

\*Aleksandra Wawro<sup>1</sup>, Dominika Pieprzyk-Kokocha<sup>1</sup>, Agnieszka Gryszczyńska<sup>2</sup>, Katarzyna Grajek<sup>1</sup>, Zdzisław Łowicki<sup>2</sup>

## Oznaczenie zawartości substancji biologicznie aktywnych w ekstraktach wodnych z liści i pędów morwy białej

<sup>1</sup>Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Kierownik Zakładu: dr Dorota Wesolek, prof. nadzw. IWNiRZ

<sup>2</sup>Zakład Farmakologii i Fitochemii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz

---

### DETERMINATION OF THE CONTENT OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN WATER EXTRACTS OF THE LEAVES AND SHOOTS WHITE MULBERRY

#### SUMMARY

**Introduction.** White mulberry (*Morus alba* L.) grows in the form of trees and shrubs. It comes mainly from China. Mulberry contains substantial quantities of biologically active substances. Antioxidants, which are included in the mulberry prevent many lifestyle diseases such as obesity, diabetes, cancer.

**Aim.** The aim of the study was to determine the content of various biologically active substances in the leaves and stems of the white mulberry (*Morus alba* L.) which were carried out on the aqueous extracts prepared from powdered mulberry elements using high performance liquid chromatography (HPLC).

**Material and methods.** The materials used in the study were: green leaves and stems of annuals white mulberry (Experimental Farm INF&MP).

**Results.** The study showed that aqueous extracts of mulberry are quercetin, rutin, vitexin, isovitexin, chlorogenic and rosmarinic acid, luteolin, apigenin and hyperoside. Bioactive substances which occurred in the largest quantities are: chlorogenic acid, then hyperoside and vitexin and rutin.

**Conclusions.** Stems of white mulberry (*Morus alba* L.) is characterized by a higher content of biologically active substances than the leaves.

---

KEYWORDS: WHITE MULBERRY – FLAVONOIDS – PHENOLIC ACIDS – HPLC

---

### Wprowadzenie

Morwa rośnie w formie drzew lub krzewów. Pochodzi ona głównie z Chin, gdzie przez wieki była uprawiana. Do Polski została sprowadzona w XVII w. i występuje tu tylko jeden gatunek – morwa biała (*Morus alba* L.). Jest to roślina wieloletnia, szeroko rozpowszechniona w świecie, a więc łatwo

przystosowująca się do różnorodnych warunków klimatycznych. Morwa ze względu na swoje pochodzenie jest dość wrażliwa na zmiany temperatury. Wilgotność powietrza w naszym klimacie i opady są wystarczające dla uprawy morwy (1).

Morwa biała zawiera znaczne ilości składników bioaktywnych, w tym przeciwutleniaczy, dlatego już od dawna była wykorzystywana w medycynie ludowej Dalekiego Wschodu.

Współczesna nauka potwierdza wcześniejsze obserwacje i przedstawia dowody na to, że związki przeciwutleniające zawarte w morwie białej zapobiegają wielu chorobom cywilizacyjnym, takim jak miażdżyca, cukrzyca, otyłość czy choroby nowotworowe.

Jedną z wartościowych odmian morwy jest odmiana Wielkolistna Żółwińska. Odmiana ta jest wynikiem prac badawczych i hodowlanych dawnego Zakładu Badawczego Jedwabiu Naturalnego – obecnego Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu. Została ona wyhodowana przede wszystkim na potrzeby karmienia jedwabników morwowych i jest przystosowana do polskich warunków klimatycznych. Charakteryzuje się dobrymi właściwościami odżywczymi oraz okazałymi, kształtnymi liśćmi i dużym przyrostem biomasy (2).

Dane piśmiennictwa mówią o dużej zawartości związków bioaktywnych w morwie, jednak jak do tej pory nie scharakteryzowano pod tym względem odmiany Wielkolistnej Żółwińskiej.

### Cel pracy

Celem niniejszej pracy było oznaczenie zawartości substancji biologicznie aktywnych w ekstraktach wodnych otrzymanych z liści i pędów morwy białej, odmiany Wielkolistnej Żółwińskiej.

## Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły wysuszone zielone liście oraz pędy jednoroczne morwy białej odmiany Wielkolista Żółwińska zebrane w lipcu 2010 roku na terenie Zakładu Doświadczalnego Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Pętkowie. Fragmenty rośliny rozdrobniono w uniwersalnym młynku tnącym Pulverisette 19; sito 0,25 mm. Sproszkowane liście poddawano jednokrotnej ekstrakcji. Materiał zaparzano wrzącą wodą redestylowaną i poddawano wytrząsaniu w czasie półtorej godziny. Zawiesinę przesączało na lejkach piankowych G-0, a następnie przesączało zamrażano (temp.  $-50^{\circ}\text{C}$ ) i liofilizowano (ciśnienie  $< 0,5$  hPa).

