

*Tadeusz Wolski¹, Tomasz Baj¹, Katarzyna Wolska², Wanda Zwolan¹

Badania anatomiczne części nadziemnych i podziemnych rzepienia pospolitego *Xanthium strumarium* L. oraz analiza chromatograficzna frakcji garbnikowej

¹Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Kierownik Zakładu: dr hab. n. farm. Grażyna Zgórk

²Studia Doktoranckie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Kierownik Studiów Doktoranckich: prof. dr hab. n. med. Grzegorz Dzida

THE ANATOMICAL INVESTIGATIONS OF AERIAL AND UNDERGROUND PARTS OF ROUGH COCKLEBUR (*XANTHIUM STRUMARIUM* L.) AND CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF TANNIN FRACTION

SUMMARY

The present work is a continuation of research on species *Xanthium strumarium* L. In the previous sections describe its pharmacological properties, phytochemical analysis of phenolic compounds, sterols and triterpenes and analyze the content and composition of essential oil. The first time the raw material was carried out systematic anatomical studies stems, leaves and roots. It has been shown that in all the examined organs are secreted structure in the form of channels, vascular tissue and hair. In the present discharge channels. The stem was a small secretory channels that form two rings external and internal. The root canals are secreted in the cortex secondary. The results of analysis of tannins in the examined organs *Xanthium strumarium* L. are as follows: the highest percentage shows the herb 10.54%, fruits 7.14% and the lowest roots 3.35%. TLC analysis allowed to identify the presence of phenolic acids: caffeic, gallic and ferulic in all the tested extracts, and in addition to identify the chlorogenic acid from extracts of the herb, fruit and roots following acid hydrolysis. HPLC analysis of tannin fractions after hydrolysis of extracts from the herb, fruit and roots revealed the presence of the following phenolic acids in the herb: gallic, caffeic, protocatechuic, syringic, chlorogenic, ferulic and vanilic; in fruits gallic, caffeic, protocatechuic, chlorogenic, ferulic and vanillic; and in the roots of gallic, caffeic, chlorogenic, ferulic and vanilic acids.

KEYWORDS: *XANTHIUM STRUMARIUM* – ANATOMICAL INVESTIGATION – CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS – TANNIN FRACTION

Wstęp

Prezentowana praca stanowi kontynuację badań nad gatunkiem *Xanthium strumarium* L. W poprzednich częściach opisano jego właściwości farmakologiczne, analizę fitochemiczną związków fenolowych, steroli i triterpenów oraz analizę zawartości i składu olejku eterycznego (1-3).

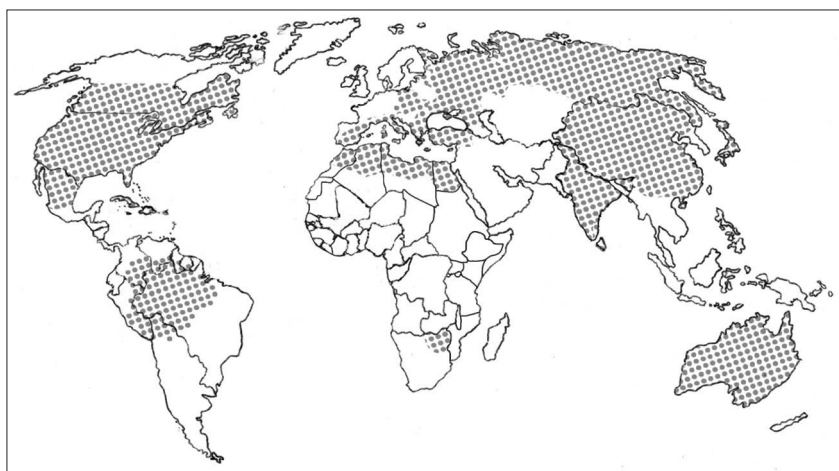
Gatunek *Xanthium strumarium* L. występuje w różnych siedliskach: na polach uprawnych, pastwiskach, nieużytkach, poboczach, przydrożach, torfowiskach, brzegach jezior, rzek, stawów i strumieni, jak też w miejscach wilgotnych zalewanych przez powódzie (1, 4-9). Rodzaj *Xanthium* najbardziej rozpowszechniony jest w strefie umiarkowanej. Spotkać go można niemal na całym świecie. Rozmieszczenie *Xanthium strumarium* L. przedstawiono na rycinie 1. Jednym z powodów znacznego rozprzestrzeniania się tej rośliny jest zdolność do samozaopylania. Rzepień najczęściej rośnie w małych skupiskach, na glebach brunatnych i pseudobielicowych, wytworzonych z piasków luźnych i słabo gliniastych o odczynie słabo kwaśnym i obojętnym (10, 11). W niedogodnych warunkach, na suchych słabych ziemiach, może urosnąć zaledwie kilka centymetrów, potrafi też przetrwać suszę, a następnie wydać nasiona. Jak podaje piśmiennictwo, *Xanthium strumarium* L. można spotkać także na Lubelszczyźnie, zwłaszcza w północno- i południowo-zachodniej jej części (ryc. 2) (11). Obraz całej rośliny *Xanthium strumarium* L. przedstawia rycina 3.

Cel pracy

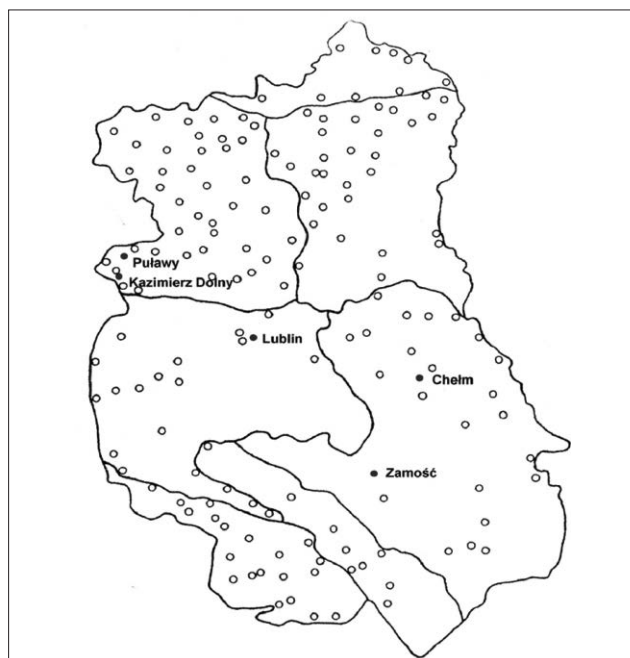
Celem pracy były badania anatomiczno-morfologiczne oraz analiza chromatograficzna frakcji garbnikowej.

Materiał i metody

Surowiec do badań stanowiły organy nadziemne – ziele (liście i łodygi), owoce oraz korzenie rzepienia pospolitego *Xanthium strumarium* L. Surowiec w pierwszym roku badań pochodził ze stanu naturalnego i zebrano go w okolicach Kazimierza Dolnego nad Wisłą, a w dalszych latach z upraw w Ogrodzie Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (ryc. 4).



Ryc. 1. Rozmieszczenie *Xanthium strumarium* L. na świecie (opracowanie własne)



Ryc. 2. Występowanie *Xanthium strumarium* L. na Lubelszczyźnie (wg 11)

Surowiec do badań pozyskiwano z roślin jedno-
rocznych, które zbierano w drugiej połowie września,
następnie suszono go w cieniu i przewiewie oraz roz-
drabniano w zależności od potrzeb i przygotowywano
do badań. Prowadzone analizy trwały trzy lata.

Badania anatomiczne

Badania obejmowały części nadziemne rzeżenia
pospolitego – łodygę i liść, oraz podziemne – korzeń.
Tkanki roślinne badano na przekrojach poprzecz-
nych wykonanych ze świeżego materiału roślinnego
utrwalonego w FFA (etanol 50% + kwas octowy +
formalina 40% (990:5:5)) (12). W celu zabarwienia
struktur komórkowych i eksudatów wydzielniczych,
w preparatach sporządzonych ze świeżych łodyg i liści
zastosowano testy histochemiczne: płyn Lugola, Sudan
III oraz błękit toluidynowy (13).

