

*Marcin Szymański¹, Katarzyna Wojtyniak², Irena Matławska²

Badanie związków fenolowych w ziele serdecznika pospolitego

Study of phenolic compounds in Motherwort herb

¹Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Dyrektor Centrum: prof. dr hab. n. chem. Artur Stefankiewicz

²Katedra i Zakład Farmakognozji i Biomateriałów,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Judyta Cielecka-Piontek

SUMMARY

Introduction. Many health-promoting compounds have been identified in motherwort, including terpenes, flavonoids, phenolic acids, tannins, and others. Pharmacological studies have shown many possible applications in medicine. Extracts are used internally, primarily for nervous heart conditions and digestive disorders, as well as for bronchial asthma, menopausal symptoms, and amenorrhea. They are also used externally for wounds and skin inflammation.

Aim. Studies on the content of phenolic acids and flavonoids in extracts from the herb *Leonurus cardiaca* L. using various chromatographic methods.

Material and methods. The material for the study was crushed Motherwort herb purchased from a herbal store. Paper chromatography (PC), thin-layer chromatography (TLC), and ultra-performance liquid chromatography (UPLC) were used for qualitative analysis. Fractions obtained from the methanol-water extract were analyzed. The Arnova spectrophotometric method and the UPLC method were used for quantitative testing of phenolic acids, while the Christ-Müller spectrophotometric method was used to analyze flavonoid content.

Results. Caffeic acid, p-coumaric acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, ferulic acid, rosmarinic acid, and chlorogenic acid were identified in motherwort herb. The content of phenolic acids, calculated as caffeic acid, determined using the Arnova method, was $0.4160\% \pm 0.0032\%$. The content of individual phenolic acids determined by the UPLC method varied depending on the concentration of methanol used for extraction (20%, 50%, and 100%). The content of caffeic and ferulic acids was highest in extracts obtained from extraction with 20% methanol, while the content of chlorogenic and rosmarinic acids was highest in extracts obtained from extraction with 50% methanol. In all extracts, chlorogenic acid was the dominant compound in terms of quantity, while ferulic, caffeic, and rosmarinic acids were present in significantly smaller amounts. No p-hydroxybenzoic, p-coumaric, or vanillic acids were detected. The sum of phenolic acids determined by UPLC accounted for an average of approx. 30% of the sum of these compounds was determined by the Arnova method.

Conclusions. Chromatographic analysis revealed the presence of phenolic acids, which had not previously been described in motherwort (with the exception of chlorogenic and rosmarinic acids). The concentration of the solvent used for the extraction of the raw material affects the amount of phenolic acids determined in the extracts by UPLC. The studies identified the following flavonoids in the raw material: rutoside, hyperoside, isoquercitrin, and vitexin, whose presence in motherwort herb has already been confirmed in other studies.

Keywords: *Leonurus cardiaca* L., phenolic acids, flavonoids

STRESZCZENIE

Wstęp. W serdeczniku zidentyfikowano wiele prozdrowotnych związków, takich jak: terpeny, flawonoidy, kwasy fenolowe, garbniki i wiele innych. Badania farmakologiczne wykazały wiele zastosowań w medycynie, wyciągi wykorzystuje się wewnętrznie, głównie w nerwowych schorzeniach serca i zaburzeniach trawienia, a także w astmie oskrzelowej, objawach klimakterium i braku miesiączki oraz zewnętrznie w ranach i stanach zapalnych skóry.

Cel pracy. Badania zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów w wyciągach z zieleń *Leonurus cardiaca* L. różnymi metodami chromatograficznymi.

Materiał i metody. Materiał do badań stanowiło rozdrobnione ziele serdecznika zakupione w sklepie zielarskim. Do badań jakościowych zastosowano metodę chromatografii bibułowej (PC), cienkowarstwowej (TLC) i ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC). Analizowano frakcje otrzymane z wyciągu metanolowo-wodnego. Do badań ilościowych kwasów fenolowych wykorzystano metodę spektrofotometryczną Arnova i metodę UPLC, natomiast do analizy zawartości flawonoidów metodę spektrofotometryczną Christa-Müllera.

Wyniki. W ziele serdecznika zidentyfikowano kwas kawowy, p-kumarowy, p-hydroksybenzoesowy, wanilinowy, ferulowy, rozmarynowy i chlorogenowy. Zawartość kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy oznaczona metodą Arnova wynosiła $0,4160\% \pm 0,0032\%$. Zawartość poszczególnych kwasów fenolowych oznaczonych metodą UPLC była różna w zależności od stężenia metanolu użytego do ekstrakcji (20%, 50% i 100%). Zawartość kwasu kawowego i ferulowego była najwyższa w wyciągach uzyskanych z ekstrakcji 20% metanolem, natomiast kwasu chlorogenowego i rozmarynowego w wyciągach uzyskanych z ekstrakcji 50% metanolem. We wszystkich wyciągach kwas chlorogenowy dominował pod względem ilościowym, kwas ferulowy, kawowy i rozmarynowy występowały w znacznie mniejszych ilościach. Nie wykazano obecności kwasu p-hydroksybenzoesowego, p-kumarowego i wanilinowego. Suma kwasów fenolowych oznaczona metodą UPLC stanowiła średnio ok. 30% sumy tych związków oznaczonej metodą Arnova.

Wnioski. Analiza chromatograficzna wykazała obecność kwasów fenolowych, których wcześniej (z wyjątkiem kwasu chlorogenowego i rozmarynowego) nie opisywano w ziele serdecznika. Stężenie rozpuszczalnika zastosowanego do ekstrakcji surowca ma wpływ na ilość kwasów fenolowych oznaczonych w wyciągach metodą UPLC. Badania pozwoliły zidentyfikować w surowcu flawonoidy: rutozyd, hiperozyd, izokwercytrynę i witeksynę, których obecność w ziele serdecznika została już potwierdzona w innych badaniach.

Słowa kluczowe: *Leonurus cardiaca* L., kwasy fenolowe, flawonoidy

Wstęp

Gatunki z rodzaju *Leonurus* L. pochodzą prawdopodobnie z Syberii, skąd w średniowieczu zostały sprowadzone do Europy przez ludy azjatyckie, podczas ich wędrówek na zachód (1). Obszar występowania obejmuje całą Europę oraz zachodnią, środkową i północną Azję. Zostały również introdukowane w Ameryce Północnej (2, 3). W Polsce występuje gatunek *Leonurus cardiaca* L., czyli serdecznik pospolity, o synonimicznych nazwach *Leonurus campestris* Andrzej. ex Benth. i *Cardiaca vulgaris* Moench (4). Niektórzy autorzy utożsamiają odmianę villosus z gatunkiem *Leonurus quinquelobatus* Gilib. występującym głównie w Rosji (4, 5). Na Syberii spotkać można gatunek *Leonurus sibiricus* L., natomiast w Mongolii, Chinach, Japonii i na północy Kazachstanu oraz w innych częściach Azji – *Leonurus japonicus* Houtt. (*L. artemisia* (Lour.) S.Y. Hu, *L. heterophyllus* Sweet, *L. sibiricus* Anon.). Oba gatunki są ze sobą często mylone, a nazwy stosowane zamiennie. Mają one podobne działanie i zastosowanie do *Leonurus cardiaca* L. (5-7). Mniej znane gatunki, charakterystyczne dla danego regionu, to m.in.: *Leonurus tataricus* L. w Rosji, *Leonurus marrubiastrum* L. (syn. *Chaiturus marrubiastrum* (L.) Ehrh. ex Rchb.) w krajach położonych nad Dunajem, *Leonurus glaucescens* Bge. w Ukrainie i Kazachstanie (4, 5).

Serdecznik pospolity występuje w Polsce na całym niżu i pogórzu. Naturalnym siedliskiem są przydroża, rumowiska, suche pastwiska, a w szczególności stowiska słoneczne i bogate w wapń (8, 9).

Serdecznik pospolity jest byliną o krótkim, poziomym kłączu wytwarzającą wzniesione, rozgałęzione

lodygi dorastające do 150 cm. Są one sztywne, w środku puste, czterokanciaste, często czerwono-fioletowo nabiegłe. Liście ułożone są na łodydze równomiernie, po dwa naprzeciwległe. Dolne posiadają długie ogonki i mają budowę 5- lub 7-krotnie dłoniastosieczną, natomiast górne trójsieczną. Kwiaty dwuwargowe, siedzące, zebrane są w nibyokółki w kątach liści, na pędach głównych i bocznych. Ząbki kielichów (podkwiatki) są kłujące, trójkątne, skrzydlaste. Korona kwiatowa jest barwy białoróżowej, długości do 12 mm, z górną wargą silnie owłosioną. Owocem są jednonasienne rozłupki powstałe przez rozpad czterorozłupni. Na wszystkich częściach rośliny występują włoski okrywające, które nadają jej srebrzystą barwę. Kwitnie od czerwca do września (8-10).

