوميتر) ، ونتج عن عملية الفصل رسم منحني لكل محلول من المحاليل القياسية مقروناً بزمن الاحتباس (R_t) الخاص بكل محلول ، اعتمدت قيم زمن الاحتباس للمركبات القياسية لغرض مطابقتها مع قيم الاحتباس للمركبات التي فصلت من المستخلصات ، بعد أن حقنت في جهاز (HPLC) وفصلت المركبات عند ظروف الفصل نفسها لمعرفة محتواها من المركبات .

النتائج والمناقشة :

تباينت المذيبات في نوعية المركبات المفصولة وعددها ونسبها المئوية ومساحة كل منحني والتي تمثل صورة لتركيز المركبات المشخصة (الجدول 1 والأشكال من 2 إلى 5) .

لقد شخصت المركبات الآتية:

1- حامض الستريك . 2- اسيتايل حامض السالسليك (الأسبرين) . 3- حامض السينامك ، وبقى العديد من المركبات مجهول الهوية لعدم توفر المواد القياسية ، علماً أن تشخيص الاسيتايل حامض السالسليك (الأسبرين) في قشرة أشجار الصفصاف الأبيض يسجل للمرة الأولى .

1- حامض الستريك : ظهر في مستخلص الايثر البترولي الخام بنسبة (6.37 %)، كما ظهر في المستخلص الايثانولي الخام بنسبة (88.66 %) وهي نسبة عالية جداً .

2- اسيتايل حامض السالسليك : ظهر في مستخلص الايثر البترولي الخام بنسبة (9.10 %) ولم يظهر في المستخلص الايثانولي الخام .

3- حامض السينامك : ظهر في مستخلص الايثر البترولي الخام بنسبة (17.48 %) ، كما ظهر في المستخلص الايثانولي الخام بنسبة (6.22 %) .

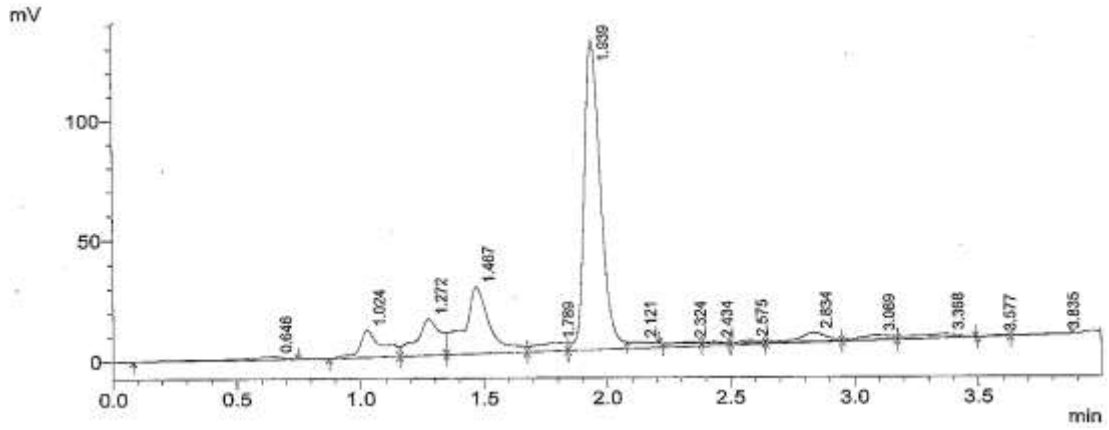
الجدول1: المركبات الثانوية المشخصة في كل من مستخلص الايثر البترولي الخام والمستخلص الايثانولي الخام لقشرة أشجار الصفصاف الأبيض النامية طبيعيا في مدينة دهوك.

