

Porównanie składu polifenoli zawartych w wyciągach hydroalkoholowych liści różnych odmian morwy białej (*Morus alba* L.)**

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Grzegorz Szychalski

COMPARISON OF THE COMPOSITION OF THE POLYPHENOL CONTENT IN THE HYDROALCOHOLIC EXTRACTS LEAVES OF DIFFERENT VARIETIES OF WHITE MULBERRY (*MORUS ALBA* L.)

SUMMARY

The aim of the study was to analyze hydroalcoholic extracts (70% ethanol) obtained from the dried leaves of four varieties of white mulberry (*Morus alba* L.), in terms of the content of polyphenolic compounds. After the extraction the polyphenol content in the obtained extracts was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). This allowed the determination of the following flavonoids: rutin, isovitexin, luteolin, apigenin, hyperoside, vitexin and phenolic acids: rosmarinic and chlorogenic acid. Based on the results, the highest content of chlorogenic acid was observed and for the rutin in the extracts from the dried leaves of the variety Kokuso white mulberry. The study showed that the white mulberry leaves are a good source of natural biologically active substances which are polyphenols.

KEY WORDS: WHITE MULBERRY LEAVES – POLYPHENOLS – FLAVONOIDS – PHENOLIC ACIDS – DISEASES OF CIVILIZATION – HPLC

Wstęp

Morwa biała (*Morus alba* L.) to roślina pochodząca z Azji południowo-wschodniej, przede wszystkim z północnych Chin. Jest to roślina występująca w postaci drzew i krzewów, o wysokości do 15 m, wieloletnia szeroko, rozpowszechniona na świecie, a więc łatwo przystosowująca się do różnorodnych warunków klimatycznych. Morwa hodowana jest w Europie od XI wieku jako roślina dostarczająca jadalnych owoców i przydatnych liści. W Europie wyróżnia się dwa gatunki morwy, jedną z nich jest morwa biała (*Morus alba* L.). Szereg właściwości leczniczych części morfologicznych morwy białej znano już od wieków. W tradycyjnej medycynie

chińskiej wykorzystywano liście morwy białej, m.in. w obniżaniu wysokiego ciśnienia krwi i wysokiego poziomu cholesterolu. Podobne właściwości wykazywały także ekstrakty z kory korzenia morwy, które wykorzystywane były przeciwpalnie, jako środki chroniące wątrobę i nerki, a także jako środki przeciwbólowe (1, 2, 3).

Coraz większe zagrożenie chorobami cywilizacyjnymi, takimi jak miażdżyca, cukrzyca, otyłość, czy choroby nowotworowe, spowodowało, że zaczęto szczegółowo badać właściwości morwy białej pod kątem wykorzystania wszystkich jej części morfologicznych w celach profilaktycznych lub leczniczych. Obecnie pojawia się wiele doniesień naukowych na temat tego, że morwa biała jest bardzo dobrym źródłem związków fenolowych, m.in. flawonoidów i kwasów fenolowych. Związki te stanowią grupę wartościowych substancji o charakterze bioaktywnym, które należą do największej grupy naturalnych antyoksydantów. Uważa się, że dzięki temu mogą odgrywać znaczącą rolę w ochronie ludzkiego organizmu, przed chorobami nowotworowymi i zmianami miażdżycowymi (4, 5).

Dawniej liście morwy białej służyły głównie jako pokarm dla jedwabników, jednakże dokładniejsze poznanie bogatych właściwości prozdrowotnych, pozwoliło wykorzystać je również do celów żywieniowych. Obecnie na rynku spożywczo-farmaceutycznym znane są już produkty zawierające w swoim składzie liście morwy. Istnieją przesłanki, aby sądzić, że aktywność liści morwy może być silnie związana ze zmianami ilościowymi polifenoli, stąd poznanie tej grupy związków wydaje się ważne, zwłaszcza w celu dokładniejszego wystandaryzowania stosowanych odmian.