Mikroskopia świetlna

Fragmenty łodyg i liści utrwalano w 2,5% alde-
hydzie glutarowym w 0,1 m buforze kokodylano-
wym (pH = 7,4). Po dehydratacji próbki przenoszono



Ryc. 3. *Xanthium strumarium* L. (11)



Ryc. 4. Poletka doświadczalne rzepienia pospolitego *Xanthium strumarium* L. w Ogrodzie Roślin Leczniczych Katedry i Zakładu Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych UM w Lublinie

do tlenu propylenu i zatapiano w żywicy SPURR. Skrawki tkanek roślinnych o grubości 0,5-0,7 μm uzyskiwano przy użyciu ultramikrotomu Reichert Ultracut S (13).

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Po utrwaleniu w aldehydzie glutarowym i odwodnieniu część próbek przenoszono do acetonu. Następnie suszono je w ciekłym CO_2 i napyłano złotem przy użyciu CS 100 Sputter Coater. Obserwacje wykonywano przy użyciu mikroskopu BS-340 Tesla. Do barwienia stosowano 1% roztwór błękitu metylenowego z azurem II w wodnym roztworze czteroboranu sodu (13).

Oznaczenie ilościowe garbników

W celu wyizolowania frakcji garbników z ziela, owoców i korzeni rzepienia pospolitego sporządzono wyciągi wodne stosując klasyczną ekstrakcję typu ciecz-ciało stałe. Oznaczenie ilościowe zawartości garbników prowadzono zgodnie z metodyką opisaną w FP IV (15).

Izolacja frakcji garbnikowej

Wyciągi wodne otrzymane według procedury (15) ekstrahowano w układzie ciecz-ciecz porcjami octanu etylu (10 x 10 ml). Następnie zebrane frakcje octanowe osuszano bezwodnym siarczanem sodu. Po przesączeniu oddestylowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Suchą pozostałość rozpuszczano w 10 ml metanolu. Tak uzyskane próbki poddano badaniom chromatograficznym TLC i HPLC (14).

Hydroliza frakcji garbników

W celu wyodrębnienia związków fenolowych – podstawowych składników garbników hydrolizujących – przeprowadzono hydrolizę kwasową surowca. Odważano po 10 g każdego z organów rzepienia pospolitego i umieszczano je w kolbach okrągłodennych, do których dodawano po 200 ml 4% roztworu kwasu siarkowego (VI), po czym ogrze-

wano przez 4 godziny na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Otrzymane hydrolizaty ostudzono, przesączono i ekstrahowano eterem dietylowym (10 x 10 ml). Połączone wyciągi eterowe osuszono bezwodnym siarczanem sodu, przesączono, po czym oddestylowano rozpuszczalnik do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczono w 10 ml metanolu i poddano analizie TLC (14, 16-18).

Analiza TLC garbników

Analizę jakościową TLC frakcji wyodrębnionych zgodnie z metodyką opisaną powyżej, a zawierającą związki garbnikowe oraz kwasy fenolowe uwolnione z połączeń garbnikowych w wyniku hydrolizy kwasowej, wykonano na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym Si60F_{254} , celulozą oraz poliamidem. Podczas rozwijania stosowano technikę jednokierunkową. Identyfikację prowadzono przez porównanie wartości R_f związków występujących w badanych frakcjach z wartościami R_f wzorców.

Chromatogramy rozwijano w następujących układach elucyjnych:

- dla fazy stacjonarnej z żelem krzemionkowym:
 - toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy, 5 + 4 + 1 (v/v) (19),
 - octan etylu-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda, 100 + 11 + 11 + 27 (v/v) (20),
 - eter diizopropylowy-kwas mrówkowy 98%, 9 + 1 (v/v) (układ własny),
 - chloroform-octan etylu-kwas mrówkowy 98%, 5 + 4 + 1 (v/v) (21),
 - n-butanol-kwas octowy-woda, 4 + 1 + 5 (v/v) (22),
- dla fazy stacjonarnej z celulozą:
 - dioksan-woda, 10 + 1 (v/v) (układ własny),
 - kwas octowy-woda, 15 + 85 (v/v) (układ własny),
 - chloroform-kwas octowy-woda, 90 + 45 + 6 (v/v) (23),
- dla fazy stacjonarnej z poliamidem:
 - metanol-woda-lodowaty kwas octowy, 20 + 12,5 + 1 (v/v) (21),

- metanol-woda-dioksan-kwas mrówkowy 98%, 20 + 12,5 + 1 + 1 (v/v) (22).

Rozwinięte chromatogramy wizualizowano pod lampą UV przy długościach fali $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm oraz przy użyciu Videostore (Camag, Szwajcaria). Płytki chromatograficzne wywołano przez spryskanie zdiazowanym kwasem sulfanilowym.

Wysokosprawna chromatografia HPLC ekstraktów garbnikowych

Przed przeprowadzeniem analizy HPLC próbki poddano oczyszczeniu metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) na kolumnkach z fazą oktaedecylową RP C₁₈ zgodnie z wcześniej opisaną metodyką (24).

Analiza frakcji garbnikowej po hydrolizie kwasowej metodą HPLC

Analizę chromatograficzną HPLC wykonano w układzie faz odwróconych stosując chromatograf cieczowy typu LaChrom firmy Merck z detektorem diodowym DAD (L-7450), pompą dozującą (L-7100), degazerem (L-7612), pętlą dozującą 20 μ l, termostatem (L-7360), dozownikiem Rheodyne, kolumną stalową LiChrospher 100 RPCIS o wymiarach 250 mm x 4 mm wypełnioną fazą stacjonarną o średnicy ziarna 5 μ m. Analizę prowadzono w temp. 25°C. Jako fazę rozwijającą stosowano układ metanol-woda (25 + 75, v/v) z dodatkiem 1% (v/v) kwasu octowego. Szybkość przepływu wynosiła 0,8 ml/min, a wielkość nastrzyku – 20 μ l. Identyfikację kwasów fenolowych przeprowadzono porównując ich czasy retencji t_R z wzorcami oraz spektroskopowo, wyznaczając ich widma w zakresie UV (219-400 nm) (25, 26). Pełną analizę frakcji garbnikowej wykonano po hydrolizie kwasowej.

Budowa anatomiczna łodygi, liścia i korzenia rzeżenia pospolitego

Anatomia łodygi

Łodyga rzeżenia na przekroju poprzecznym ma kształt lekko spłaszczony. Okryta jest jednowarstwową epidermą, wytwarzającą włoski mechaniczne. Komórki epidermy mają silnie zgrubiałe ściany zewnętrzne z wyraźnie wyodrębnioną warstwą kutykuli. Włoski mechaniczne są masywne, wielokomórkowe, jednorzędowe.

Warstwę wzmacniającą łodygi tworzy kolenchyma matyczna hypoderma. Komórki kolenchymy kątowej obejmują 7-8 warstw. W kolenchymie widoczne są liczne chloroplasty. W parenchymie kory pierwotnej rozmieszczone są niewielkie kanały wydzielnicze, które tworzą dwa pierścienie. Zewnętrzny położony

jest bliżej kolenchymy, wewnętrzny w sąsiedztwie endodermy. Kanał wydzielniczy ograniczony jest jedną warstwą epitelu wydzielniczego, a wokół otaczają go komórki miększu różnej wielkości. Endoderma w łodydze rzeżenia wyraźnie się wyodrębnia z powodu zgrubiałych ścian komórkowych. Falistą linią opasuje od zewnątrz wiązki przewodzące.

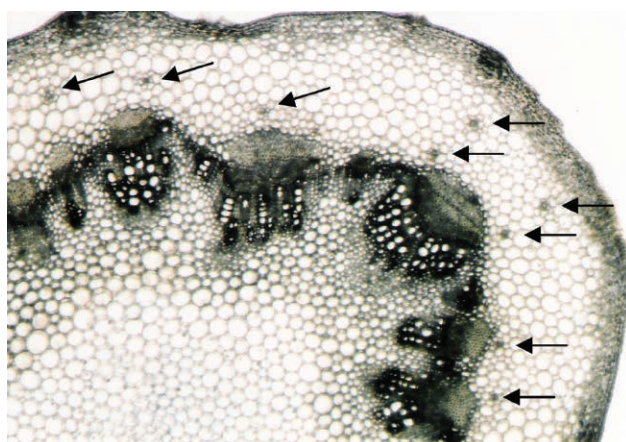
Położone w walcu osiowym pasma wiązek przewodzących są oddzielone od siebie miększem i tworzą pojedynczy pierścień. Kolateralne, otwarte wiązki przewodzące mają różne rozmiary. W czasie rozrastania się łodygi na grubość, pomiędzy dużymi wiązkami powstają wiązki waskularne mniejszych rozmiarów.