W tak otrzymanych ekstraktach oznaczano wybrane polifenole przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analizę fitochemiczną prowadzono za pomocą zwalidowanych metod własnych IWNiRZ. Zastosowano następujące warunki chromatograficzne: detektor DAD, kolumnę Nucleosis C18 150,0 x 4,0 mm x 3,0  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{l}$ ; temp. kolumny:  $30^{\circ}\text{C}$ ; detekcję dla izowiteksyny, witeksyny, luteoliny prowadzono przy długości fali  $\lambda = 350$  nm, dla hiperozydu i apigeniny  $\lambda = 210$  nm, dla rutyny –  $\lambda = 360$  nm, a dla kwercetyny przy długości fali  $\lambda = 370$  nm. Podczas oznaczania kwasu rozmarynowego i kwasu chlorogenowego zmieniono skład fazy ruchomej następująco:

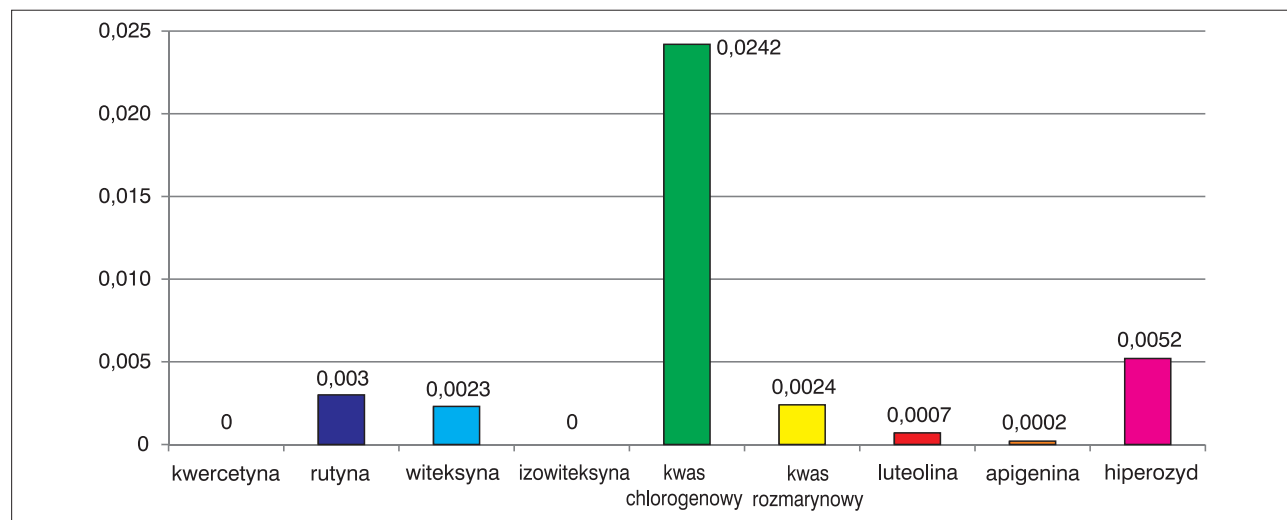
faza ruchoma A – kwas fosforowy: woda 1:999 (v/v); faza ruchoma B – acetonitryl oraz szybkość przepływu 0,8 ml/min, objętość nastrzyku 10  $\mu\text{l}$ ; temp. kolumny wynosiła  $40^{\circ}\text{C}$ . Detekcję dla kwasu rozmarynowego prowadzono przy długości fali  $\lambda = 205$  nm, a dla kwasu chlorogenowego –  $\lambda = 330$  nm.

Wyniki wyrażano w postaci zawartości procentowej poszczególnych związków w wyciągach i przedstawiano 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 zweryfikowania hipotez zerowych dla przeprowadzonych analiz zawartości składników bioaktywnych uzyskanych metodą HPLC wykonano dwuczynnikową analizę wariancji dla układu czynników, na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ , wykorzystując program Statistica v. 8. Uprzednio dane wyrażone w procentach poddano transformacji według formuły Bliss  $y = \arcsin \sqrt{p}$  (3). Dla analiz istotnych statystycznie, w celu ustalenia grup podobnych pod względem badanego czynnika, wykonano test post-hoc HDS Tukeya ( $\alpha = 0,05$ ).