**Praca powstała w ramach projektu „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych” – PO IG 01.01.02-00-061/09.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie składu polifenoli zawartych w ekstraktach wodno-alkoholowych otrzymanych z liści różnych odmian morwy białej.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wysuszone liście morwy białej następujących odmian: Wielkolistna Żółwińska, China 32, Kokuso oraz Ichinoje. Zebrano je w 2010 i 2011 roku na terenie Zakładu Doświadczalnego Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Pętkowie. Otrzymany surowiec rozdrabniano w młynku laboratoryjnym (uniwersalny młyn tnący Pulverisette 19, sita 0,25 mm) i poddano jednokrotnej ekstrakcji 70% alkoholem etylowym. Zawiesinę sączono na lejkach piankowych G-0, a następnie przesącz zamrażano (temp. -50°C) i liofilizowano (ciśnienie $< 0,5$ hPa). W tak otrzymanych wyciągach oznaczano wybrane polifenole przy pomocy wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analizę fitochemiczną prowadzono za pomocą zwalidowanych metod własnych IWNiRZ. Zastosowano następujące warunki chromatograficzne: detektor DAD, kolumna Nucleosis C18 150,0 x 4,0 mm x 3,0 μm , skład faz ruchomych: A – tetrahydrofuran: diwodorofosforan sodu, pH = 3,0, 5:95 (v:v); faza ruchoma B – tetrahydrofuran: diwodorofosforan sodu, pH = 3,0, 40:60 (v:v), szybkość przepływu: 1,0 ml/min; objętość nastrzyku: 20 μl ; temp. kolumny: 30°C ; detekcję dla izowitekyny, witekyny, luteoliny prowadzono dla długości fali $\lambda = 350$ nm; dla hiperozydu i apigeniny przy długości fali $\lambda = 210$ nm, dla rutyny – $\lambda = 360$ nm, dla kwercetyny – $\lambda = 370$ nm. Podczas oznaczania kwasu rozmarynowego i kwasu chlorogenowego zmieniono skład fazy ruchomej następująco: faza ruchoma A – kwas fosforowy: woda 1:999 (v/v); faza ruchoma B – acetonitryl oraz szybkość przepływu 0,8 ml/min, objętość nastrzyku 10 μl ; a temp. kolumny wynosiła 40°C . Detekcję dla kwasu rozmarynowego prowadzono przy długości fali $\lambda = 205$ nm, a dla kwasu chlorogenowego przy długości fali $\lambda = 330$ nm.

Wyniki wyrażano w postaci zawartości procentowej poszczególnych związków w wyciągach i przedstawiono jako średnie arytmetyczne (z co najmniej trzech oznaczeń) \pm SD. Analizę ogólnej zmienności w dwóch latach zbiorów prowadzono w oparciu o analizę wariancji z powtórzeniami (ANOVA II). Do określenia różnic zawartości pomiędzy poszczególnymi odmianami zastosowano test Fishera LSD (*post-hoc test*). Znamienność statystyczną przyjęto dla $p < 0,05$.

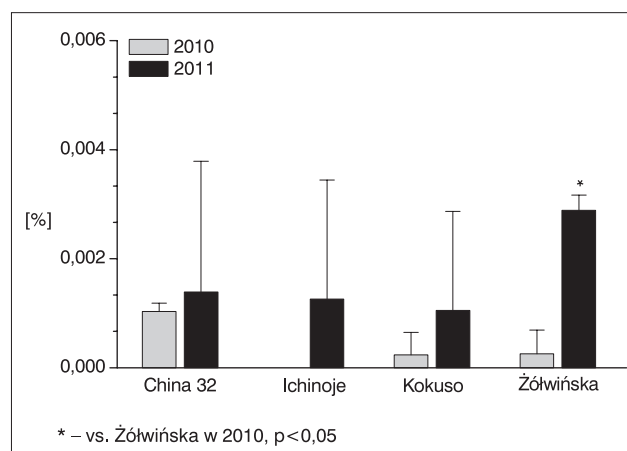
Wyniki

Na rycinach 1-9 przedstawiono analizę zawartości substancji biologicznie czynnych metodą wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej dla liści różnych odmian morwy białej. Podczas badań zidentyfikowano wybrane flawonoidy (kwercetyna, rutyna, witekyna, izowitekyna, luteolina, apigenina, hiperozyd) i kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, kwas rozmarynowy).