W *Leonurus cardiaca* zidentyfikowano dotychczas: alkaloidy pirolidynowe (leonukardynę (11), stachydrynę (12), diastereoizomery 4-hydroksystachydryny: betonicynę i turycynę (4), pochodne guanidyny – leonurynę (13), aminę czwartorzędową – cholinę (4), irydoidy (ze świeżego zieleń serdecznika wyizolowano glukozyd C15-irydoidu (= ajugol = 4-dezoksyharpagid) (14), ajugozyd; galidrozyd i reptozyd (3), diterpeny (typu klerodanu (15), typu labdanu – leokardynę; typu prefuranolabdanu (16-18), typu prefuranolabdanu – leosibirycyna (19), triterpeny (kwas ursolowy, kwas oleanolowy (5,20,21), kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, rozmarynowy (4), glikozydy fenylopropanoidowe (lawandulifoliozyd i akteozyd) (22), flawonoidy (4-rutynozyd kwasu kawowego (reszta cukrowa złożona z ramnozy i glukozy) (23), O-glikozydy kwercetyny (rutozyd, hiperozyd, kwercytryna, izokwercytryna i 7-O-D-glukozyd kwercetyny,

kemferolu (astragalina) i apigeniny (7-O-D-glukozyd, 5-O-D-glukozyd i 4'-O-D-glukozyd), flawony (genkwanina (5,4'-dihydroksy-7-metoksyflawon), luteolina (5,7,3',4'-tetrahydroksyflawon) i pochodna apigeniny – kwinkwelozyd (4'-p-kumaroilo-7-glukozyloapigenina), C-glikozydy flawonoidowe (witeksynę i izowiteksynę) (24-26), garbniki (5), olejki eteryczne (germakren D, β -kariofilen, α -kariofilen = α -humulen, α -pinen) (27); seskwiterpeny (epicedrol, α -humulen, germakren D i spatulenol) oraz monoterypen: dehydro-1,8-cyneol (28), sterole (β -sitosterol i stigmasterol, stanowiły ponad 80% wszystkich związków z tej grupy) (29), glikozydy bufanolidowe (30, 31).

Ziele serdecznika, jak sugeruje nazwa gatunkowa rośliny – *cardiaca*, stosuje się tradycyjnie w chorobach serca. Najczęściej pojawiającym się w literaturze wskazaniem są problemy kardiologiczne o podłożu nerwowym oraz pomocniczo w nadczynności tarczycy (32). To zalecenie wynika z łagodzenia przez ziele serdecznika objawów towarzyszących hipertyreozie (takich jak palpacje serca i tachykardia) (6). Uważa się, że surowiec działa hipotensyjnie i wzmacniająco na serce, powoduje wzrost przepływu wieńcowego krwi oraz jest skutecznym środkiem uspokajającym w nerwowych i funkcjonalnych zaburzeniach pracy serca (3, 33-36). Działanie sedatywne przyrównywane jest do efektu wywołanego podaniem przetworów z korzenia kozłka lekarskiego (*Valeriana officinalis* L.) (33, 37). Surowiec stosuje się też tradycyjnie w schorzeniach ginekologicznych na tle nerwowym, szczególnie w łagodzeniu objawów związanych z okresem przekwitania, bolesnym miesiączkowaniem oraz jako środek pobudzający menstruację (*emmenagogum*) (32, 38). Działanie spazmolityczne na mięśnie gładkie przewodu pokarmowego pozwala na jego wykorzystanie w atonii jelit i związanych z tym zaburzeniach trawienia, wzdęciach, bólach brzucha i zaparciach nawykowych. Z drugiej strony ze względu na zawartość garbników działających ściągająco na błonę śluzową, ziele serdecznika stosowane jest w łagodnych biegunkach. Do użytku zewnętrznego na rany, otarcia naskórka, blizny i oparzenia zaleca się odwar z surowca w postaci okładów i obmywań z uwagi na słabe działanie przeciwbakteryjne i przyspieszające gojenie. W lecznictwie ludowym ziele serdecznika traktowane jest także jako lek moczopędny, hipoglikemizujący oraz przeciwpadaczkowy. Świeży sok wyciśnięty z młodych kwitnących wierzchołków pędowych ma być skuteczniejszy od naparu i nalewki (1, 9, 39).

Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* na zwierzętach wykazały działanie: antyoksydacyjne (26, 40-43), przeciwdrobnoustrojowe (44-47), przeciwbólowe (48, 49), przeciwzapalne (21), na układ sercowo-naczyniowy

(22, 37, 50, 51), hipotensyjne (52), neuroprotekcyjne (53), sedatywne (22, 37, 52, 54) i uterotoniczne (stymulujące na macicę) (31, 55-57).

Cel pracy

Celem pracy było przeprowadzenie badań wyciągów i frakcji z ziele serdecznika pospolitego pod kątem obecności kwasów fenolowych oraz potwierdzenie obecności flawonoidów w ziele serdecznika.

Materiał i metody

Materiał badawczy

Materiał do badań stanowiło ziele serdecznika (Producent: Zakład Zielarski KAWON-HURT Nowak sp.j., Gostyń).

Metoda sporządzenia 50% metanolowego wyciągu z ziele serdecznika oraz frakcjonowanie wyciągu do jakościowej analizy chromatograficznej

100 g rozdrobnionego w młynku ziele serdecznika ekstrahowano czterokrotnie po 2 h na wrzącej łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną 50% metanolem. Porcje wyciągu przesączono przez watę, połączono, a następnie odparowano do sucha. W celu pozbycia się balastów pozostałość po odparowaniu zalano wrzącą wodą (ok. 100 ml) i pozostawiono na 24 h. Ponownie przesączono przez watę. Tak uzyskany wyciąg przeniesiono do rozdzielacza i wytrząsano kolejno (15-krotnie po 10 ml) rozpuszczalnikami: chloroformem, eterem dietylowym, octanem etylu. Połączone poszczególne frakcje odparowano do sucha na wyparce próżniowej (rozpuszczalnik z frakcji eterowej odparowano pod normalnym ciśnieniem), rozpuszczono w 25 ml metanolu, uzyskując frakcje: CH – chloroformową, ED – eteru dietylowego, OE – octanu etylu. Pozostałość wodną odparowano do sucha i rozpuszczono w metanolu, stałą pozostałość rozpuszczono w wodzie, uzyskując frakcje: M – metanolową (z suchej pozostałości wodnej), W – wodną (z suchej pozostałości wodnej, która nie rozpuściła się w metanolu).

Do analizy jakościowej flawonoidów metodą PC wykorzystano frakcje OE, M i W, natomiast do analizy jakościowej kwasów fenolowych metodą TLC i UPLC, frakcje ED i OE.

Przygotowanie wyciągu do badania zawartości kwasów fenolowych metodą Arnova

Wyciąg przygotowano zgodnie z przepisem zawartym w monografii *Taraxaci radix* dla badania zawartości kwasów fenolowych w FP VI, 2002 (58). Odważono 1,00 g sproszkowanego surowca, przeniesiono

do kolbki stożkowej na 100 ml, odmierzone 25 ml wody i wytrząsano przez 30 minut. Surowiec ekstrahowano kolejną porcją rozpuszczalnika (25 ml), a połączone wyciągi przesączono przez sączek bibułowy do kolbki miarowej na 50 ml i uzupełniono wodą do kreski. Ekstrakcję przeprowadzono trzykrotnie, uzyskując ekstrakt I, II i III.

Przygotowanie wyciągów do ilościowej analizy kwasów fenolowych metodą UPLC

Wyciągi do ilościowej analizy zawartości kwasów fenolowych przygotowano ze sproszkowanego zieleńca serdecznika. Naważka surowca wynosiła 4,00 g. Ekstrakcję przeprowadzono na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Zastosowano 3 warianty ekstrakcji z użyciem 20%, 50% lub 100% metanolu. Trzystopniowa ekstrakcja, dla każdego z wariantów, trwała kolejno 30, 15 i 15 minut przy użyciu odpowiednio 60, 20 i 20 ml ekstrahenta. Poszczególne porcje wyciągu (z ekstrakcji 20% i 50% metanolem) przesączono przez watę, połączono i odparowano metanol. Pozostałość wodną zakwaszono 1 ml 0,5% metanolewego roztworu kwasu mrówkowego, dodano 15 ml metanolu i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 100 ml. Uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Przesączone i połączone porcje wyciągu z ekstrakcji 100% metanolem odparowano do sucha, rozpuszczono w 15% metanolu, zakwaszono j.w. i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej na 100 ml. Uzupełniono 15% metanolem do kreski. Dla każdego stężenia rozpuszczalnika wykonano po 3 ekstrakcje.

Metody badawcze

Chromatografię bibułową (PC) zastosowano w celu wstępnej oceny frakcji wyciągów oraz do identyfikacji flawonoidów. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) i ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC) posłużyły do identyfikacji kwasów fenolowych.

Chromatografia bibułowa (PC)

Faza stała: bibuła chromatograficzna firmy Whatman (1 CHR, 46 x 57 cm).