Centralną część łodygi zajmuje duży rdzeń, utworzony z komórek miększowych o wielkości podobnej do komórek miększu kory pierwotnej.

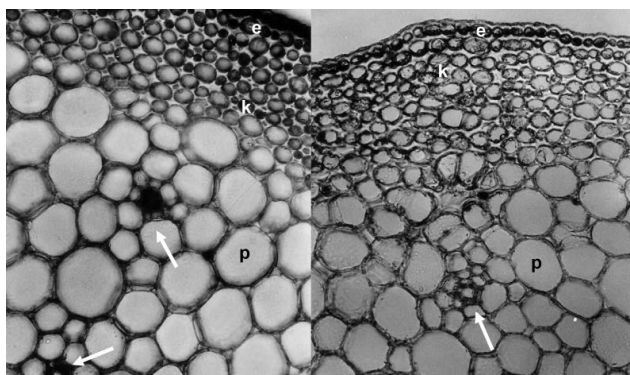
Omawiana powyżej budowa anatomiczna łodygi rzeżenia pospolitego została przedstawiona na rysunkach 5-9.



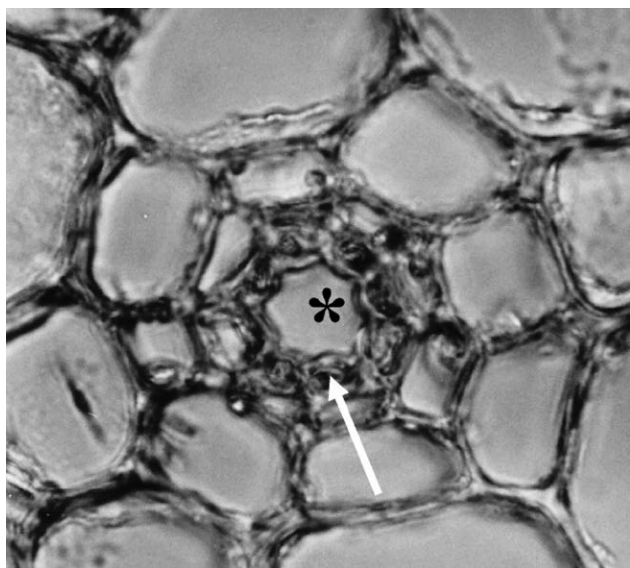
Ryc. 5. Przekrój poprzeczny łodygi rzeżenia pospolitego (x 20)



Ryc. 6. Fragment przekroju poprzecznego łodygi rzeżenia pospolitego z widocznymi kanałami wydzielniczymi (strzałki) (x 35)



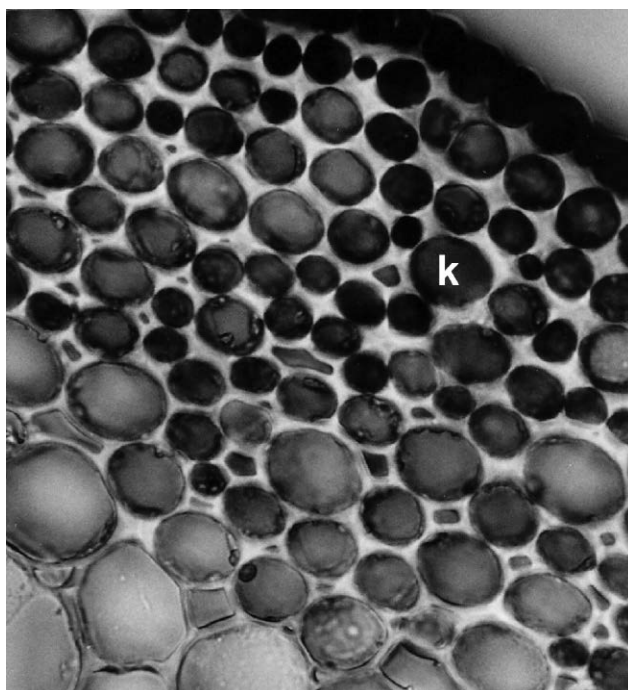
Ryc. 7. Fragment przekroju poprzecznego kory pierwotnej łodygi rzepienia pospolitego z widoczną epidermą (e), kolenchymą kątowną (k), parenchymą (p) i kanałami wydzielniczymi (strzałki) (lewe zdjęcie x 190, prawe zdjęcie x 17)



Ryc. 8. Kanał wydzielniczy w korze pierwotnej łodygi (gwiazdka) rzepienia pospolitego z pojedynczą warstwą epitelu wydzielniczego (strzałka) (x 650)

Anatomia liścia

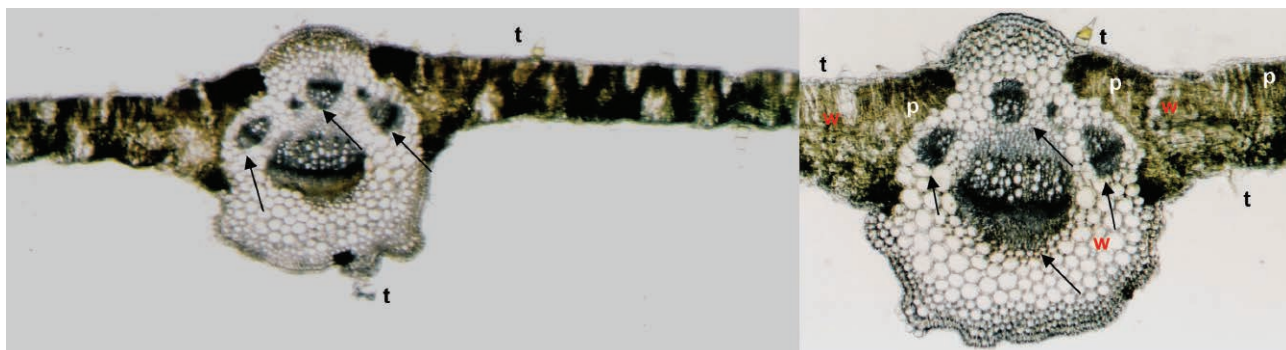
Nerw główny liścia rzepienia pospolitego otoczony jest jednowarstwową epidermą, pod którą od strony



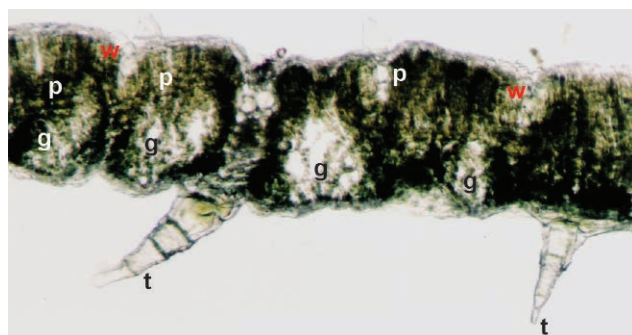
Ryc. 9. Wielowarstwowa kolenchyma kątowna (k) tworząca warstwę hypodermalną w łodydze rzepienia pospolitego (x 350)

doosiowej (górnej) i odosiowej (dolnej) występują 2-4 warstwy kolenchymy. Epiderma wytwarza wielokomórkowe włoski mechaniczne. Centralną część nerwu zajmuje duża wiązka przewodząca kolateralna otwarta. Powyżej tej wiązki położone są 3 wiązki o znacznie mniejszych rozmiarach. Blaszka liściowa okryta jest epidermą wytwarzającą liczne, duże włoski mechaniczne. Podobnie jak na łodydze, są one wielokomórkowe, jednorzędowe. Aparaty szparkowe występują w skórze dolnej. Warstwę miękiszu palisadowego rozdzielają duże komórki miękiszu wodonośnego tworzące jasne trójkątne strefy w górnej części liścia. Miękisz gąbczasty składa się z drobnych komórek o luźnym układzie, z wyraźnie zaznaczonymi, jaśniejszymi przestrzeniami międzykomórkowymi.