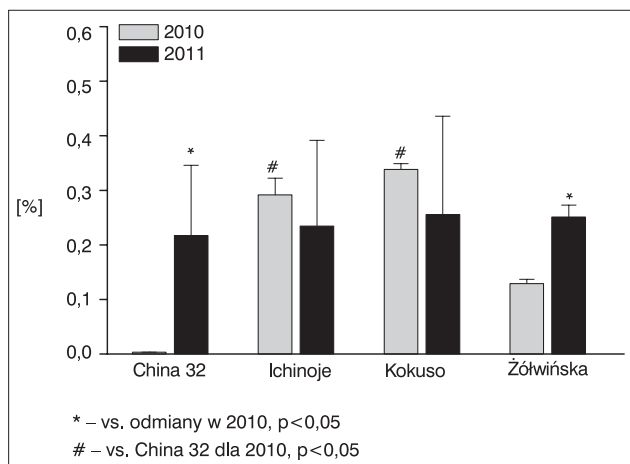
W przypadku kwercetyny (ryc. 1) nie zaobserwowano zmienności między otrzymanymi średnimi (ANOVA II (efekt główny) $F(3,8) = 0,672$; $p = 0,592$), zauważono jednak występowanie różnic dla poszczególnych lat zbioru (efekt czasu $F(1,8) = 5,66$, $p = 0,04$), przy braku jednoczesnej interakcji dla efektu głównego i czasu ($F(3,8) = 0,856$, $p = 0,50$). Na podstawie dalszej szczegółowej analizy stwierdzono, że zawartość kwercetyny w odmianie Żółwińskiej była znamienne wyższa w 2011 roku w porównaniu do zbioru w 2010 roku ($p < 0,05$).

Z kolei analiza zawartości rutyny (ryc. 2) wykazała, że w tym przypadku istniała znamienna zmienność między średnimi zawartościami tego flawonoidu (ANOVA II (efekt główny) $F(3,8) = 4,84$, $p = 0,033$), jednak nie wystąpił istotny statystycznie ogólny wpływ czasu ($F(1,8) = 1,41$, $p = 0,269$), jak i interakcji efektu głównego i czasu zbioru ($F(3,8) = 2,98$, $p = 0,096$). Niemniej jednak, porównując różnice ilości rutyny stwierdzono, że zawartość tego związku dla odmiany China 32 i Żółwińskiej w 2011 roku była znamienne wyższa w porównaniu do 2010 roku ($p < 0,05$).

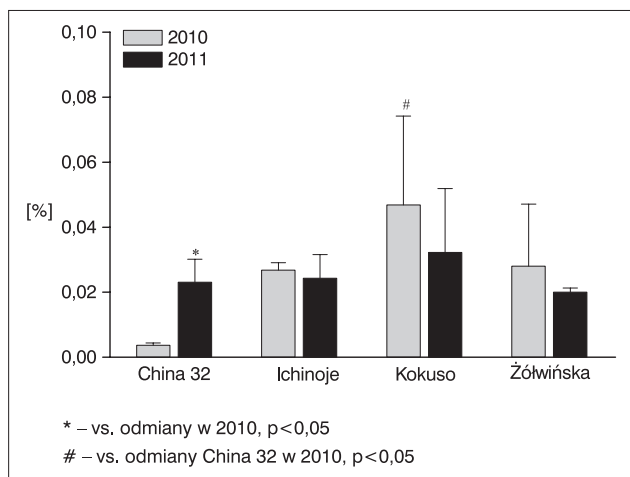
W odniesieniu do witekyny (ryc. 3) nie wystąpiła zmienność między otrzymanymi średnimi (ANOVA II (efekt główny) $F(3,8) = 2,11$, $p = 0,177$), jak i w przypadku czasu ($F(1,8) = 0,170$, $p = 0,691$), chociaż



Ryc. 1. Zawartość kwercetyny w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.