Na bibułę nanoszono pasmowo frakcje (15 mm) oraz punktowo wzorce (5 mm). Następnie bibułę rozwijano techniką wstępującą w układzie T2 (lodowaty kwas octowy – woda (15:85)). Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej chromatogramy analizowano w świetle lampy UV_{365nm} przed wywołaniem i po wywołaniu odczynnikami NA.

Odczynnik wywołujący NA – Naturstoff Reagent A (0,1% metanolewy roztwór kwasu difenyloborowego i etanoloaminy).

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Faza stała: płytki aluminiowe pokryte celulozą o grubości warstwy 0,1 mm i wymiarach 20 x 20 cm (DC – Alufolien Cellulose firmy Merck Art. 1.05552.0001, R18-21-1).

Na płytki nanoszono punktowo frakcje lub roztwory wzorców w postaci plam o średnicy 5 mm. Następnie płytki rozwijano metodą dwukierunkową (2D-TLC) w układach:

- T1: toluen – lodowaty kwas octowy – woda (6:7:1) I kierunek,
- T2: lodowaty kwas octowy – woda (15:85) II kierunek.

Rozwinięte chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej i analizowano w świetle lampy UV_{365nm}. Po spryskaniu odczynnikami wywołującym płytki analizowano w świetle dziennym. Odczynnikami wywołującym była mieszanina zdwuazowanego kwasu sulfanilowego i 20% węglanu sodu (1:1) przygotowana *ex tempore*.

Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych metodą Arnova

Do ilościowego oznaczenia kwasów fenolowych w ziele serdecznika zastosowano metodę kolorymetryczną Arnova (58). Polega ona na pomiarze absorbancji roztworu badanego po dodaniu odczynników: kwasu solnego, odczynnika Arnova i wodorotlenku sodu. Wartość absorbancji i intensywność zabarwienia badanej próby są proporcjonalne do zawartości kwasów fenolowych. Pomiaru dokonano przy długości fali $\lambda = 490 \text{ nm}$, w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm, przy użyciu spektrofotometru UV/VIS Lambda 35.

W badaniu wykorzystano roztwory odczynników: kwas solny 18 g/l; wodorotlenek sodu 40 g/l; odczynnik Arnova przygotowany *ex tempore*; roztwór podstawowy kwasu kawowego 0,2 mg/ml.

Oznaczanie zawartości flawonoidów metodą Christa-Müllera

Do ilościowego oznaczenia flawonoidów w ziele serdecznika zastosowano metodę kolorymetryczną opisaną w monografii *Leonuri cardiacae herba* w FP VIII, 2008 (59). Polega ona na hydrolizie kwasowej flawonoidów do aglikonów, które dobrze rozpuszczają się w octanie etylu. Pomiaru absorbancji badanego roztworu dokonuje się po dodaniu odczynnika kompleksującego – chlorku glinu, w środowisku kwaśnym. Wartość absorbancji i intensywność zabarwienia badanej próby są proporcjonalne do zawartości flawonoidów (60). Pomiaru dokonano przy długości

fali $\lambda = 425$ nm w kuwetach kwarcowych o grubości 10 mm przy użyciu spektrofotometru UV/VIS Lambda 35.

10,0 ml roztworu podstawowego (1,00 g sproszkowanego ziela serdecznika) przeniesiono do kolbki okrągłodennej, dodano 1 ml roztworu urotropiny, 20 ml acetonu i 2 ml kwasu solnego (250 g/l). Ekstrakcję prowadzono na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 30 minut. Wyciąg przesączono przez zwitek waty do cylindra miarowego. Zwitek waty wrzucono do pozostałości w kolbie okrągłodennej. Ekstrakcję surowca prowadzono jeszcze dwukrotnie porcjami acetonu po 20 ml przez 10 minut. Połączone ekstrakty przesączono przez sączek bibułowy do kolbki miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono acetonem do kreski. Do rozdzielacza przeniesiono 20,0 ml ekstraktu, 20 ml wody i wytrząsano z 15 ml octanu etylu. Warstwę octanu etylu zebrano, a wytrząsanie powtórzono trzykrotnie porcjami octanu etylu po 10 ml. Połączone wyciągi octanu etylu w rozdzielaczu, przemyto dwukrotnie 50 ml wody. Wyciąg przesączono przez 10 g bezwodnego siarczanu sodu umieszczonego na sączku bibułowym do kolbki miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono octanem etylu do kreski. 10 ml otrzymanego roztworu przeniesiono do kolbki miarowej o pojemności 25 ml, dodano 1 ml odczynnika chlorku glinu, uzupełniono do kreski 5% lodowatym kwasem octowym w metanolu i dokładnie wymieszano. Absorbancję roztworu badanego mierzono po 30 minutach wobec próby odniesienia (przygotowana jak roztwór badany z pominięciem odczynnika chlorku glinu), przy długości fali $\lambda = 425$ nm.

Procentową zawartość flawonoidów w surowcu [X] w przeliczeniu na hiperozyd, obliczono według wzoru:

$$X [\%] = A \cdot 1,25/m$$

gdzie:

m – masa naważki (1,00 g)

A – absorbancja.

Ultrasonowa chromatografia cieczowa (UPLC)

Do analizy chromatograficznej wykorzystano chromatograf cieczowy Acquity UPLC firmy Waters zaopatrzony w detektor fotodiodowy (ang. *photodiode array detector* – PDA). Rozdział prowadzono na kolumnie Acquity UPLC HSS T3 $1,8 \mu\text{m}$ ($2,1 \times 150$ mm) w temperaturze 20°C . Zastosowano prekolumnę Acquity UPLC BEH C18 $1,7 \mu\text{m}$ ($2,1 \times 5$ mm). Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła $0,32$ ml/min przy ciśnieniu 10000 psi, a elucja miała charakter gradientowy. Zastosowano dwie fazy ruchome: A – wodną

Tab. 1. Fazy ruchome do chromatografii UPLC

Czas analizy [min]	A [%]	B [%]
0-4	95	5
4-7	85	15
7-9	75	25
9-10	70	30
10	97	3

z 5% dodatkiem acetonitrylu, doprowadzoną do pH = 3 za pomocą stężonego kwasu mrówkowego i B – acetonitryl z dodatkiem stężonego kwasu mrówkowego (pH = 3), których udział procentowy podczas analizy zmieniał się, jak podano w tabeli 1.

Czas analizy wynosił 10 minut. Chromatogramy rejestrowano i analizowano w zakresie długości fali od 220 do 380 nm, których wybór zależał od maksimum absorbancji dla poszczególnych kwasów fenolowych (tab. 2). Uzyskane dane analizowano przy użyciu oprogramowania Empower 2.

Tab. 2. Długości fali zastosowane podczas analizy UPLC

Czas analizy [min]	Długość fali [nm]
0-3,7	324,7
3,7-4,8	255,2
4,8-5,8	273,0
5,8-7,2	309,0
7,2-8,2	323,0
8,2-10,0	328,4

Identyfikację kwasów fenolowych metodą UPLC przeprowadzono dla frakcji ED i OE w celu weryfikacji wcześniejszych badań jakościowych metodą TLC.

Przygotowanie frakcji do analizy

Do dwóch kolbek okrągłodennych pobrano 10 ml frakcji ED i OE, odparowano do sucha, a pozostałość w kolbkach rozpuszczono w 15% metanolu i zakwaszono $0,1$ ml $0,5\%$ metanolowego roztworu kwasu mrówkowego. Roztwory przeniesiono do kolbek miarowych o pojemności 10 ml i uzupełniono 15% metanolem do kreski. Uzyskane roztwory po prefiltrowaniu przez filtr $0,45 \mu\text{m}$ (GHP Acrodisc 13) nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną w objętości $2 \mu\text{l}$. Równolegle przeprowadzono rozdział chromatograficzny mieszaniny wzorcowych kwasów fenolowych. Wyboru wzorców dokonano na podstawie analizy metodą 2D-TLC. Dodatkowo zastosowano wzorzec kwasu rozmarynowego – związku charakterystycznego dla roślin z rodziny *Lamiaceae*, do której należą również serdecznik pospolity (4).