Budowa anatomiczna liścia rzepienia pospolitego została przedstawiona na rycinach 10-12.



Ryc. 10. Fragmenty przekroju poprzecznego liścia rzepienia pospolitego z widocznym nerwem głównym. Widoczne wiązki przewodzące (strzałki), włoski mechaniczne (t) i warstwy miękiszu wodonośnego (w) rozdzielające miękisz palisadowy (p) (x 87)



Ryc. 11. Fragment przekroju poprzecznego blaszki liściowej rzeżenia pospolitego z masywnymi włoskami mechanicznymi (t), miększem palisadowym (p), gąbczastym (g) i wodonośnym (w) (x 87)

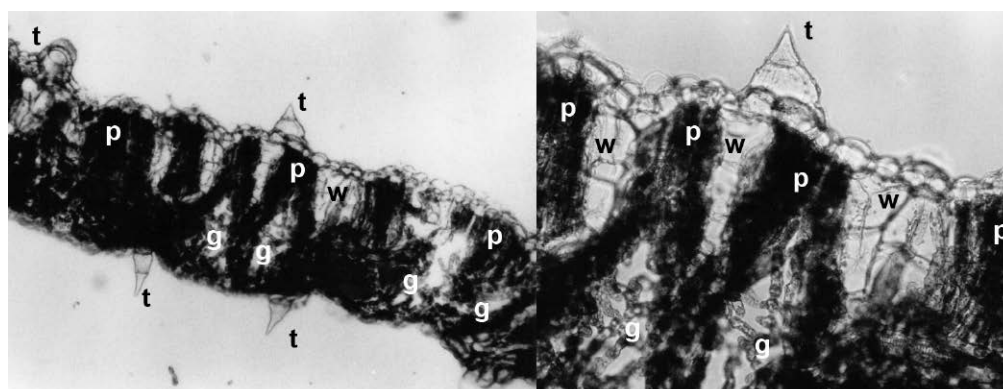
stanowi wewnętrzny walec pełniący funkcje przewodzące i wzmacniające. W ksylemie można wyróżnić duże naczynia o zgrubiałych, drewniejących ścianach, cewki, włókna drzewne i niewiele elementów miększu drzewnego. W obrębie warstwy ksylemu nie zaobserwowano miększowych promieni rdzeniowych.

Budowa anatomiczna korzenia rzeżenia pospolitego została przedstawiona na rycinach 13-15.

Wyniki analizy TLC i HPLC frakcji garbnikowej

Zawartość procentowa garbników w badanych surowcach

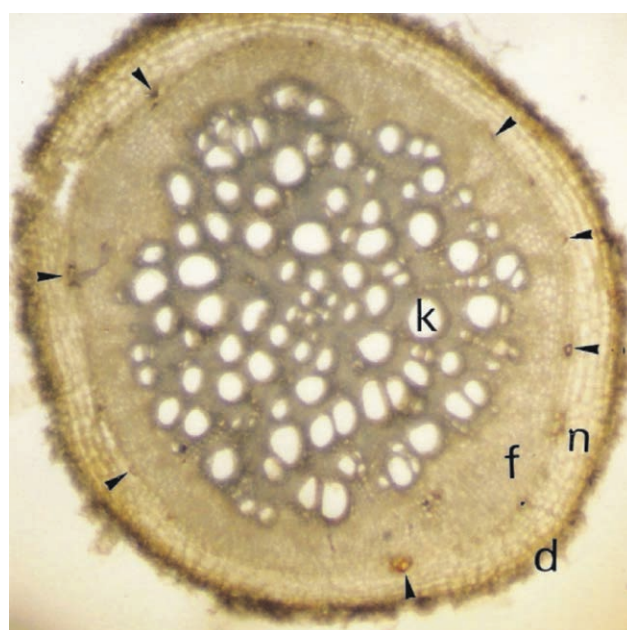
Dane liczbowe ilościowego oznaczenia procentowej zawartości garbników przedstawiono w tabeli 1.



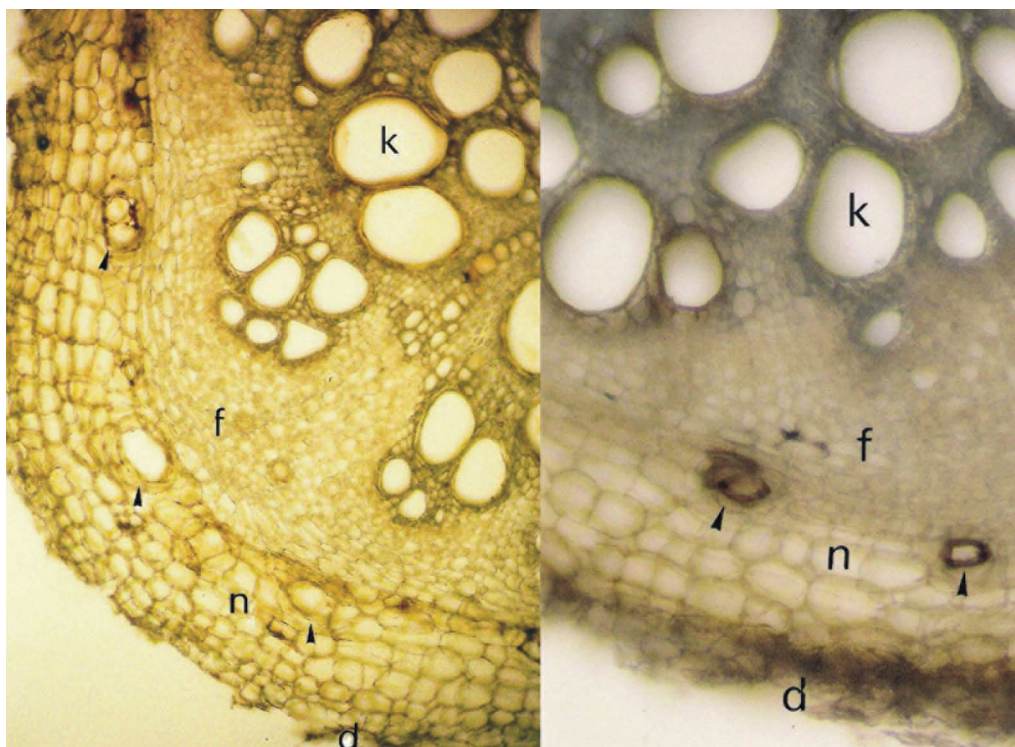
Ryc. 12. Fragment przekroju poprzecznego liścia rzeżenia pospolitego z widocznym miększem wodonośnym (w) rozdzielającym warstwę miększu palisadowego (p) oraz miększem gąbczastym (g) (lewe zdjęcie x 80, prawe zdjęcie x 180)

Anatomia korzeni

Korzenie *Xanthium strumarium* L., które osiągnęły budowę wtórną, mają silnie rozwinięty ksylem wtórny, położony w centralnej części organu. Ksylem otaczają: warstwa łyka, kora wtórna i peryderma. Peryderma jest warstwą okrywającą, składającą się z kilku pokładów cienkościennych komórek, które łatwo się odrywają podczas przygotowania preparatów. Zewnętrzną część perydermy tworzą komórki korka o ścianach zawierających lamele subenylowe. Kora wtórna zbudowana jest z 4-5 warstw parenchymy. W wewnętrznych warstwach kory rozmieszczone są kanały wydzielnicze różnej wielkości otoczone przez 1 lub 2 warstwy epiteli wydzielniczego. W niektórych kanałach wydzielniczych obserwowano brązową wydzielinę wyścielającą światło kanału lub występującą w formie kropeł. Łyko wtórne wyróżnia się obecnością drobnych, cienkościennych komórek. W komórkach przyrurkowych można zaobserwować ciemniejszą treść – gęstą cytoplazmę. Pierścień kambium oddziela warstwę łyka wtórnego od wtórnego ksylemu. Ksylem wtórny, łącznie z wypełniającym rdzeń korzenia ksylemem pierwotnym,

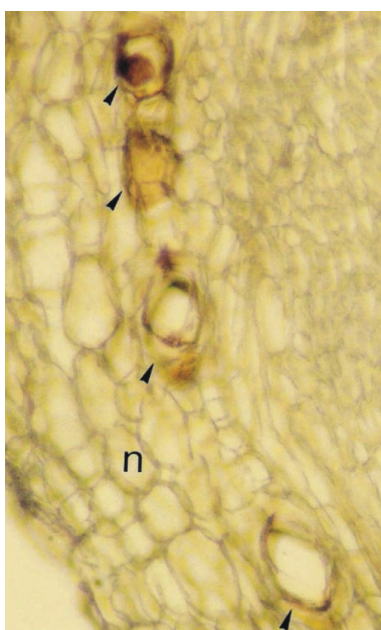


Ryc. 13. Przekrój poprzeczny korzenia rzeżenia pospolitego: d – peryderma, n – kora wtórna, f – felom, k – ksylem, groty strzałek – kanały wydzielnicze (x 50)



Ryc. 14. Fragmenty przekrojów poprzecznych korzenia z widocznym ksylemem (k), felomem (f), kanałami wydzielniczymi (groty strzałek) w korze wtórnej (n). Widoczne złuszczone warstwy perydermy (d) (x 150)

Jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli 1, najwyższą zawartość garbników wykazało ziele (10,54%), nieco niższą owoce (7,14%), a najniższą korzenie (3,35%).