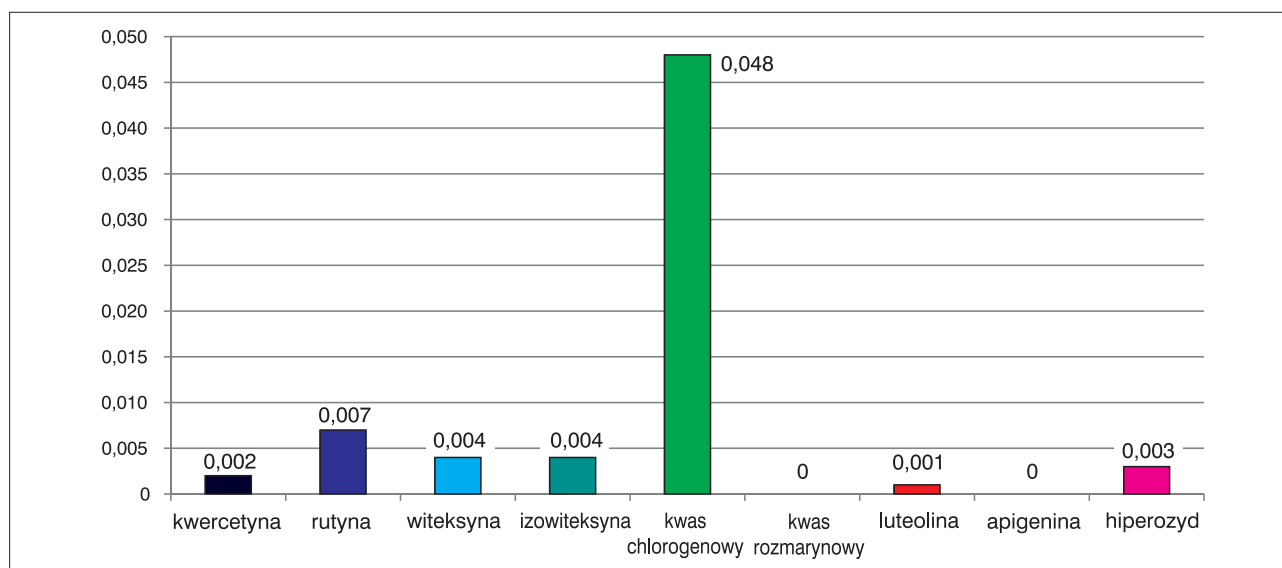
## Wyniki i dyskusja

Zawartość procentowa poszczególnych składników wahała się 0 do 0,048%. Wyniki zamieszczone na rycinach 1 i 2 wskazują, że zielone części morwy zawierają duże ilości kwasu chlorogenowego sięgające ponad 0,02%. Pod względem ilościowym wyróżniają się także hiperozyd, witeksyna oraz kwas rozmarynowy i rutyna.

Składniki te mają zgodnie z piśmiennictwem duże znaczenie w profilaktyce chorób cywilizacyjnych (4).



Ryc. 1. Zawartość procentowa poszczególnych substancji biologicznie aktywnej w ekstraktach wodnych z liści morwy białej odmiany Wielkolista Żółwińska



Ryc. 2. Zawartość procentowa poszczególnych substancji biologicznie aktywnych w ekstraktach wodnych z pędów morwy białej odmiany Wielkolista Żółwińska

Kwas chlorogenowy w przewodzie pokarmowym człowieka obniża wchłanianie cukrów, dzięki czemu organizm aktywniej czerpie energię ze zgromadzonych zapasów. Zwiększa również wrażliwość komórek na insulinę. Jest silnym przeciwutleniaczem. Hiperozyd jest flawonolem działającym wazochronnie, hipotensyjnie (obniża ciśnienie tętnicze krwi), moczopędnie, przeciwzapalnie, przeciwalergicznie i przeciwmiażdżycowo. Poprawia krążenie krwi i zapobiega zakrzepom. Witeksyna jest glikozydem apigeniny (flawonem), który ma duże znaczenie farmakologiczne, gdyż poprawia przepływ wieńcowy. Zaliczana jest do łagodnych leków nasercowych. Ze względu na małą toksyczność może być bezpiecznie stosowana przez dłuższy czas. Kwas rozmarynowy to fenolokwas o bogatych właściwościach przeciwwirusowych, przeciwbakteryjnych i przeciwzapalnych. Rutyna należy do przeciwutleniaczy, stanowi czynnik

przeciwnowotworowy, przeciwzapalny, cytoochronny i wazochronny. Odznacza się właściwością chelatowania metali, a także jest inhibitorem peroksydacji lipidów (5-7).