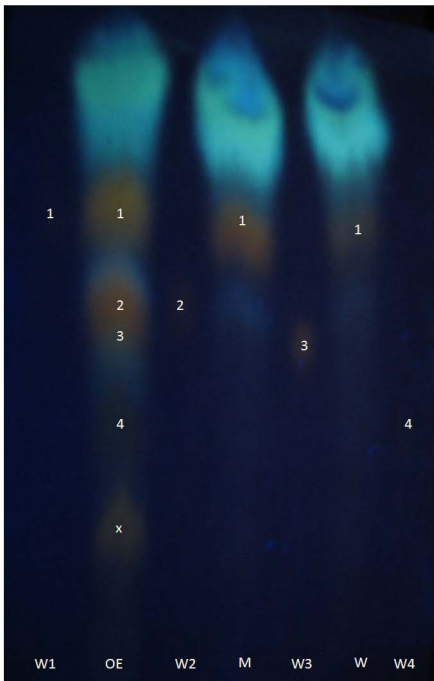
Oznaczanie zawartości poszczególnych kwasów fenolowych w ziele serdecznika metodą UPLC

Wyciągi do ilościowej analizy pod względem zawartości kwasów fenolowych przygotowano ze sproszkowanego ziela serdecznika. Naważka surowca wynosiła 4,00 g. Ekstrakcje przeprowadzono na wrzącej łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną. Zastosowano 3 warianty ekstrakcji z użyciem 20%, 50% lub 100% metanolu. Trzystopniowa ekstrakcja dla każdego z wariantów trwała kolejno 30, 15 i 15 minut przy użyciu odpowiednio 60, 20 i 20 ml ekstrahenta. Poszczególne porcje wyciągu (z ekstrakcji 20% i 50% metanolem) przesączono przez watę, połączono i odparowano metanol. Pozostałość wodną zakwaszono 1 ml 0,5% metanolowego roztworu kwasu mrówkowego, dodano 15 ml metanolu i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 100 ml. Uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Przesączone i połączone porcje wyciągu z ekstrakcji 100% metanolem odparowano do sucha, rozpuszczono w 15% metanolu, zakwaszono j.w. i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej na 100 ml. Uzupełniono 15% metanolem do kreski. Dla każdego stężenia rozpuszczalnika wykonano po 3 ekstrakcje. Uzyskane wyciągi po przefiltrowaniu przez filtr 0,45 µm (GHP Acrodisc 13) nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną w objętości 2 µl.

Wyniki i dyskusja

Identyfikacja flawonoidów z zastosowaniem chromatografii bibułowej (PC)

W celu potwierdzenia obecności związków flawonoidowych we frakcjach octanu etylu (OE), metanolowej (M) i wodnej (W) wyciągu z ziela serdecznika zastosowano chromatografię bibułową (arkusz o wymiarach 19,3 x 46 cm) techniką wstępującą. Odpowiednie frakcje nanoszono pasmowo (1,5 cm) na bibułę, a następnie rozwijano w układzie T2. Wzorce 4 flawonoidów: rutozydu (W1), izokwercytryny (W2), hiperozydu (W3) i witeksyny (W4) naniesiono punktowo (0,5 cm) na ten sam arkusz bibuły. Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej chromatogramy analizowano w świetle



Ryc. 1. Kochromatografia frakcji octanu etylu (OE), metanolowej (M) i wodnej (W) z roztworami wzorcowymi flawonoidów: rutozydu (W1), izokwercytryny (W2), hiperozydu (W3) i witeksyny (W4); numeracja plam według tabeli 3

lampy UV_{365nm} przed wywołaniem i po wywołaniu odczynnikiem NA. Przed wywołaniem chromatogramu badanych frakcji stwierdzono obecność plam o brunatnej fluorescencji pochodzących od flawonoidów, które po wywołaniu fluoryzowały na pomarańczowo (witeksyna – żółtopomarańczowo). We frakcji OE obserwowano 5 plam o takiej fluorescencji, spośród których wstępnie (porównanie z wartościami Rf wzorców) zidentyfikowano rutozyd, hiperozyd, izokwercytrynę i witeksynę. We frakcjach M i W potwierdzono jedynie obecność rutozydu. Wyniki analizy przedstawiono na rysunku 1 i w tabeli 3.

Analiza metodą TLC

W celu potwierdzenia obecności kwasów fenolowych w badanych frakcjach zastosowano chromatografię cienkowarstwową dwukierunkową (2D-TLC). Po wstępnych badaniach metodą PC do analizy

Tab. 3. Obecność flawonoidów we frakcjach OE, M i W

Nr plamy na chromatogramie	Flawonoidy	Rf roztworów wzorcowych	Fluorescencja		Analizowane frakcje		
			UV _{365nm}	NA/UV _{365nm}	OE	W	M
1	rutozyd	0,66	bru	pom	+	+	+
2	izokwercytryna	0,53	bru	pom	+	-	-
3	hiperozyd	0,48	bru	pom	+	-	-
4	witeksyna	0,37	bru	ż-pom	+	-	-

zabarwienie plam: bru – brunatna, pom – pomarańczowa, ż – żółta

Tab. 4. Obecność kwasów fenolowych we frakcjach ED, OE

Kwas fenolowy	Rf rozwiązań wzorcowych		Fluorescencja/Zabarwienie		Analizowane frakcje	
	T1	T2	UV _{365nm}	DKS/WS VIS	OE	ED
kawowy trans (1)	0,04	0,45	j-n	sz-bru	+	+
kawowy cis (2)	0,12	0,67	N	sz	+	+
chlorogenowy trans (3)	0,01	0,68	N	z-ż	+	+
chlorogenowy cis (4)	0,01	0,80	N	z-ż	+	+
p-kumarowy trans (5)	0,57	0,49	Ś	cz	-	+
p-kumarowy cis (6)	0,59	0,76	Ś	cz	-	+
p-OH-benzoesowy (7)	0,51	0,69	Ś	ż	-	+
wanilinowy (8)	0,88	0,62	Ś	pom	-	+
ferulowy trans (9)	0,90	0,40	c-n	f	-	+
ferulowy cis (10)	0,88	0,70	c-n	f	-	+
X	0,06	0,35	N	sz	+	+

x – nieznany związek stwierdzony we wzorcu kwasu kawowego

DKS/WS VIS – analiza w świetle widzialnym po wywołaniu odczynnikiem wywołującym przygotowanym *ex tempore* (w 10 ml roztworu kwasu sulfanilowego rozpuszczono 0,1 g azotynu sodu i wymieszano z 10 ml 20% węglanu sodu)

występowanie kwasów: + stwierdzono, – nie stwierdzono

zabarwienie plam: c – ciemny, bru – brunatny, cz – czerwony, f – fioletowy, j – jasny, n – niebieski, pom – pomarańczowy, sz – szary, ś – śliwkowy, z – zielony, ż – żółty

wykorzystano frakcje wyciągu: eterową (ED) i octanu etylu (OE). Na płytki aluminiowe pokryte celulozą o wymiarach 10 x 10 cm nanoszono punktowo frakcje i rozwijano techniką wstępującą, dwukierunkową (fazy ruchome T1 i T2). Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 4 oraz na rycinach 2a, b i 3a, b.

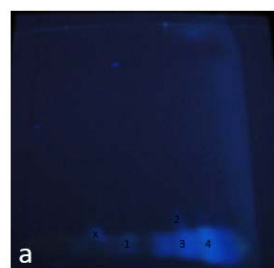
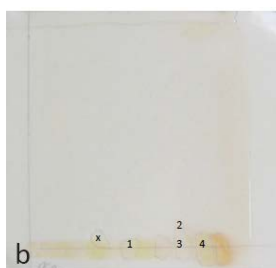
We wszystkich analizowanych frakcjach stwierdzono obecność izomerów cis- i trans-kwasu chlorogenowego

i kawowego. Ponadto frakcje zawierały nieznany związek x o niebieskiej fluorescencji (UV_{365nm}) i szarym zabarwieniu (DKS/WS VIS). W frakcji eterowej zidentyfikowano dodatkowo izomery cis- i trans- kwasu p-kumarowego oraz kwas wanilinowy i p-hydroksybenzoesowy (ryc. 3a, b).

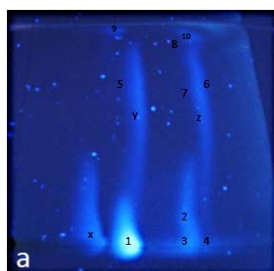
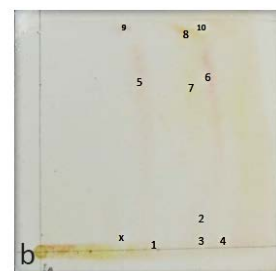
Identyfikacji kwasów fenolowych dokonano na podstawie czasów retencji oraz widm UV poszczególnych związków, które porównywano z wzorcami. Widma oraz chromatogramy obu frakcji przedstawiono na rycinach 4-7. Porównanie czasów retencji zidentyfikowanych i wzorcowych kwasów fenolowych przedstawiono w tabeli 5. We frakcji OE potwierdzono obecność kwasu chlorogenowego i kawowego zidentyfikowanych wcześniej metodą 2D-TLC. Dodatkowo obserwowano piki kwasu ferulowego, rozmarynowego i p-hydroksybenzoesowego, których plamy nie uwiarydliły się na płytkach. We frakcji ED zidentyfikowano 6 spośród 7 kwasów, których wzorce zastosowano. Analiza przeprowadzona metodą UPLC nie potwierdziła obecności kwasu kawowego w badanej próbce. Pomimo zbliżonych wartości czasu retencji widmo związku występującego we frakcji ED nie w pełni zgadza się z widmem wzorca.

Oznaczenie zawartości kwasów fenolowych

Do 10 próbek miarowych o pojemności 10 ml odmierzono po 5 ml wody i po 1 ml uzyskanego wyciągu. Po wymieszaniu do każdej próbki dodano kolejno: 1 ml kwasu solnego 18 g/l; 1 ml odczynnika Arnova; 1 ml roztworu wodorotlenku sodu 40 g/l.