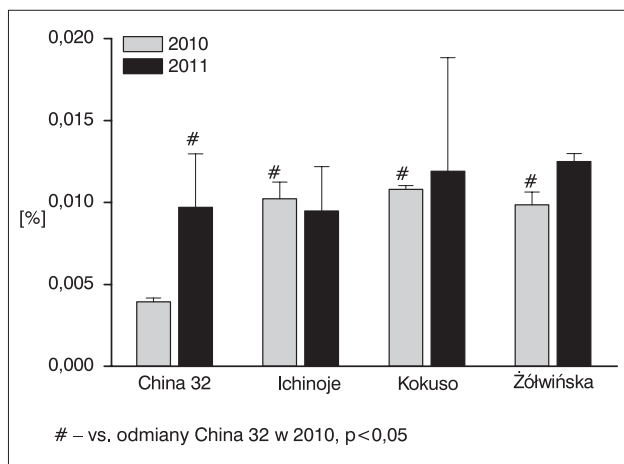
Ryc. 2. Zawartość rutyny w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.



Ryc. 3. Zawartość witeksyny w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.

analiza wpływu obu czynników okazała się być istotna statystycznie ($F(3,8) = 4,41$, $p = 0,041$). Oceniając rezultaty szczegółowej analizy różnic pomiędzy otrzymanymi wartościami średnimi stwierdzono, że witeksyna występowała w największej ilości w odmianie Kokuso w 2010 roku, zwłaszcza w porównaniu do China 32, ($p < 0,05$), a z kolei dla odmiany China 32 w roku 2011 zawartość tego związku była wyższa niż w roku poprzednim ($p < 0,05$).

Oceniając zmiany zawartości izowiteksyny (ryc. 4) zauważono, że pomiędzy analizowanymi odmianami nie występowały istotne różnice (ANOVA II (efekt główny): $F(3,8) = 3,23$, $p = 0,08$, wpływ czasu: ($F(1,8) = 3,27$, $p = 0,108$), interakcja: $F(3,8) = 1,29$, $p = 0,341$). Jednakże ze względu na fakt, że dla odmiany China 32 w 2010 roku zmierzono najniższą zawartość tego związku, stąd otrzymano po analizie post-hoc znamienne różnice między pozostałymi od-

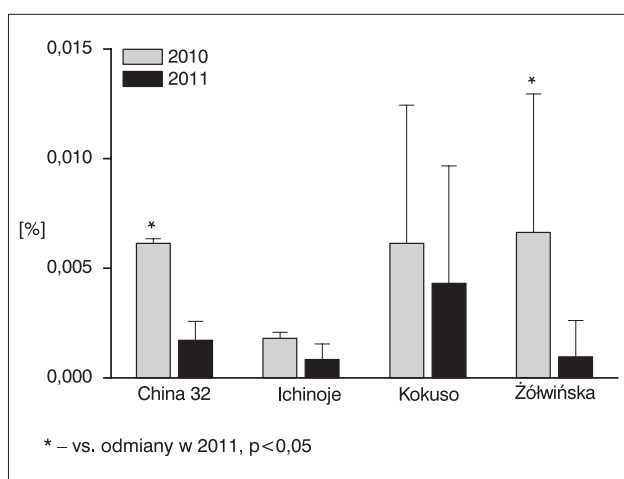


Ryc. 4. Zawartość izowiteksyny w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.

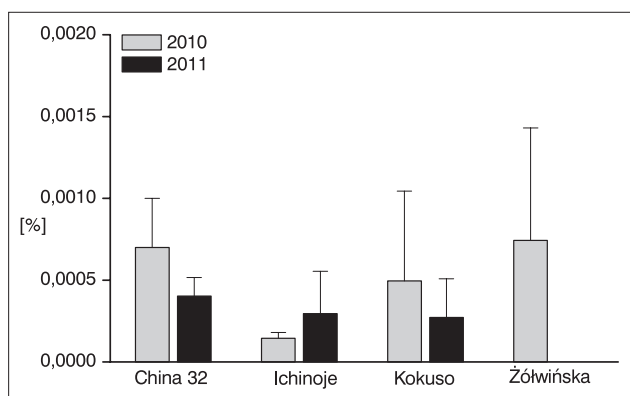
mianami dla tego roku zbioru a China 32 ($p < 0,05$) oraz wyraźnie wyższą zawartość izowiteksyny w roku 2011 dla tej odmiany ($p < 0,05$).