Ryc. 15. Kanały wydzielnicze (groty strzałek) z brązową wydzieliną, położone w korze wtórnej (n) korzenia rzeźpienia pospolitego (x 150)

Tab. 1. Zawartość procentowa garbników w ziele, owocach i korzeniach rzeźpienia pospolitego

Badany surowiec	Zawartość (%)	SD	RSD (%)
Ziele	10,54 ± 0,086	0,034	0,319
Owoce	7,14 ± 0,044	0,017	0,240
Korzenie	3,35 ± 0,148	0,058	1,723

SD (ang. *standard deviation*) – odchylenie standardowe;
RSD (ang. *relative standard deviation*) – względne odchylenie standardowe

Analiza TLC garbników

Wyodrębnione frakcje garbników poddano badaniu chromatograficznemu metodą TLC, stosując różne fazy stacjonarne oraz układy elucyjne. Najlepszy rozdział analizowanych ekstraktów otrzymano w układzie Si60F₂₅₄; toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy (5 + 4 + 1, v/v) (ryc. 16). Wartości współczynników R_f zebrano w tabeli 2.

Na rycinie 17 przedstawiono wyniki analizy rozdziału garbników z zieleń, owoców i korzeni rzeźpienia pospolitego w układzie Si60F₂₅₄; toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy (5 + 4 + 1, v/v/v). Chromatogram oglądano w świetle widzialnym po wywołaniu zdiadowanym kwasem sulfanilowym i 20% Na₂CO₃. Wartości współczynników R_f przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 2. Wyniki rozdziału TLC frakcji garbników zawartych w ziele i owocach rzepienia pospolitego *Xanthium strumarium* L. w układzie Si60F₂₅₄: toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy, 5 + 4 + 1 (v/v)

Wzorce i badane surowce	Numer plamy	Wartość R _f
Kwas kawowy	1	0,33
Kwas chlorogenowy	2	0,03
Kwas galusowy	3	0,23
Kwas elagowy	4	0,20
Owoce	A1	0,05
	A2	0,33
	A3	0,40
Owoce po hydrolizie kwasowej	B1	0,03
	B2	0,13
	B3	0,19
	B4	0,26
	B5	0,33
	B6	0,40
Ziele	C1	0,05
	C2	0,23
	C3	0,29
	C4	0,33
	C5	0,40
Ziele po hydrolizie kwasowej	D1	0,01
	D2	0,26
	D3	0,33
	D4	0,40

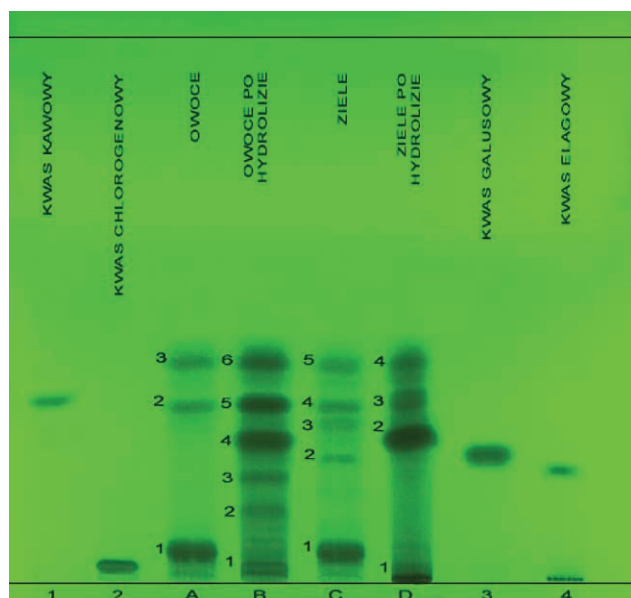
Na podstawie wartości R_f badanych ekstraktów stwierdzono obecność kwasu kawowego i galusowego we wszystkich badanych wyciągach. Ponadto zidentyfikowano kwas chlorogenowy w wyciągu z ziele i owoców po hydrolizie kwasowej.

Przeprowadzono również analizę garbników metodą TLC w układzie Si60G: octan etylu-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda, 100 + 11 + 11 + 27 (v/v). Przykładowy wideoskan chromatogramu TLC przedstawiono na rycinie 18, a wartości R_f zestawiono w tabeli 4.

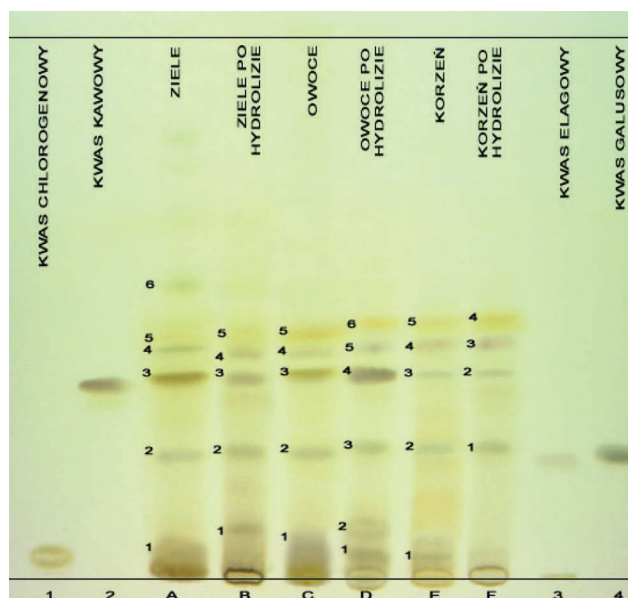
Na podstawie analizy TLC w układzie Si60G: octan etylu-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda, 100 + 11 + 11 + 27 (v/v) potwierdzono występowanie kwasów: kawowego, galusowego, ferulowego oraz chlorogenowego w badanych wyciągach.

Tab. 3. Wyniki rozdziału TLC frakcji garbników zawartych w ziele, owocach i korzeniach rzepienia pospolitego w układzie Si60F₂₅₄: toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy, 5 + 4 + 1 (v/v)