UV_{365nm}**Ryc. 2a, b.** Chromatogramy 2D-TLC frakcji OE (numeracja według tabeli 4)

DKS/WS VIS

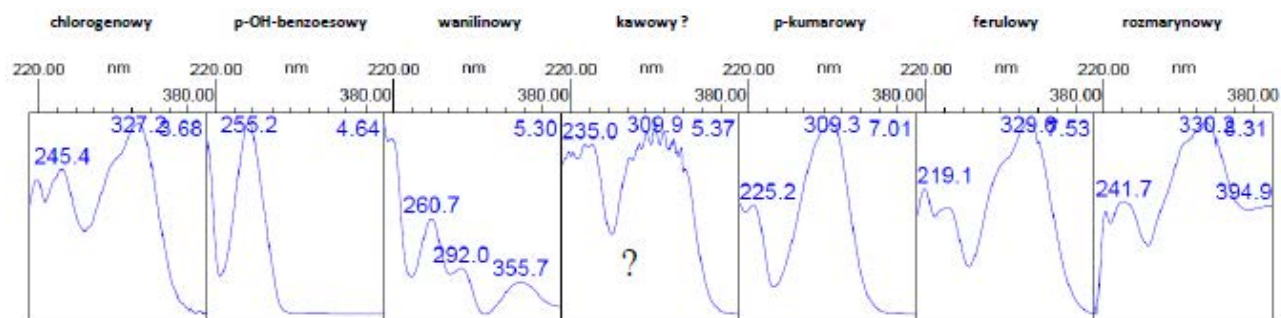
UV_{365nm}**Ryc. 3a, b.** Chromatogramy 2D-TLC frakcji ED (numeracja według tabeli 4)

DKS/WS VIS

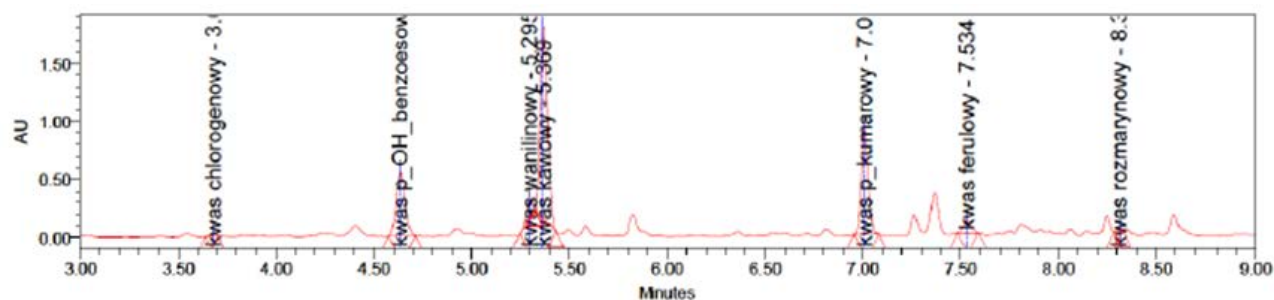
Probówki uzupełniono wodą do kreski, dokładnie wymieszano i natychmiast zmierzono absorbancję wobec próby odniesienia (mieszanka odczynników bez wyciągu). Wynik jest średnią ze 30 wyników (po 10 pomiarów dla 3 wyciągów). Zawartość procentowa kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy w surowcu wynosiła $0,4160 \pm 0,0032\%$.

Ilościowe oznaczenie kwasów fenolowych metodą UPLC

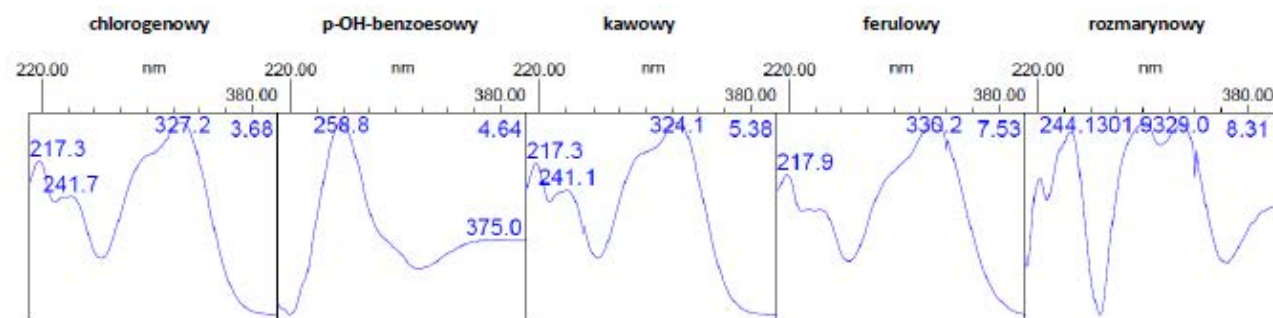
We wszystkich wyciągach rozpoznano (na podstawie czasów retencji i widm przedstawiających maksimum absorbancji) 3 spośród 7 wzorcowych kwasów fenolowych: chlorogenowy, kawowy i ferulowy. Ponadto w wyciągach uzyskanych przez ekstrakcję



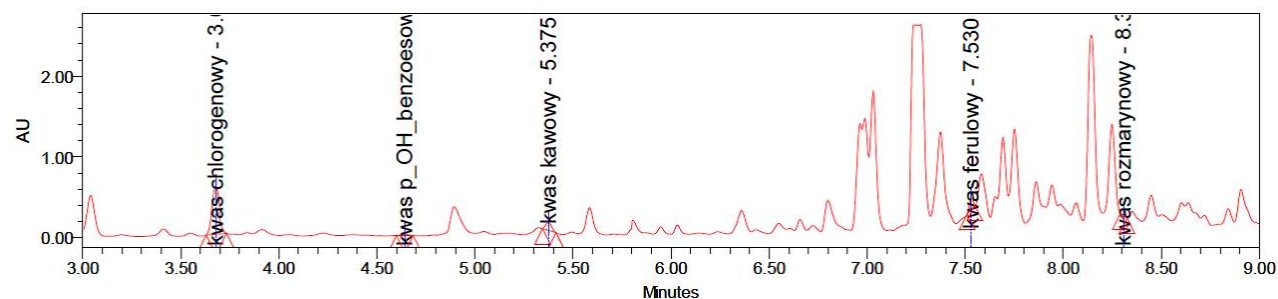
Ryc. 4. Widma zidentyfikowanych kwasów fenolowych we frakcji ED



Ryc. 5. Chromatogram frakcji ED



Ryc. 6. Widma zidentyfikowanych kwasów fenolowych we frakcji OE



Ryc. 7. Chromatogram frakcji OE

Tab. 5. Porównanie czasów retencji zidentyfikowanych i wzorcowych kwasów fenolowych

Kwas fenolowy	Czas retencji		
	Wzorce	ED	OE
chlorogenowy	3,686	3,682	3,678
p-hydroksybenzoesowy	4,633	4,637	4,642
wanilinowy	5,298	5,295	-
kawowy	5,370	5,369	5,375
p-kumarowy	7,009	7,010	-
ferulowy	7,527	7,534	7,530
rozmarynowy	8,313	8,311	8,307

50% i 100% metanolem zidentyfikowano kwas rozmarynowy. Przykładowe widma i chromatogramy obrazują ryciny 8-13.