المركبات المشخصة	مستخلص الايثر البترولي الخام		المستخلص الايثانولي الخام		$R_{t\ (min.)}$القياسية
	$R_{t\ (min.)}$	(%)	$R_{t\ (min.)}$	(%)	
حامض الستريك	1.024	6.37	0.976	88.66	1.025
استايل حامض الساليسلك	1.272	9.10	*	*	1. 240
حامض السينامك	1.467	17.48	1.467	6.22	1.402

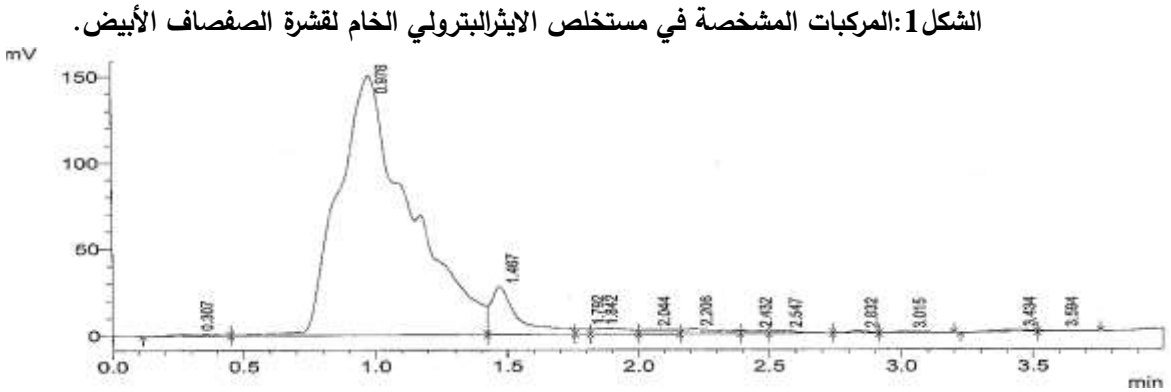
* لم يظهر المركب $R_{t\ (min.)}$ زمن الاحتباس بالدقيقة

يلاحظ أن نسبة حامض الستريك عالية جدا في المستخلص الايثانولي الخام بالمقارنة مع نسبته في مستخلص الايثر البترولي الخام ، وعلى العكس بالنسبة لحامض السينامك ، في حين لم يظهر الاسيتايل حامض السالسليك إلا في مستخلص الايثر البترولي الخام ويعود ذلك إلى التباين في قطبية المذيبات فضلا عن التباين في قطبية المركبات إذ تستخلص المركبات القطبية بوساطة المذيبات القطبية أما المركبات غير القطبية

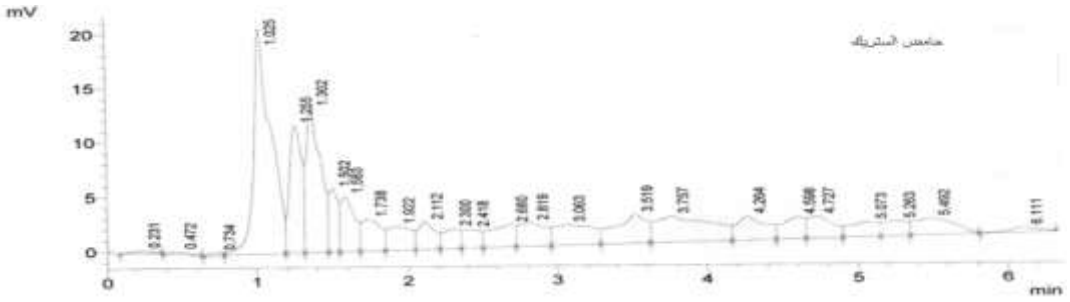
فتستخلص بوساطة المذيبات غير القطبية، قد تؤدي النسبة العالية لحامض ألستريك إلى حماية أشجار الصفصاف الأبيض من الإصابة بالفطريات المفسخة للخشب ، إذ وجت زيادة في المقاومة الحيوية في الأخشاب المعاملة بحامض ألستريك [29] ، فضلاً عن دور كل من الاسيتايل حامض السالسليك وحامض السينامايك في توفير الحماية الكيميائية والفيزيائية ، إذ تؤدي المركبات الثانوية في النبات دوراً مهما في حمايته من الإحياء التي تتغذى علية أو تتسبب في إصابته [12] ويعمل العديد منها كمركبات سامة أو طاردة كما تساهم في توفير الحماية ضد الأضرار غير الحيوية أيضاً [37,35] وقد تعود سرعة نمو أشجار الصفصاف الأبيض إلى وجود هذين الحامضين (الاسيتايل حامض السالسليك وحامض السينامايك) ، إذ يؤدي حامض السالسليك مع الجبرلينات دوراً مهماً في العديد من عمليات النمو والتطور للنبات [21، 25] وقد بين [14] انه يزيد من طول النبات ومساحة الورقة وسرعة النمو والوزن الجاف الكلي (فهو يحسن نمو النبات لأنه يؤدي إلى تحسين تغذيته) وكذلك الحال لدى زيادة نسبة حامض السينامايك [6] ، ولأن مستخلصات قشرة الصفصاف تعمل كمضادات أكسدة لذا يمكن الاستفادة منها في علاج الكثير من الأمراض السرطانية ، أو استعمالها كبديل عن الجرعات العالية للأسبرين لعدم وجود أثار جانبية لها [4, 5 , 28] ولظهور الأسبرين في قشرة أشجار الصفصاف الأبيض نوصي معامل الأدوية ومن له علاقة بهذا الأمر النظر في إمكانية استعمالها لتصنيع الأدوية العشبية .