W przypadku luteoliny (ryc. 5) nie wystąpiła zmienność między otrzymanymi średnimi (ANOVA II (efekt główny) $F(3,8) = 0,640$; $p = 0,610$), zauważono jednak występowanie różnic dla poszczególnych lat zbioru (efekt czasu $F(1,8) = 20,6$, $p = 0,002$), przy braku jednoczesnej interakcji dla efektu głównego i czasu ($F(3,8) = 2,39$, $p = 0,144$). Na podstawie dalszej szczegółowej analizy stwierdzono, że zawartość luteoliny dla odmiany Żółwińskiej oraz China 32 była znamienne wyższa w roku 2010 w porównaniu do zbioru w 2011 roku ($p < 0,05$).

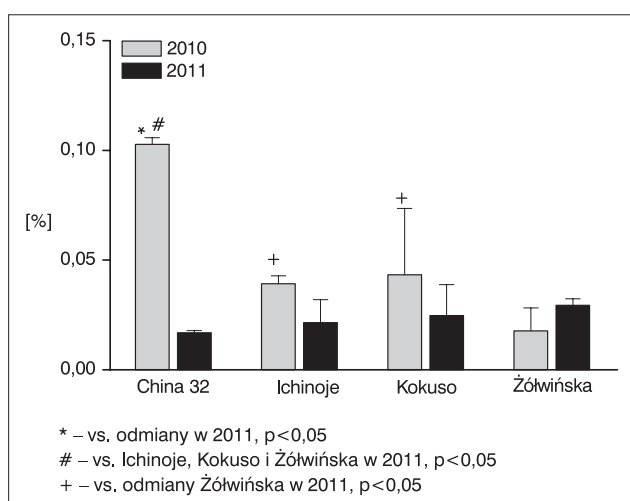
Odnośnie apigeniny (ryc. 6) zauważono, że pomiędzy analizowanymi odmianami nie występowały istotne różnice (ANOVA II (efekt główny): $F(3,8) = 0,745$, $p = 0,708$, wpływ czasu: ($F(1,8) = 1,58$, $p = 0,244$),



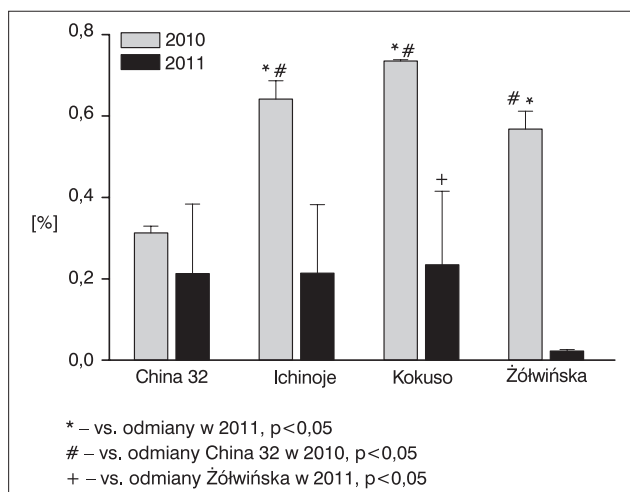
Ryc. 5. Zawartość luteoliny w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.



Ryc. 6. Zawartość apigeniny w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.



Ryc. 7. Zawartość hiperozydu w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.



Ryc. 8. Zawartość kwasu chlorogenowego w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.