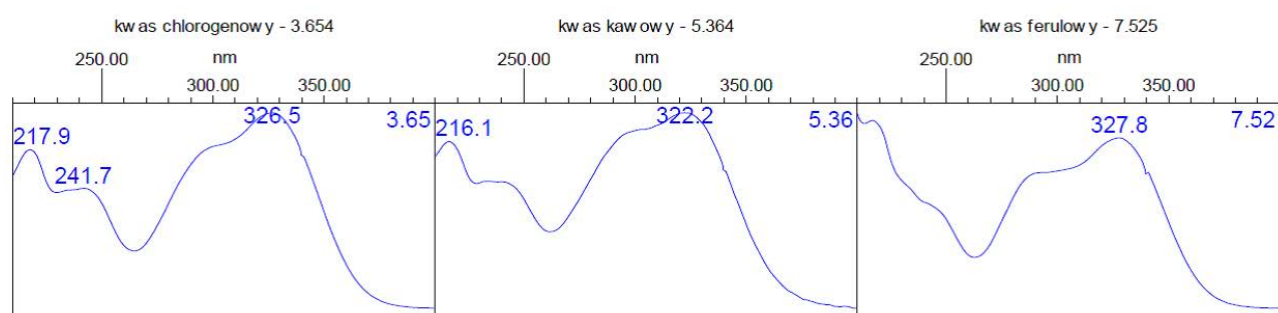
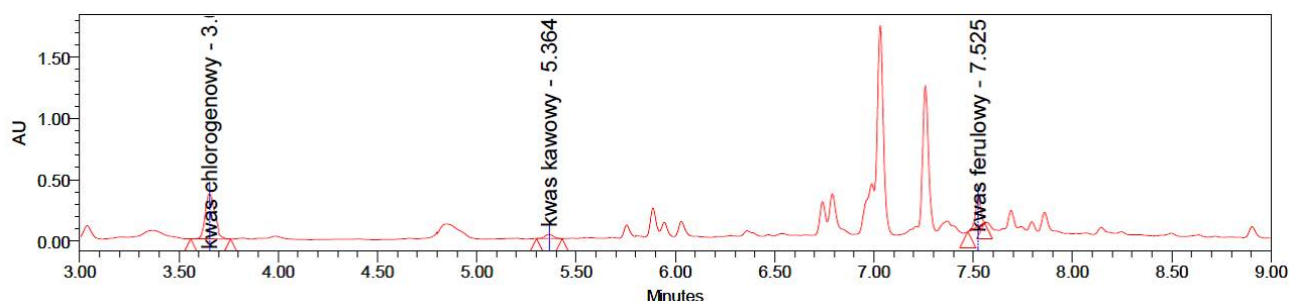
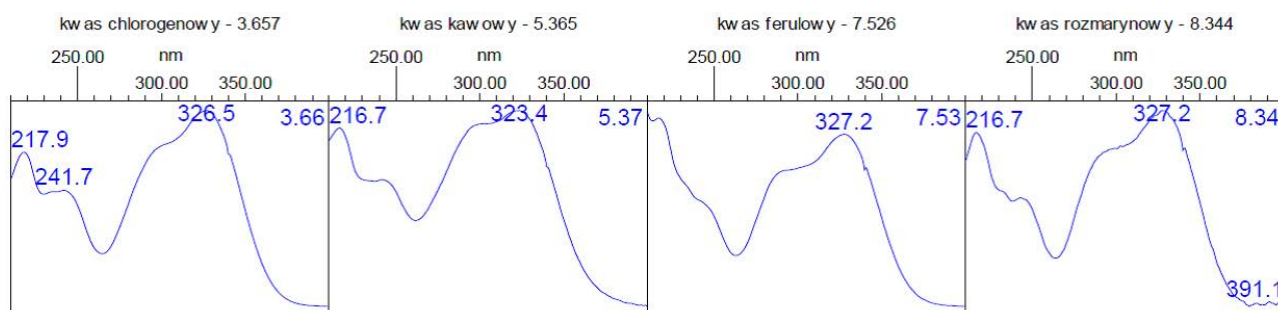
Zawartość procentową kwasów fenolowych w surowcu w zależności od stężenia rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji podstawiono w tabeli 6.

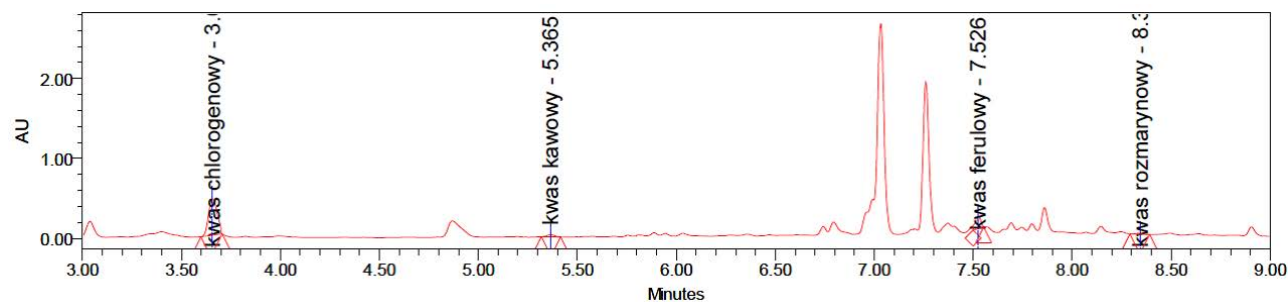
Zawartość flawonoidów w ziele serdecznika

Procentowa zawartość flawonoidów w ziele serdecznika wyniosła $0,4143\% \pm 0,0076\%$ w przeliczeniu na hiperozyd.

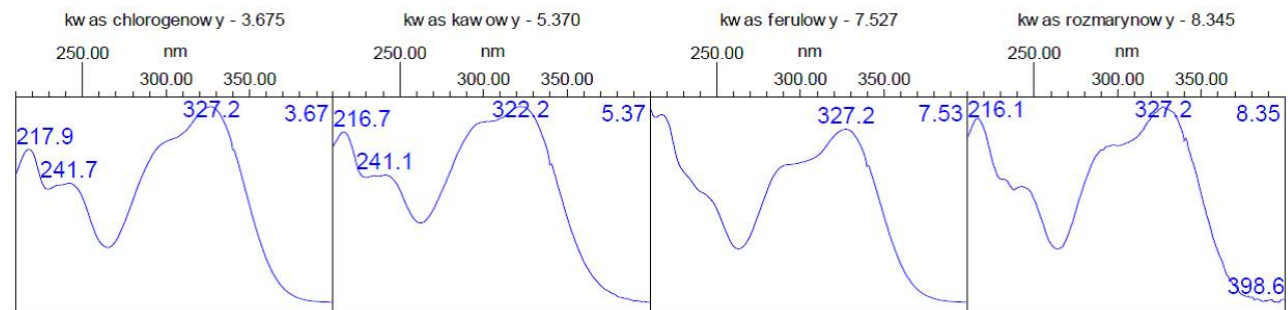
Po wstępnych badaniach metodą chromatografii bibułowej (PC) do analizy na obecność kwasów fenolowych wykorzystano frakcje eteru dietylowego (ED) i octanu etylu (OE) z 50% wyciągu metanolowo-wodnego. Podczas tych wstępnych badań we frakcjach OE, metanolowej (M) i wodnej (W), zaobserwowano również plamy o brunatnej fluorescencji w świetle lampy UV_{365nm}, co sugerowało obecność flawonoidów.

Do identyfikacji kwasów fenolowych posłużyła dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa (2D-TLC). Wartości R_f oraz fluorescencję (UV_{365nm}) i zabarwienie (VIS) plam przed wywołaniem i po wywołaniu (odpowiednio) odczynnikami DKS/WS porównywano z roztworami wzorcowymi kwasów fenolowych. Na tej podstawie we frakcji OE zidentyfikowano

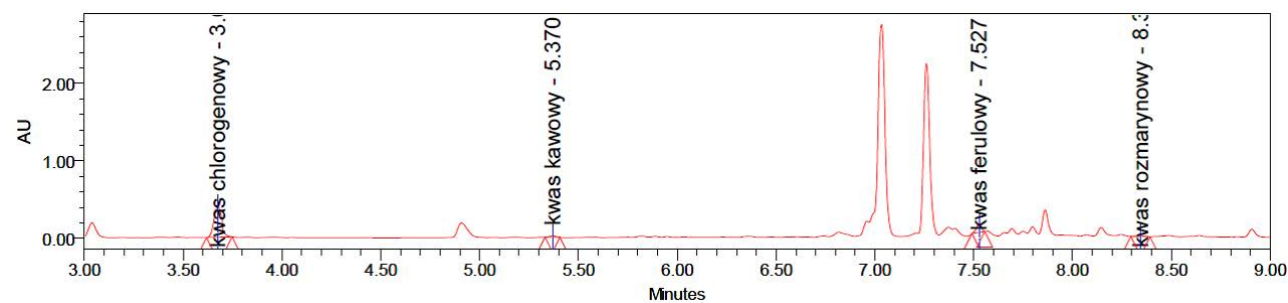
**Ryc. 8.** Widma zidentyfikowanych kwasów fenolowych dla ekstrakcji 20% metanolem**Ryc. 9.** Chromatogram dla ekstrakcji 20% metanolem**Ryc. 10.** Widma zidentyfikowanych kwasów fenolowych dla ekstrakcji 50% metanolem



Ryc. 11. Chromatogram wyciągu dla ekstrakcji 50% metanolem



Ryc. 12. Widma zidentyfikowanych kwasów fenolowych dla ekstrakcji 100% metanolem



Ryc. 13. Chromatogram wyciągu dla ekstrakcji 100% metanolem

izomery cis- i trans- kwasu kawowego i chlorogenowego, natomiast we frakcji eteru dietylowego (ED) oprócz ww. kwasów stwierdzono obecność izomerów cis- i trans- kwasu p-kumarowego, kwas wanilinowy i p-hydroksybenzoesowy. Ponadto we frakcji ED zidentyfikowano

izomery cis- i trans- kwasu ferulowego. Ujawnienie się tego związku może wynikać z zastosowanego do ekstrakcji surowca rozpuszczalnika, którym był 50% metanol. Prawdopodobnie istotną rolę odgrywa procentowy udział wody w rozpuszczalniku zastosowanym

Tab. 6. Zawartość procentowa kwasów fenolowych w surowcu w zależności od stężenia rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji

Kwas fenolowy X [%]	20% metanol			50% metanol			100% metanol		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
chlorogenowy	0,0916	0,0905	0,0854	0,1170	0,1118	0,1113	0,0972	0,1017	0,1018
	0,0892 ± 0,0033			0,1134 ± 0,0032			0,1002 ± 0,0026		
kawowy	0,0079	0,0079	0,0075	0,0064	0,0063	0,0062	0,0047	0,0054	0,0055
	0,0078 ± 0,0002			0,0063 ± 0,0001			0,0052 ± 0,0004		
ferulowy	0,0261	0,0238	0,0246	0,0167	0,0155	0,0157	0,0106	0,0118	0,0110
	0,1002 ± 0,0012			0,0160 ± 0,0006			0,0111 ± 0,0006		
rozmarynowy	-	-	-	0,0026	0,0023	0,0022	0,0021	0,0022	0,0022
	-			0,0024 ± 0,0002			0,0022 ± 0,0001		
Σ	0,1256	0,1222	0,1175	0,1427	0,1359	0,01354	0,1146	0,1211	0,1205

do ekstrakcji. Ponadto we wszystkich frakcjach zaobserwowano płamę x o niebieskiej fluorescencji oraz szarym zabarwieniu po wywołaniu DKS/WS. Natomiast tylko we frakcji ED stwierdzono obecność plam (y i z) o niebieskiej fluorescencji, niewybarwiających się po spryskaniu DKS/WS.

Do analizy związków flawonoidowych we frakcjach OE, M i W zastosowano metodę chromatografii bibulowej (PC). Na podstawie wartości R_f oraz fluorescencji (UV_{365nm}) przed wywołaniem i po wywołaniu odczynnikami NA porównywano ze wzorcami. Wstępnie we frakcji OE zidentyfikowano: rutozyd, hiperozyd, izokwercytrynę i witeksynę, natomiast we frakcjach M i W rutozyd. Jak wynika z danych literaturowych, obecność tych flawonoidów w ziele serdecznika pospolitego została już potwierdzona.

W następnym etapie badań jakościowych dotyczących identyfikacji kwasów fenolowych zastosowano metodę ultrasprawną chromatografię cieczową (UPLC). Do analizy wybrano frakcje ED i OE, dla których porównywano wartości czasu retencji oraz widma związków ze wzorcami. We frakcji OE zidentyfikowano kwas chlorogenowy, kawowy, p-hydroksybenzoesowy, ferulowy i rozmarynowy, spośród których dwa pierwsze wykryto wcześniej metodą 2D-TLC. We frakcji ED stwierdzono obecność kwasu chlorogenowego, p-hydroksybenzoesowego, ferulowego, rozmarynowego, wanilinowego i p-kumarowego. Problematiczna okazała się identyfikacja kwasu kawowego. Mimo iż na chromatogramie frakcji występował pik, którego czas retencji zgadzał się ze wzorcem kwasu kawowego, to jednak widmo tego związku nie odpowiadało widmu wzorca.

W wyniku przeprowadzonych badań jakościowych można wysunąć wniosek, że w ziele serdecznika pospolitego występują kwasy fenolowe, spośród których zidentyfikowano kwas chlorogenowy, kawowy, p-hydroksybenzoesowy, p-kumarowy, wanilinowy, ferulowy i rozmarynowy. Na podstawie przeglądu dostępnego piśmiennictwa stwierdzono, że wyżej wymienione kwasy fenolowe (z wyjątkiem kwasu chlorogenowego i rozmarynowego) zostały oznaczone po raz pierwszy w badanym gatunku serdecznika.

Kolejnym etapem badań była analiza ilościowa kwasów fenolowych w ziele serdecznika. Do oznaczenia sumy kwasów fenolowych zastosowano metodę spektrofotometryczną Arnowa opisaną w Farmakopei Polskiej VI. Zawartość kwasów fenolowych w wyciągu wodnym z surowca przeliczono na kwas kawowy, dla którego przygotowano krzywą wzorcową. Zawartość procentowa kwasów fenolowych w ziele serdecznika wynosiła $0,4160\% \pm 0,0032\%$.

Metodę UPLC zastosowano do oznaczenia ilościowego poszczególnych kwasów fenolowych w surowcu.

W tym celu przygotowano krzywe wzorcowe 7 kwasów fenolowych. Analizowano wyciągi uzyskane przez ekstrakcję metanolem o trzech różnych stężeniach: 20%, 50% i 100%. Wysokość pików kwasów fenolowych (zidentyfikowanych na podstawie czasu retencji i widma) przeliczono na stężenie w wyciągu, a następnie na zawartość procentową w surowcu. We wszystkich wyciągach stwierdzono obecność kwasu chlorogenowego, kawowego i ferulowego. Ponadto w wyciągach uzyskanych przez ekstrakcję 50% i 100% metanolem zidentyfikowano niewielkie ilości kwasu rozmarynowego, dla którego wyznaczono granicę oznaczalności. Wartości stężenia tego kwasu przekraczały granicę oznaczalności, dlatego uwzględniono je w obliczeniach. Pozostałych kwasów fenolowych, których wzorce zastosowano, nie wykryto w analizowanych próbach. Konieczne byłoby zwiększenie naważki surowca. Dominującym pod względem ilościowym kwasem fenolowym w badanych próbach okazał się kwas chlorogenowy (średnio ok. 80% sumy oznaczonych kwasów), w znacznie mniejszych ilościach występowały kwas ferulowy (14%), kawowy (5%) i rozmarynowy (1%). Jak wynika z przeprowadzonych badań, stężenie rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji ma wpływ na przechodzenie kwasów fenolowych do wyciągu. Najwięcej kwasów fenolowych stwierdzono w wyciągu uzyskanym z ekstrakcji 50% metanolem, a najmniej z ekstrakcji 100% metanolem.

Najwięcej kwasu kawowego i ferulowego oznaczono w wyciągach uzyskanych przez ekstrakcję 20% metanolem, nieco mniej 50%, a najmniej 100% metanolem. Udział wody w ekstrakcji odgrywa zatem istotną rolę. Stężenie kwasu chlorogenowego było najwyższe w wyciągach uzyskanych podczas ekstrakcji 50% metanolem, nieco niższe 100%, a najniższe 20% metanolem. Analogicznie przedstawiają się stężenia kwasu rozmarynowego, którego jednak nie stwierdzono w wyciągach z ekstrakcji 20% metanolem. W badaniach przeprowadzonych przez Dudek i wsp. w 2006 roku (61) dotyczących zawartości kwasów fenolowych w kwiatach malwy czarnej oznaczonych metodą HPLC zauważono podobną zależność między stężeniem ekstrahenta a przechodzeniem tych związków do wyciągu. Analizowano frakcje eterowe z wyciągów metanolowo-wodnych (50% metanol) i metanolowych (100% metanol) z różnych części surowca i stwierdzono wyższe stężenia kwasu kawowego, ferulowego i p-kumarowego, natomiast niższe kwasu p-hydroksybenzoesowego we frakcjach z wyciągów metanolowo-wodnych w porównaniu z frakcjami z wyciągów metanolowych.

Suma kwasów fenolowych oznaczonych metodą UPLC stanowiła średnio ok. 30% sumy oznaczonej

metodą Arnova. Przyczyny tej różnicy należy upatrywać w sposobie przeprowadzenia ekstrakcji oraz metodyce oznaczenia. Metodą UPLC można oznaczyć tylko te związki, których wzorce zastosowano, dlatego należy przypuszczać, że w surowcu występują inne kwasy fenolowe reagujące z odczynnikami Arnova i wpływające na ostateczny wynik.

Zastosowanie metody UPLC w niniejszych badaniach pozwoliło skrócić czas analizy do 10 minut, zmniejszyć zużycie fazy ruchomej do ok. 3,2 ml na jeden rozdział i objętość nastrzyku do 2 μ l. W tradycyjnie stosowanej metodzie rozdziału, wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), czas jednej analizy wynosi zwykle 30-70 minut, zużycie fazy ruchomej 24-50 ml, a objętość nastrzyku 10-30 μ l (61-64). W badaniach Schwarz i wsp. z 2009 roku, w których porównywano metodę UPLC i HPLC zastosowanych do rozdziału kwasów fenolowych w próbkach brandy, wykazano wyższą precyzję i czułość metody UPLC, a także 10-krotne skrócenie czasu analizy oraz 13-krotne zmniejszenie zużycia fazy ruchomej, co wiąże się z redukcją kosztów analizy (65).

Zawartość flawonoidów w badanym surowcu jest niższa od wyników uzyskanych przez Jafari i wsp. w 2010 (41). Naukowcy zastosowali tę samą metodę (opisaną w Farmakopei Europejskiej V) do analizy surowca zebranego w Teheranie (Iran). Oznaczona zawartość flawonoidów wynosiła 0,45%. Istotny wpływ na wyższy wynik w porównaniu z surowcami

pozyskanymi w Polsce mogą mieć warunki klimatyczne uprawy serdecznika pospolitego.