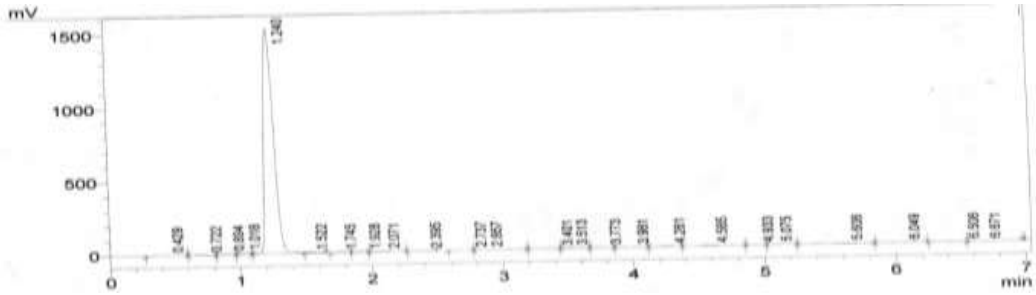
الشكل1:المركبات المشخصة في مستخلص الايثرالبترولي الخام لقشرة الصفصاف الأبيض.



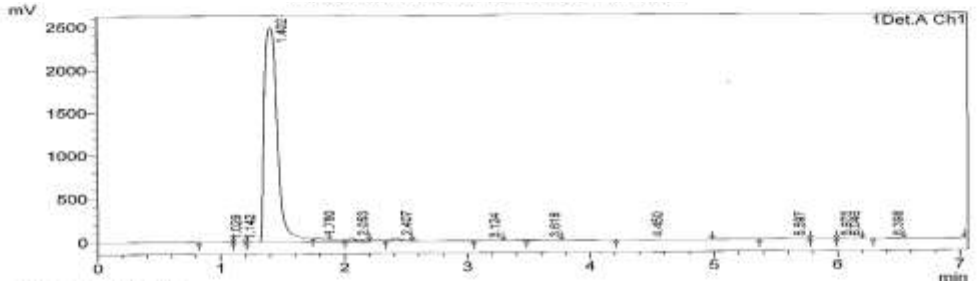
الشكل 2: المركبات المشخصة في المستخلص الايثانولي الخام لقشرة الصفصاف الأبيض.



الشكل 3: المنحنى القياسي لحامض الستريك.



شكل 4:المنحنى القياسي لاسيتايل حامض السالسليك.



الشكل 5: المنحنى القياسي لحامض السينناميك.

المصادر:

1- **Abbasi, K., . (2003)**"Rapid Responses to: Aspirin protects women at risk of pre-eclampsia without causing bleeding". British Medical Journal , 327: 7424, .

2- **Förster N., Ulrichs C., Zander M., Kätzel R., . (2010)** Factors influencing the variability of antioxidative phenolic glycosides in *Salix* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry , 58(14), 8205–8210, .*

3- **Freire CSR, AJD., Silvestre and CP. Neto, . (2002)** "Identification of new hydroxyl fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus". Holzforschung , 56: 143-9, .*

4- **Gawlik-Dziki U., Świeca M., Dziki D., Sugier D., . (2013)** "Improvement of nutraceutical value of broccoli sprouts by natural elicitors." *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus , 12(1), 129–140, .*