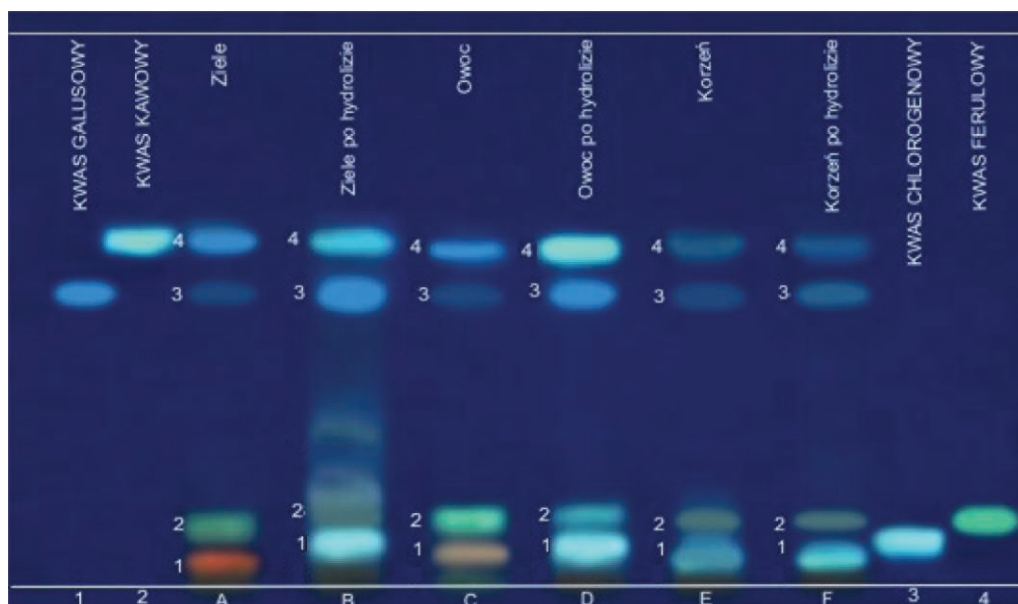
Wzorce i badane surowce	Numer plamy	Wartość R _f
Kwas kawowy	1	0,35
Kwas chlorogenowy	2	0,03
Kwas galusowy	3	0,23
Kwas elagowy	4	0,20
Ziele	A1	0,05
	A2	0,23
	A3	0,35
	A4	0,42
	A5	0,45
	A6	0,53
Ziele po hydrolizie kwasowej	B1	0,09
	B2	0,23
	B3	0,36
	B4	0,41
	B5	0,44
Owoce	C1	0,06
	C2	0,23
	C3	0,35
	C4	0,41
	C5	0,45
Owoce po hydrolizie kwasowej	D1	0,03
	D2	0,10
	D3	0,23
	D4	0,35
	D5	0,42
	D6	0,45
Korzenie	E1	0,05
	E2	0,23
	E3	0,35
	E4	0,42
	E5	0,45
Korzenie po hydrolizie kwasowej	F1	0,23
	F2	0,35
	F3	0,42
	F4	0,45



Ryc. 16. Wideoskan chromatogramu frakcji garbników zawierających fenolokwasy przed hydrolizą i po hydrolizie kwasowej w ziele i owocach rzepienia pospolitego, w układzie Si60F₂₅₄; toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy, 5 + 4 + 1 (v/v) obserwowany przy długości fali $\lambda = 254$ nm



Ryc. 17. Wideoskan chromatogramu frakcji garbników zawierających fenolokwasy przed hydrolizą i po hydrolizie kwasowej w ziele, owocach i korzeniach rzepienia pospolitego w układzie Si60F₂₅₄; toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy, 5 + 4 + 1 (v/v/v); oglądany w świetle widzialnym po wywołaniu zdiazowanym kwasem sulfanilowym i 20% Na₂CO₃



Ryc. 18. Wideoskan chromatogramu frakcji garbników zawierających kwasy fenolowe przed hydrolizą i po hydrolizie z ziela, owoców i korzeni rzepienia pospolitego w układzie Si60G; octan etylu-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda, 100 + 11 + 11 + 27 (v/v)

Analiza frakcji garbników metodą HPLC

Wyciągi metanolowe frakcji garbnikowej po uprzednim oczyszczeniu metodą SPE poddano analizie HPLC. Badania pozwoliły na rozdział i identyfikację kwasów fenolowych uzyskanych po hydrolizie kwasowej frakcji garbnikowej. Średnie czasy retencji dla wzorców i odpowiednich kwasów fenolowych w badanych surowcach zestawiono w tabeli 5. Na ry-

cinie 19 przedstawiono chromatogramy HPLC frakcji garbników występujących w ziele, owocach i korzeniach *Xanthium strumarium* L.

Jak wynika z ryciny 19, analiza HPLC frakcji garbnikowej wyciągów z ziela, owoców i korzeni wykazała obecność następujących kwasów: galusowego, kawowego, protokatechowego, syringowego, chlorogenowego, ferulowego oraz wanilinowego. W największej

Tab. 4. Wyniki rozdziału TLC frakcji garbników z ziela, owoców i korzeni rzepienia pospolitego w układzie Si60G: octan etylu-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda, 100 + 11 + 11 + 27 (v/v)

Wzorce i badane frakcje	Nr plamy	R _f	Zidentyfikowane związki
Kwas galusowy	1	0,54	–
Kwas kawowy	2	0,62	–
Kwas chlorogenowy	3	0,09	–
Kwas ferulowy	4	0,12	–
Ziele	A1	0,03	–
	A2	0,10	Kwas ferulowy
	A3	0,53	Kwas galusowy
	A4	0,60	Kwas kawowy
Ziele po hydrolizie kwasowej	B1	0,10	Kwas chlorogenowy
	B2	0,12	Kwas ferulowy
	B3	0,55	Kwas galusowy
	B4	0,61	Kwas kawowy
Owoc	C1	0,05	–
	C2	0,13	Kwas ferulowy
	C3	0,51	Kwas galusowy
	C4	0,63	Kwas kawowy
Owoc po hydrolizie kwasowej	D1	0,07	Kwas chlorogenowy
	D2	0,11	Kwas ferulowy
	D3	0,51	Kwas galusowy
	D4	0,60	Kwas kawowy
Korzenie	E1	0,06	Kwas chlorogenowy
	E2	0,10	Kwas ferulowy
	E3	0,49	Kwas galusowy
	E4	0,61	Kwas kawowy
Korzenie po hydrolizie kwasowej	F1	0,05	Kwas chlorogenowy
	F2	0,12	Kwas ferulowy
	F3	0,51	Kwas galusowy
	F4	0,63	Kwas kawowy

ilości we wszystkich badanych wyciągach występowały kwasy chlorogenowy i kawowy, w mniejszej ilości kwasy ferulowy i wanilinowy.

Dyskusja

Pierwsze publikacje na temat *Xanthium strumarium* L. pochodzą z lat 30. XX wieku i traktują go jako pospolity chwast o właściwościach leczniczych (27, 28).

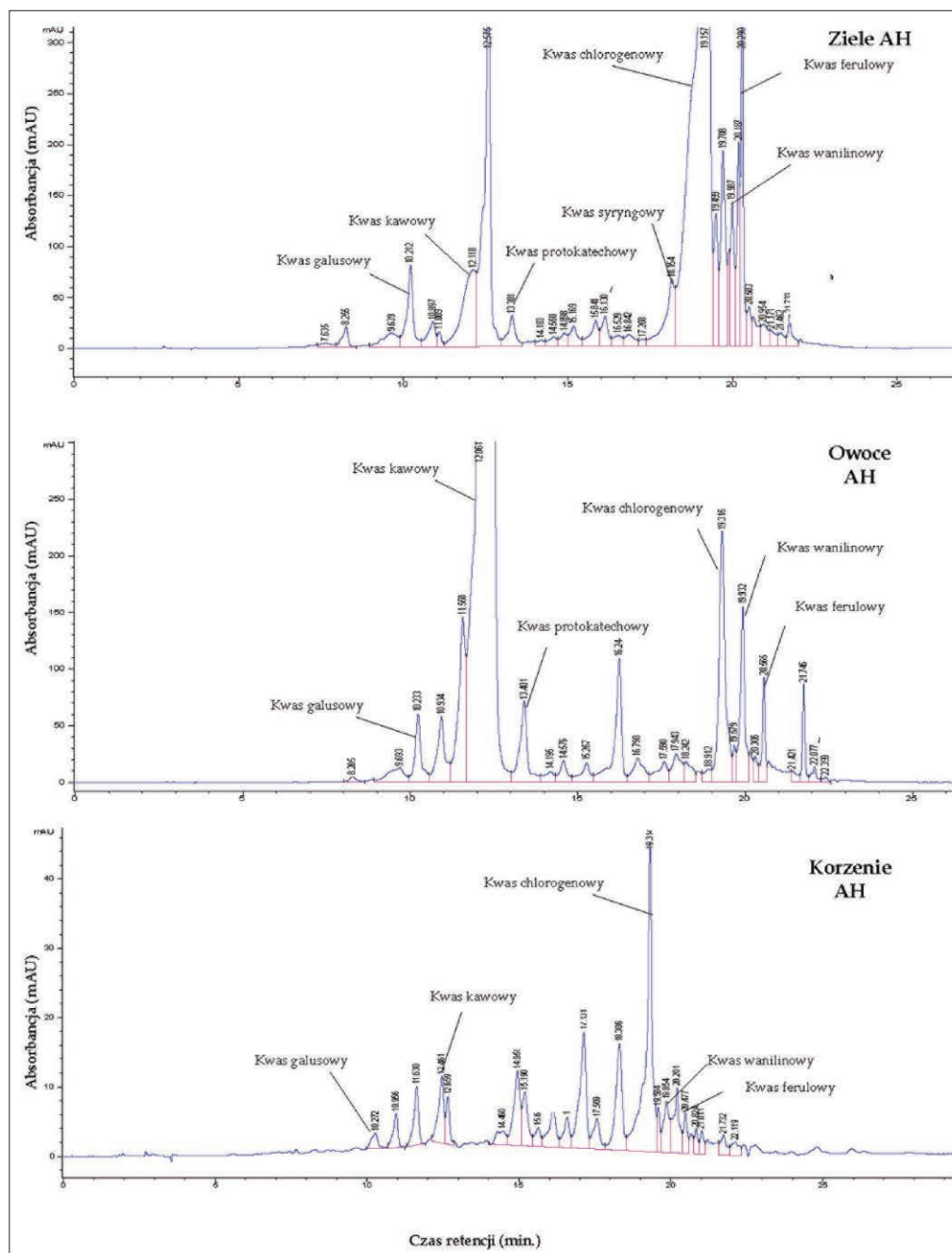
Jak podaje piśmiennictwo (29), wewnętrzne struktury wydzielnicze w rodzinie *Asteraceae* są szeroko rozpowszechnione i występują w postaci kanałów o nieokreślonej długości. Wśród różnych przedstawicieli tej rodziny opisywano obecność jednego systemu przewodów z określoną wydzieliną (30, 31). Polit i wsp. (31) w różnych organach *Tagetes patula* stwierdzili przewody zawierające czerwoną wydzielinę.