Analiza wariancji dowodzi, że istnieją wysoce istotne statystyczne różnice pomiędzy zawartością substancji biologicznie aktywnych w badanym materiale. Zaobserwowano różnice w zawartości związków w częściach morwy białej ((CR) – liście, pędy), ilości substancji biologicznie aktywnych (SBA), a także zaobserwowano wysoce statystycznie istotną interakcję poddanych analizie czynników (CR × SBA) (tab. 1).

Grupowanie wykonane za pomocą testu post-hoc HDS Tukeya na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ , w celu ustalenia grup jednorodnych pod względem zawartości badanych substancji, przedstawia tabela 2. Dwie rozdzielne grupy (A i B), o najwyższej zawartości

Tab. 1. Wyniki analizy wariancji ANOVA dla układów czynnikowych, istotności poziomu zawartości substancji biologicznie aktywnych w liściach i pędach morwy białej odmiany Wielkolista Żółwińska

Źródło wariancji	Stopnie swobody	Suma kwadratów	Średnia kwadratów	Wartość testu	Wartość prawdopodobieństwa
		SS	MS	F <sub>oblicz.</sub>	(p)
Część rośliny (liście, pędy) (CR)	1	0,13626	0,13626	48,971	0
Substancja biologicznie aktywna (SBA)	8	4,428752	0,553594	198,957	0
(CR)*(SBA)	8	0,504837	0,063105	22,679	0
Błąd	36	0,100169	0,002782		

**Tab. 2.** Średnia zawartość procentowa substancji biologicznie aktywnych w liściach i pędach morwy białej odmiany Wielkolistna Żółwińska

Część rośliny	Substancje biologicznie aktywne								
	kwercetyna	rutyna	witeksyna	izowiteksyna	kwask chlorogenowy	kwask rozmarynowy	luteolina	apigenina	hiperozyd
liście	0	0,003	0,0023	0	0,0242	0,0024	0,0007	0,0002	0,0052
	I	DEF	DEF	I	B	DEF	FGHI	GHI	CD
pędy	0,0015	0,0074	0,0043	0,0041	0,0479	0,0001	0,0009	0,0001	0,0027
	EFG	C	CDE	CDE	A	GHI	FGH	HI	DEF

Jednakowymi literami oznaczono w wierszach substancje biologicznie aktywne, nieróżniące się statystycznie (na poziomie  $\alpha = 0,05$ ) wg testu post-hoc HSD Tukeya

utworzył kwas chlorogenowy, przy czym w pędach uzyskano istotnie wyższą jego zawartość (blisko dwukrotnie). Również wyższą zawartość w pędach stwierdzono w przypadku rutyny, izowiteksyny i kwercetyny, jednakże różnice nie są duże, czego wyrazem jest utworzenie w teście HSD Tukeya grup nierozdzielnych. W trzech przypadkach (witeksyna, luteolina i apigenina) nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości substancji w pędach i liściach. W przypadku kwasu rozmarynowego i hiperozydu stwierdzono statystycznie istotne różnice w zawartości tych związków w liściach morwy białej.

### Wnioski

Badania wykazały, że liście i pędy morwy białej zawierają następujące flawonoidy: kwercetynę, rutynę, witeksynę, izowiteksynę, luteolinę, apigeninę i hiperozyd oraz fenolokwasy: kwas chlorogenowy i kwas rozmarynowy. Na podstawie otrzymanych wyników

można stwierdzić, że pędy morwy białej odmiany Wielkolistna Żółwińska charakteryzują się większą zawartością substancji biologicznie aktywnych w stosunku do liści.

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

### Piśmiennictwo

1. Pieprzyk-Kokocha D, Burczyk H. Uprawa morwy jako pokarmu dla jedwabników. *Zagadn Doradz Roln* 2005; 4(6):48.
2. Pieprzyk-Kokocha D, Burczyk H. Wznowienie chowu jedwabnika morwowego w Polsce. *Zagadn Doradz Roln* 2005; 4(5):44.
3. Kalla R. Statystyka dla przyrodników. AR, Poznań 2002.
4. Dudek-Makuch M, Gawron-Gzella A. Naturalne antyoksydanty w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. *Herba Pol* 2007; 53(2):143-4.
5. Kopacz M. Flawonoidy i ich zastosowanie. *Ofic Wyd Politech Rzeszowskiej* 2008; 64-7, 187-8.
6. Gawlik-Dzik U. Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności. *Żywn-Nauk Technol Jak* 2004; 4(41):29-40.
7. Grajek W (red.). *Przeciwutleniacze w żywności*. Wyd Nauk-Techn, Warszawa 2007; 141-244.

### Konflikt interesów

#### Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 10.12.2015

zaakceptowano/accepted: 19.02.2016

Adres/address:

mgr inż. Aleksandra Wawro

Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii

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