5- **Gawlik-Dziki U., Świeca M., Sugier D., .(2012)** "Enhancement of antioxidant abilities and the lipoxygenase and xanthine oxidase inhibitory activity

of broccoli sprouts by biotic elicitors". *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus , 11(1) 13–25, .*

6- **Ghasemzadeh,A. , Jaafar, H. and A. Rahmat, . (2010)** "Elevated Carbon Dioxide Increases Contents of Flavonoids and Phenolic Compounds, and Antioxidant Activities in Malaysian Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Varieties". *Molecules , 15, 7907-7922, .*

7- **Green. F., Larsen, M.J., Winandy, J.E. and T.L. Highley, . (1991)** "Role of oxalic acid in incipient brown-rot decay". *Material und Organismen , 26 (3), 191-213, .*

8- **Grimes P.E., . (2004)** "The safety and efficacy of salicylic acid chemical peels in darker racial-ethnic groups". Dermatologic Surgery , 25 (1):18-22,1999.

9- **Harborne, J.B., . (1973)** . *Phytochemical Methods: Aguide to Modern Technique of Plant Analysis*. 1st ed., Cox and Wyman , London , p 52-73, .

10- **Heiska S., Rousi M., Turtola S., Meier B., Tirkkonen V., Julkunen-Tiitto R., . (2005)**"The effect of genotype and cultivation method on the total salicylate yield of dark-leaved willows (*Salix myrsinifolia*)" . *Planta Med . 71, 1134–1139, .*

11- **Heiska S., Tikkanen O.-P., Rousi M., Julkunen-Tiitto R., (2008)** "Bark salicylates and condensed tannins reduce vole browsing amongst cultivated dark-leaved willows (*Salix myrsinifolia*)" . *Chemoecology 17, 245–253,.*

12- **Heiska S., Tikkanen O-P., Rousi M., Turtola S., Tirkkonen V.,Meier B.,Julkunen-Tiitto R., (2007)** "The susceptibility of herbal willow to *Melampsora* rust and herbivores". *Eur. J. Plant Pathol. , 118, 275–285, .*

13- **Hussain,H., Amira Badawy,A., Elshazly,A., Elsayed,A.,Krohn,K., Riaz,M. and B. Schulz, . (2011)** " Chemical constituents and antimicrobial activity of *Salix subserrata. Re.c*" *Nat. Prod. , 5:2 ,133-137,.*

14- **Jeyakumar, P.; Velu, G.; Rajendran, C.; Amutha, R.; Savery, M.A.J.R.and S. Chidambaram, . (2008)** "Varied responses of blackgram (Vigna munga) to certain foliar applied chemicals and plant growth regulators ". *Legume Research International Journal , 31, 110-113, .*

15- **Jitendra P., Khurana and C. F. Cleland . (1992)** "Role of Salicylic Acid and Benzoic Acid in Flowering of a Photoperiod-Insensitive Strain, Lemna paucicostata LP6'". *Plant Physiology , 100, 1541-1546 .*

16- **Julkunen-Tiitto R., Rousi M., Meier B., Tirkkonen V., Tegelberg R., Heiska S., Turtola S., Paunonen R., . (2005)** "Herbal medicine production , breeding and cultivation of salicylates producing plants". *In: Sustainable use of renewable natural resources – from principles to practices,* Jalkanen A., Nygren P. (eds.). University of Helsinki Department of Forest Ecology Publications, 34

17- Lattanzio,V.and V.T. Lattanzio, . (2006) "Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects *". Phytochemistry : Advances in Research ; 2006, 23-67, .*

18- Mackowiak, P., A, . (2000) "Brief history of antipyretic therapy*". Clinical Infectious Diseases , 31:154-156, .*

19- Majors, R.E., . (2001) *"*New chromatography columns and accessories at the 2001*". Pittsburgh conference* , Part 1. 14(5): 284.301, .

20- McSweeny, Rowell, and Min, . (2006) *"Effect of citric acid modification of aspen wood on sorption of copper ion".* Journal of Natural Fibers , 3(1); 48-58, .

21- Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd NP,and JDG. Jones, . (2008) *"*Dellas control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling*" . Current Biology , 18:650-655,.*

22- Pob L. and O. Olech, . (2010) *"Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus Salix". **Phytochemical Analysis**, Issue:5(Abstracts), .*

23- Pobłocka-Olech L., Krauze-Baranowska M., Głód D., Kawiak A., Łojkowska E., . (2010) "Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*". *Phytochem. Anal. 21, 463–469,.*

24- Roberts W. E., . (2004) "Chemical peeling in ethnic/dark skin*". Dermatologic Therapy, 17(2):196, .*

25- Robert-Seilaniantz, A., Navarro L., Bari R., and JD., Jones, . (2007) *"*Pathological hormone imbalances*" . Current Opinion in Plant Biology , 10:372-379, .*

26- Romero, C. y and M. Vargas, . (2005) *"Extraccion de la ceite de la semilla del neem* (Azadirachta indica)*" . Ciencia. 13:464-474, (Abstract) .*

27- Rumack, Cm; Guggenheim, Ma; Rumack, Bh; Peterson, Rg; Johnson, Ml; and Wr. Braithwaite,. (1981) "Neonatal intracranial hemorrhage and maternal use of aspirin". *Obstetrics and gynecology , 58 (5): 52S-56S,.*

28- Schmid B., Lüdtke R., Selbmann H.K., Schaffner W., Kötter I., Tschirdewahn B., Heide L., Schaffer W., . (2001) "Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis, randomized placebo-controlled, double blind clinical trial". *Phytother Res. , 15, 344–350, .*

29- ŠefcB.,Trajković,J.,Sinković,T..Hasan,M. and H.,Ištok. . (2012) "Compression strength of fir and beech wood modified by citric acid". *Drvna Industrija 63 (1) 45-50 ,.*

30- Sugier D., Sugier P., . (2007) "Evaluation of three *Salix* species growing in natural state as a source of pharmaceutical raw material (*Salicis cortex*)" . Herb*a Polonica journal. 53(3), 319–324, .*

31- Sugier D., Sugier P., . (2007) "Phenolic glycosides content in purple willow bark originated from natural habitats". Herb*a Polonica journal , 53(3), 325–330, .*

32- Sugier D., Sugier P., Pawełek M., Gawlik-Dziki U., . 2011 . "*Salix myrsinifolia* Salisb. as a source of phenolic glycosides: distribution and characteristic of habitat conditions in the mid-eastern Poland". *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus , 10(3), 75–88,.*

33- Sugier, D., Sugier, P., Banaś, A. and C., Szewczuk, . (2013) "The content of phenolic glycosides and macroelements (K, Ca, Mg) in the bark of herbal willows". *Acta Sci. Pol. , Hortorum Cultus 12(4)31-41,.*

34- Sulima P., Przyborowski J.A., Wiwat M., . (2006) "Willow bark – herbal raw material harvested from on arable lands". *Herba Pol. , 52(4), 18–25,.*

35- Tegelberg R., Veteli T., Aphalo P.J., Julkunen-Tiitto R., . (2003) "Clonal differences in growth and phenolics of willows exposed to elevated ultraviolet-B radiation". *Basic Appl. Ecol. , 4, 219–228, .*

36- Trask-Morrell, B. J., B. A. Kottes-Andrews and E. E. Graves, . (1991) "Catalyst effects found in thermal and mass spectrometric analyses of polycarboxylic acids used as durable press reactants for cotton". *Journal of Applied Polymer Science , 43: 1717-1726, .*

37- Turtola S., Rousi M., Pusenius J., Yamaji K., Heiska S., Tirkkonen V., Meier B., Julkunen-Tiitto, R., . (2006) "Genotypic variation in drought response of willows grown under ambient and enhanced UV-B radiation". *Environ. Exp. Bot. 56, 80–86, .*

38- Van Hees, P.A.W., LundstroÈm, U.S. and R. Giesler, . (2000) "Low molecular weight organic acids and their Al-complexes in soil solution , composition, distribution and seasonal variation in three podzolized soils*". Geoderma , 94,173-200 .*

39- Wecker, H. and A. Laubert, . (2004) "Reversible hearing loss in acute salicylate intoxication (in German)". ***HNO*** *52 (4): 347–51, .*

40- Yang, C. Q. and Y. Xu, . (1998) "Paper wet performance and ester cross linking of wood pulp cellulose by poly (Carboxylic acids)" . *Journal of Applied Polymer Science , 67: 649-658,.*