Natomiast Lersten i Curtis (29, 32) opisali w gatunku *Ambrosia trifida* podwójny system przewodów występujących w organach wegetatywnych i kwiatach tego taksonu. Jeden typ przewodów charakteryzował się czerwoną barwą wydzieliny i zawierał poliacetyleny, drugi gromadził bezbarwne olejki eteryczne.

W rodzinie *Asteraceae* stwierdzono dużą różnorodność produktów wydzielniczych. Charakterystycznymi związkami dla tej rodziny są laktony seskwiterpenowe (33), które mogą być składnikami olejków. Na

podstawie dotychczasowych wyników badań można sądzić, że przewody wydzielnicze zawierają olejki eteryczne lub balsamy, które według Kohlmünzera (34) stanowią roztwory żywicy w olejku eterycznym.

Anatomia korzeni rzepienia zajmowali się Dasgupta i Kundu (35), nie stwierdzili oni jednak obecności żadnych struktur wydzielniczych (przewodów olejkowych). Natomiast Maksymowych i Ledbetter (30) badali *Xanthium pensylvanicum* (*Xanthium strumarium* L.) i wykazali występowanie w rzepieniu jednego



Ryc. 19. Chromatogramy HPLC frakcji garbnikowej zawierające fenolokwasy przed hydrolizą i po hydrolizie z ziela, owoców i korzeni rzepienia pospolitego

Tab. 5. Zestawienie średnich czasów retencji dla wzorców i odpowiednich fenolokwasów występujących we frakcji garbnikowej badanych surowców

Wzorzec	Średni czas retencji (min)			
	Wzorzec	Ziele	Owoc	Korzeń
Kwas galusowy	10,26	10,21	10,23	10,27
Kwas kawowy	12,12	12,12	12,06	12,21
Kwas protokatechowy	13,35	13,30	13,40	–
Kwas syringowy	18,20	18,15	–	–
Kwas chlorogenowy	19,33	19,16	19,16	19,31
Kwas wanilinowy	19,85	19,99	19,93	19,84
Kwas ferulowy	20,57	20,29	20,57	20,48

systemu przewodów wydzielniczych zawierających epitel z określoną wydzieliną. Budową anatomiczną łądygi zajmowali się Śliwiński i Salisbury (36), którzy stwierdzili obecność wiązek przewodzących i innych struktur anatomicznych, nie wykazując obecności kanałów wydzielniczych występujących w przekroju poprzecznym łądygi *Xanthium strumarium* L.

Ta rozbieżność wyników, jak i informacje, że rodzina *Asteraceae* charakteryzuje się dużą różnorodnością produktów wydzielniczych, skłoniła nas do podjęcia systematycznych badań nad anatomią łądygi i liści oraz korzeni *Xanthium strumarium* L. Jak wynika z tych badań, w łądydze występuje warstwa parenchymy, w której w korze pierwotnej są umieszczone niewielkie kanały wydzielnicze, tworzące dwa pierścienie: zewnętrzny położony bliżej kolenchymy i wewnętrzny w sąsiedztwie endodermy. Kanał wydzielniczy ograniczony jest jedną warstwą epitelu wydzielniczego, a wokół otaczają go komórki miększu różnej wielkości. Z badań anatomicznych liścia wynika, że występują w nim wiązki przewodzące oraz masywne włoski mechaniczne, które mogą zawierać wydzielinę. Jak wynika z przekroju anatomii korzenia, osiągnął on budowę wtórną i ma silnie rozwinięty ksylem wtórny położony w centralnej części organu. Ksylem otoczony jest warstwą łyka, korą wtórną i parenchymą. Kora wtórna zbudowana jest z 4-5 warstw parenchymy. W wewnętrznych warstwach kory rozmieszczone są kanały wydzielnicze różnej wielkości, otoczone przez jedną lub dwie warstwy epitelu wydzielniczego. W niektórych kanałach wydzielniczych obserwowano brązową wydzielinę wyściełającą światło kanałów lub występującą w postaci kropeł.

Jak podaje piśmiennictwo (37-46), w *Xanthium strumarium* L. wśród głównych grup metabolitów wtórnych stwierdzono obecność garbników. Ma i wsp. (47) oraz Pashchenko i Pivenko (48) stwierdzili, że rzepień

pospolity jest surowcem bogatym w związki polifenolowe. Autorzy wyizolowali z tego surowca grupę związków będących pochodnymi kawolidów.

Badania własne obejmowały oznaczanie ilościowe procentowej zawartości garbników w badanych surowcach. Najwyższą zawartość tej grupy związków stwierdzono dla ziela (10,54%), nieco mniej zawierały owoce (7,14%), a najmniej korzeń (3,35%). Badaniom chromatograficznym TLC i HPLC poddano frakcje garbników, w których badano obecność wolnych kwasów fenolowych przed hydrolizą i po hydrolizie kwasowej. W wyniku badań TLC stwierdzono obecność kwasu kawowego i galusowego we wszystkich badanych wyciągach z rzepienia pospolitego, przy czym frakcja po hydrolizie zawierała większe ilości tych związków. Analiza HPLC potwierdziła wyniki badań TLC i wykazała ponadto występowanie kwasów protokatechowego, syringowego oraz wanilinowego. Z powyższych badań wynika, że garbniki występujące w rzepieniu pospolitym należą do garbników hydrolizujących, tj. galotanin i kawolidów.

Wnioski

- Po raz pierwszy w badanym surowcu przeprowadzono systematyczne badania anatomiczne łądyg, liści i korzeni. Wykazano, że we wszystkich badanych organach występują struktury wydzielnicze w postaci kanałów, wiązek przewodzących oraz włosków. W kanałach tych występuje wydzielina. W łądydze obserwowano niewielkie kanały wydzielnicze, które tworzą dwa pierścienie: zewnętrzny i wewnętrzny. W korzeniach kanały wydzielnicze występują w korze wtórnej.
- Wyniki analizy garbników w badanych organach *Xanthium strumarium* L. przedstawiają się następująco: najwyższą zawartość procentową wykazuje ziele – 10,54%, a następnie owoce – 7,14% i korzenie – 3,35%.