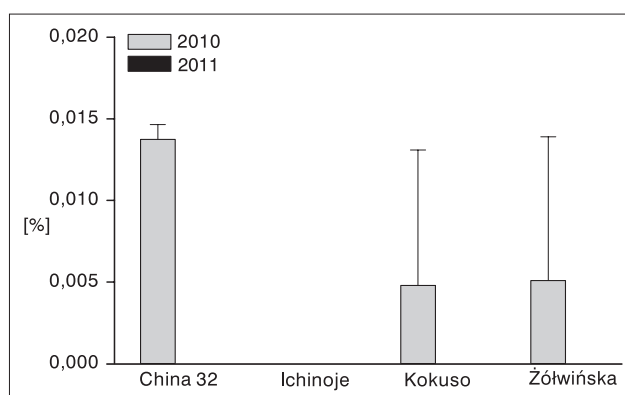
interakcja: $F(3,8) = 0,680$, $p = 0,588$), co zaowocowało brakiem występowania znamiennej różnicy

w zawartościach tego związku między badanymi odmianami w obu latach zbiorów.

Z kolei analiza zawartości hiperozydu (ryc. 7) wykazała, że w tym przypadku istniała znamienność między średnimi zawartościami tego flawonoidu (ANOVA II (efekt główny) $F(3,8) = 23,0$, $p = 0,001$), wystąpił także istotny statystycznie ogólny wpływ czasu ($F(1,8) = 16,7$, $p = 0,003$), jak i interakcji efektu głównego oraz czasu zbioru ($F(3,8) = 9,32$, $p = 0,006$). Zauważono, że najwyższa zawartość tego związku występowała w odmianie China 32 w stosunku do pozostałych odmian zebranych w 2010 roku ($p < 0,05$), jak i do zbioru dla tej odmiany w roku 2011 ($p < 0,05$). Z kolei odmiany Ichinoje oraz Kokuso miały więcej tego flawonoidu niż odmiana Żółwińska w roku 2010 ($p < 0,05$), podczas gdy wszystkie odmiany w roku 2011 odznaczały się niższą zawartością hiperozydu i nie różniły się między sobą znamienne.

W przypadku kwasu chlorogenowego (ryc. 8) także wystąpiła znamienność między średnimi zawartościami tego flawonoidu (ANOVA II (efekt główny) $F(3,8) = 5,17$, $p = 0,028$), wpływ czasu ($F(1,8) = 87,0$, $p = 0,0001$), jak i interakcji efektu głównego i czasu zbioru ($F(3,8) = 5,72$, $p = 0,022$). Stwierdzono, że w roku 2010 we wszystkich odmianach występowała większa zawartość tego związku, przy czym znamienne więcej oznaczono go w odmianach Kokuso, Ichinoje i Żółwińskiej w porównaniu do zbiorów w 2011 roku ($p < 0,05$). Ponadto odmiany charakteryzowały się znamienne większą zawartością kwasu chlorogenowego w stosunku do China 32 w 2010 roku ($p < 0,05$). Odmiana Kokuso miała nie tylko najwyższą zawartość kwasu chlorogenowego w 2010 roku, ale i w 2011 roku, np. w stosunku do odmiany Żółwińskiej ($p < 0,05$).

Z kolei analiza zawartości kwasu rozmarynowego (ryc. 9) wykazała, że w 2011 roku nie określono oznaczalnych ilości tego związku, stąd analizowano



Ryc. 9. Zawartość kwasu rozmarynowego w wyciągach otrzymanych z liści badanych odmian morwy białej.

tylko zbiory odmian w 2010 roku za pomocą ANOVA I ($F(3,8) = 2,66, p = 0,119$). Stwierdzono brak występowania znamienych różnic między badanymi średnimi, a dla odmiany Ichinoje zawartość była także nieoznaczalna w analizowanym roku.