3. Analiza TLC pozwoliła na stwierdzenie obecności kwasów kawowego, galusowego i ferulowego we wszystkich badanych wyciągach, a ponadto zidentyfikowanie kwasu chlorogenowego w wyciągach z ziela, owoców i korzeni po hydrolizie kwasowej. Analiza HPLC frakcji garbnikowej po hydrolizie wyciągów z ziela, owoców i korzeni wykazała obecność następujących kwasów fenolowych w ziele: galusowego, kawowego, protokatechowego, syringowego, chlorogenowego, wanilinowego i ferulowego; w owocach: galusowego, kawowego, protokatechowego, chlorogenowego, ferulowego oraz wanilinowego; w korzeniach: galusowego, kawowego, chlorogenowego, ferulowego i wanilinowego.

Piśmiennictwo

1. Wolski T, Zwolan W, Lewandowska A. Rzepień pospolity (*Xanthium strumarium* L.) – surowiec zielarski o wielokierunkowym działaniu farmakologicznym. Analiza fitochemiczna związków fenolowych. Post Fitoter 2006; 3:118-30.
2. Wolski T, Zwolan W, Baj T i wsp. Rzepień pospolity (*Xanthium strumarium* L.) – analiza fitochemiczna steroli i triterpenów. Post Fitoter 2006; 4:170-82.
3. Wolski T, Baj T, Główniak K i wsp. Rzepień pospolity (*Xanthium strumarium* L.) – analiza i skład olejku eterycznego. Post Fitoter 2009; 3:152-67.
4. Tymrakiewicz W. Atlas chwastów. PWRiL, Warszawa 1962; 33.
5. Tacik T. Flora polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych. Tom 12. PWN, Warszawa 1971.
6. Szafer W. Opisy i klucze do oznaczania wszystkich gatunków roślin naczyniowych rosnących w Polsce. PWN, Warszawa 1988; 674-5.
7. Broda B. Zarys botaniki farmaceutycznej. PZWL, Warszawa 1998.
8. Rutkowski L. Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej. PWN, Warszawa 1998.
9. Pitcher D. Element stewardship abstract for *Xanthium spinosum* spiny cocklebur. 2001, <http://www.conserveonline.org/2001/05/d/en/xantspi.pdf>.
10. Fijałkowski D. Flora roślin naczyniowych Lubelszczyzny. Tom 1. LTN, Lublin 1994; 227.
11. Fijałkowski D. Flora roślin naczyniowych Lubelszczyzny. Tom 2. LTN, Lublin 1995; 612.
12. Broda B. Metody histochemii roślinnej. PZWL, Warszawa 1971; 245.
13. Wolski T, Baj T. Biologia wzrostu i rozwoju dwu odmian dyptamu jesionolistnego (*Dictamnus albus* L. cv. *Albiflores* i cv. *Rosa Purple*) oraz budowa anatomiczno-morfologiczna struktur wydzielniczych, skład olejku eterycznego i analiza ekstraktu. Post Fitoter 2015; 1:21-36.
14. Jerzmanowska Z. Substancje roślinne, metody wyodrębniania. Tom 1. PWN, Warszawa, 1970; 43-71.
15. Farmakopea Polska IV. PZWL, Warszawa 1970.
16. Borkowski B, Miłkowska K. Garbniki, tanoidy i związki pokrewne. III. Elagotaniny. Herba Pol 1996; 43(2):118-26.
17. Borkowski B, Miłkowska K. Garbniki, tanoidy i związki pokrewne. IV. Kawolidy. Herba Pol 1996; 42(3):174-82.
18. Borkowski B, Miłkowska K. Garbniki skondensowane. Herba Pol 1997; 43(1):73-97.
19. Borkowski B (red.). Zarys farmakognozji. PZWL, Warszawa 1970.
20. Farmakopea Polska VI. PTFarm, Warszawa 2002.
21. Strzelecka H, Kamińska J, Kowalski J, Walewska E. Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych. PZWL, Warszawa 1987.
22. Borkowski B (red.). Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej. PZWL, Warszawa 1973; 234.
23. Lewandowska A. Analiza związków fenolowych występujących w rzepieniu pospolitym (*Xanthium strumarium* L.) ze szczególnym uwzględnieniem flawonoidów i garbników. Praca magisterska, AM w Lublinie 2006.
24. Główniak K, Zgórka G, Dragan T. Zastosowanie metody SPE-HPLC do rozdziału i oznaczenia fenolokwasów w wyciągach i preparatach jeżówki (*Echinacea* sp.). Farm Pol 1993; 20:28-33.
25. Nollet LML (ed.). Food Analysis by HPLC. Marcel Dekker, New York 2002.
26. Brandsteterova E, Ziakova-Caniova A. Phenolic acids in natural plants: Analysis by HPLC. Encyclopedia of Chromatography, CRC Press 2005.
27. Davis WE. The development of dormancy in seed of cocklebur (*Xanthium*). Am J Bot 1930; 2:56-9.
28. Zjemliński SE. Lekarstwiennye Rastienija. MOIP, Moskwa 1949.
29. Lersten NR, Curtis JD. Secretory reservoirs (duct) development in *Ambrosia trifida* (*Asteraceae*) staminate flowers. Am J Bot 1988; 76(7):1313-23.
30. Maksymowych R, Ledbetter MC. Fine structure of epithelial canal cell in petioles of *Xanthium pensylvanicum*. Am J Bot 1987; 74:65-73.
31. Polit F, Sacchetti G, Bruni A. Distribution of internal secretory structures in *Tagetes patula* (*Asteraceae*). Nord J Bot 1995; 15:197-205.
32. Lersten NR, Curtis JD. Polyacetylene reservoir (duct) development in *Ambrosia trifida* (*Asteraceae*) staminate flowers. Am J Bot 1989; 74:65-73.
33. Seaman FC. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in *Asteraceae*. Bot Rev 1982; 48:121-595.
34. Kohlmünzer S. Farmakognozja. PZWL, Warszawa 2000.
35. Dasgupta J, Kundu BC. Pharmacognostic studies of *Xanthium strumarium* Linn. root. Planta Med 1963; 11:470-8.
36. Śliwiński E, Salisbury FB. Cross-section through an internodium of a *Xanthium strumarium* (Burweed) shoot. 2003, <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e06/rastxant.htm>.
37. Khafagy SM, Sabry NN, Metwally AM, el-Naggar SF. Phytochemical investigation of *Xanthium strumarium*. Planta Med 1974; 26(1):75-8.
38. Pitcher D. The Nature Conservancy Element Stewardship Abstract For *Xanthium strumarium*. 1989, <http://www.conserveonline.org/2001/05/d/en/xantstr.pdf>.
39. Mowszowicz J. Przewodnik do oznaczania krajowych roślin zielarskich. PWRiL, Warszawa 1983; 397-8.
40. Mowszowicz J. Krajowe chwasty polne i ogrodowe. Przewodnik do oznaczania. PWRiL, Warszawa 1986.
41. Świejkowski L. Rośliny lecznicze i przemysłowe. Klucz do oznaczania. WRW, Libra, Warszawa 1990; 439.
42. Lee JM. Common Cocklebur. *Xanthium strumarium*. Iowa State University, Agronomy Department – Weed Species reports. 1996, <http://www.agron.iastate.edu/weed/WeedBiolLibrary/u4cocklel.html>.
43. Broda B, Mowszowicz J. Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych. PZWL, Warszawa 2000; 693-4.
44. Lloyd S. Bathurst burr. Farmnote. Department of Agriculture, Western Australia 2000, <http://www.agric.wa.gov.au/agency/Pubns/farmnote/2000/fo4100.html>.
45. Sarwa AJ. Wielki leksykon roślin leczniczych. Wyd. Książka i Wiedza, Warszawa 2001; 386-7.
46. Smith AH, Zoetendal E, Mackie RI. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. Microb Ecol 2005; 50:197-205.
47. Ma YT, Huang MC, Hsu F, Chang H. Thianezidione from *Xanthium strumarium*. Phytochem 1998; 48(6):1083-5.
48. Pashchenko MM, Pivenko GP. Polyphenol substances in *Xanthium riparium* and *Xanthium strumarium*. Farm Zh 1970; 25(6):41-3.

Adres/address:

*prof. dr hab. n. farm. Tadeusz Wolski
Katedra i Zakład Farmakognozji
z Pracownią Roślin Leczniczych
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin
tel. +48 (81) 742-38-09
e-mail: apteka712@wp.pl

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

otrzymano/received: 15.10.2015

zaakceptowano/accepted: 20.11.2015