Omówienie wyników

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że spośród badanych substancji biologicznie czynnych w ekstraktach wodno-etanolowych otrzymanych z liści morwy białej, najwyższe stężenia odnotowano dla kwasu chlorogenowego, występującego na poziomie około 0,73% w odmianie Kokuso w roku 2010. Memon i wsp. (6), również analizowali w liściach morwy białej zawartość następujących kwasów fenolowych: galusowego, protokatechowego, p-hydroksybenzoesowego, wanilinowego, chlorogenowego, syringowego, p-kumarowego, ferulowego i m-kumarowego, oraz aldehydu syringowego. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili, że w wysuszonych liściach morwy białej w największej ilości występuje kwas chlorogenowy. Kolejnym znaczącym pod względem zawartości związkiem bioaktywnym w badanych ekstraktach wodno-etanolowych z liści morwy białej była rutyna, występująca na poziomie około 0,33%, w odmianie Kokuso w roku 2010. Wysoką zawartość rutyny zaobserwowano także w odmianie Ichinoje, również w roku 2010. Nieznacznie niższe wartości określono dla rutyny w 2011 roku dla wszystkich czterech odmian morwy białej (Żółwińskiej, China 32, Kokuso oraz Ichinoje).

Chu i wsp. (7) zidentyfikowali związki w morfologicznych częściach morwy białej, wśród których wykryli rutynę, kwercetynę, luteolinę i kwas chlorogenowy. Oznaczenie to wykonano za pomocą wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej z detekcją amperometryczną CE-AD. Wykazano, że w liściach morwy białej w największej ilości występuje rutyna (179,1 $\mu\text{g/g}$). Podobnie Butt i wsp. (5) zaobserwowali wysoką zawartość rutyny (659 mg/100 g s.m).

W przypadku kwercetyny i izowitekyny najwyższą zawartość określono dla odmiany Żółwińska

w 2011 roku, a w przypadku luteoliny i apigeniny również dla odmiany Żółwińskiej w 2010 roku. Dużą zawartość apigeniny wykryto również w odmianie China 32 w 2010 roku. Ta sama odmiana i w tym samym roku charakteryzowała się także największą zawartością hiperozydu i kwasu rozmarynowego. Natomiast w przypadku witekyny największą zawartość zaobserwowano dla odmiany Kokuso w 2010 roku.

Zawartości związków polifenolowych w liściach morwy białej zebranych w ciągu dwóch lat (2010-2011) znacznie się różnią, co sugeruje duży wpływ warunków pogodowych. Zasadnym jest więc poddawanie szczegółowym badaniom corocznych zbiorów dla stwierdzenia poziomu substancji polifenolowych.

Wnioski

1. Hydroalkoholowe ekstrakty z wysuszonych liści morwy białej zawierają znaczne ilości flawonoidów i kwasów fenolowych, przy czym w największych ilościach występowała rutyna i kwasu chlorogenowy.
2. W niniejszej pracy wykazano znaczną zmienność zawartości poszczególnych polifenoli w analizowanych latach.

Piśmiennictwo

1. Doi K, Kojima T, Makino M i wsp. Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. Chem Pharm Bull Tokyo 2001; 49(2):151-3.
2. Dugo P, Donato P, Cacciola F i wsp. Characterization of the polyphenolic fraction of *Morus alba* leaves extracts by HPLC coupled to a hybrid IT-TOF MS system. J Sep Sci 2009; 32:3627-34.
3. El-Beshbishy HA, Singab ANB, Sinkkonen J i wsp. Hypolipidemic and antioxidant effects of *Morus alba* L. (Egyptian mulberry) root bark fractions supplementation in cholesterol-fed rats. Life Sci 2006; 78:2724-33.
4. Dudek-Makuch M, Gawron-Gzella A. Naturalne antyoksydanty w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. Herba Pol 2007; 53(2):143-4.
5. Butt MS, Nazir A, Sultan MT, Schroën K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. Trends Food Sci Tech 2008; 19:505-12.
6. Memon AA, Memon N, Luthria DL i wsp. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. Pol J Food Nutr Sci 2010; 60(1):25-32.
7. Chu Q, Miao L, Tian X i wsp. Study on capillary electrophoresis-amperometric detection profiles of different parts of *Morus alba* L. J Chromatogr A 2006; 1116:286-90.

otrzymano/received: 05.09.2013
zaakceptowano/accepted: 13.10.2013

Adres/address:
*mgr inż. Aleksandra Wawro
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań
tel. : +48 (61) 84-55-814, fax: +48 (61) 84-17-830
e-mail: aleksandra.wawro@iwnirz.pl