Wnioski

Analiza metodą chromatografii bibułowej frakcji OE, M i W pozwoliła wstępnie zidentyfikować w surowcu flawonoidy: rutozyd, hiperozyd, izokwercytrynę i witeksynę, których obecność w ziele serdecznika została już potwierdzona w innych badaniach.

Analiza frakcji 50% metanolowego wyciągu metodą 2D-TLC frakcji ED i OE i UPLC frakcji ED i OE pozwoliła wykazać obecność kwasów fenolowych, których wcześniej (z wyjątkiem kwasu chlorogenowego i rozmarynowego) nie opisywano w ziele serdecznika.

Stężenie rozpuszczalnika zastosowanego do ekstrakcji surowca ma wpływ na ilość kwasów fenolowych oznaczonych w wyciągach metodą UPLC. Zawartość kwasu kawowego i ferulowego była najwyższa w wyciągach uzyskanych z ekstrakcji 20% metanolem, natomiast kwasu chlorogenowego i rozmarynowego w wyciągach uzyskanych z ekstrakcji 50% metanolem. Suma kwasów fenolowych oznaczona metodą UPLC stanowi średnio ok. 30% sumy oznaczonej metodą Arnova, co może wynikać z różnic w metodyce oznaczeń i sposobie przeprowadzenia ekstrakcji. Dzięki analizie UPLC uzyskano większą rozdzielczość, krótszy czas analizy i mniejsze zużycie rozpuszczalników w porównaniu z analizą HPLC, co przekłada się na wyższą wydajność i niższe koszty analizy.

Piśmiennictwo

- Ożarowski A, Jaroniewski W. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wyd. Związków Zawod., Warszawa 1987; 346-8.
- Hoppe HA, Drogenkunde Band 1, 8. Auflage, De Gruyter, Berlin, New York 1975; 643-4.
- Wichtl M. Herbal drug and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on scientific basis. Sci Publ, Stuttgart 2004; 333-4.
- Reuter G, Diehl HJ. Arzneipflanzen der Gattung Leonurus und ihre Wirkstoffe. Die Pharmazie 1970; 25(74):586-8.
- Hänsel R, Keller K, Rimpler H i wsp. Hagers Handbuch. Der Pharmazeutischen Praxis, Band 5, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany 1993; 645-54.
- Weiss RF. Herbal Medicine, AB Arcanum, Gothenburg, Sweden 1988; 186-7.
- Lewkowicz-Mosiej T. Leksykon roślin leczniczych. Świat Książki, Warszawa 2003; 257-8.
- Borkowski B. Zarys farmakognozji. PZWL, Warszawa 1974; 613-8.
- Rumińska A, Ożarowski A. Leksykon roślin leczniczych. PWRiL, Warszawa 1990; 455.
- Kwaśniewska J, Skulimowski J, Tumiłowicz H. Poradnik zbieracza ziół. Wyd. Przem. Lekk. i Spoż., Warszawa 1956; 160-1.
- Romanowski H. Wyodrębnienie i analiza substancji alkaloidowej z ziele serdecznika (*Leonurus cardiaca* L.) metodą chromatograficzną. Acta Pol Pharm 1960; XVII(1):13-22.
- Kuchta K, Volk RB, Rauwald HW. Quantitative HPTLC determination of stachydrine in cardioactive plant drugs such as in an antiarrhythmic refined extract of *Leonurus cardiaca* Ph.Eur. Zeitschrift für Phytotherapie 2009; 30(S01):P22.
- Gulubov AZ, Chervenkova VB. Structure of alkaloids from *Leonurus cardiac*. Nauch Tr. Viss. Predagog. Inst. Plovdiv Mat. Fiz. Khim. Biol. 1970; 8(1):129-32.
- Weinges K, Kloss P, Henkels WD. Naturstoffe aus Arzneipflanzen, XVIII Isolierung und Konstitutionsaufklärung eines neuen C15-Iridoidglucosids aus *Leonurus cardiaca* L. Justus Liebigs Annalen der Chemie 1973; 4:566-72.
- Brieskorn CH, Hofmann R. Labiatenbitterstoffe: ein Clorodanderivat aus *Leonurus cardiaca* L. Tetrahedron Lett 1979; 27:2511-2.
- Malakov PY, Papanov GY, Jakupovic J i wsp. The structure of leocardin, two epimers of a diterpenoid from *Leonurus cardiac*. Phytochem 1985; 24:2341-3.
- Papanov G, Malakov P, Tomova K. 19-Hydroxygaleopsin, a labdane diterpenoid from *Leonurus cardiac*. Phytochemistry 1998; 47(1):139-41.
- Papanov GY, Malakov PY, Rodriguez B, de la Torre MC. A prefuranic labdane diterpene from *Leonurus cardiac*. Phytochemistry 1998; 47(6):1149-51.
- Knöss W, Zapp J. Accumulation of furanic labdane diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonurus cardiac*. Planta Med 1998; 64:357-61.

20. Janicsák G, Veres K, Kakasy AZ, Máthé I. Study of the oleonic and ursolic acid contents of some species of the *Lamiaceae*. *Biochem Syst Ecol* 2006; 34:392-6.
21. Ali MS, Ibrahim SA, Jalil S i wsp. Ursolic acid: A potent inhibitor of superoxides produced in the cellular system. *Phytother Res* 2007; 2:558-61.
22. Miłkowska-Leyck K, Filipek B, Strzelecka H. Pharmacological effects of lavandulifolioside from *Leonurus cardiac*. *J Ethnopharmacol* 2002; 80:85-90.
23. Tschesche R, Diederich A, Jha HC. Caffeic acid 4-rutinoside from *Leonurus cardiac*. *Phytochem* 1980; 19:2783.
24. Schultz OE, Alhyane M. Components of *Leonurus cardiaca* L. *Sci Pharm* 1973; 41:149-55.
25. Kartnig T, Gruber A, Menzinger S. Flavonoid-O-glycosides from the herbs of *Leonurus cardiac*. *J Nat Prod*. 1985; 48(3):494-507.
26. Bernatoniene J, Kucinskaite A, Masteiková R i wsp. The comparison of anti-oxidative kinetics *in vitro* of the fluid extract from maidenhair tree, Motherwort and Hawthorn. *Acta Pol Pharm – Drug Research* 2009; 66(4):415-21.
27. Mockutė D, Bernotienė G, Judzientienė A. Storage-induced changes in essential oil composition of *Leonurus cardiaca* L. plants growing in Vilnius and of commercial herbs. *Chemija* 2005; 16(2):29-32.
28. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Akbarzadeh M. The essential oil composition of *Leonurus cardiaca* L. *J Essent Oil Res* 2008; 20:107-9.
29. Senatore F, De Feo V, De Simone F i wsp. Sterols from *Leonurus cardiaca* L. in different geographical areas. *Herba Polonica* 1991; 37(1):3-7.
30. Schultz OE, Haack HJ. Isolierung und Versuche zur Konstitutionsaufklärung von drei Bitterstoffglykosiden aus *Leonurus cardiaca* 2. Mitteilung, *Arzneimittelforschung* 1961; 11:975-8.
31. Wojtyniak K, Szymański M, Matławska I. *Leonurus cardiaca* L. (Motherwort): A review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytother Res* 2013; 27:1115-20.
32. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. *Herbal Medicine Expanded Commission E Monographs*. American Botanical Council, Austin, Texas, 2000, Integrative Medicine Communication, USA 2000; 267-9.
33. Ożarowski A, Łańcucki J, Gąsiorowska K. Leki roślinne, informator. *Zjednoczenie Przemysłu Zielarskiego HerbaPol*, Warszawa 1978; 200-1.
34. Bradley PR. *British Herbal Compendium, Volume 1*. British Herbal Medicine Association, Bournemouth 1992; 161-2.
35. Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG i wsp. Effect of *Leonurus cardiaca* oil extract in patients with arterial hypertension accompanied by anxiety and sleep disorders. *Phytother Res* 2010; 25(4):540-3.
36. Widy-Tyszkiewicz E, Schminda R. A randomized double blind study of sedative effects of phytotherapeutic containing valerian, hops, balm and motherwort versus placebo. *Herba Polonica* 1997; 43:154-9.
37. Mścisz A, Gorecki P. Serdecznik pospolity (*Leonurus cardiaca* L.) – roślina lecznicza o działaniu uspokajającym i nasercowym. *Herba Polonica* 1997; 23(2):172-8.
38. Jakimiuk AJ, Fritz A, Kamiński K. Zaburzenia mięśniaczki. [W:] Słomko Z (red.). *Ginekologia*. T. 1. PZWŁ, Warszawa 2008; 406-23.
39. Sarwa A. *Wielki leksykon roślin leczniczych*. Książka i Wiedza, Warszawa 2001; 229-30.
40. Masteiková R, Muselík J, Bernatoniene J i wsp. Antioxidant activity of tinctures prepared from hawthorn fruits and motherwort herb. *Ceská a Slovenská Farmacie* 2008; 57(1):35-8.
41. Jafari S, Moradi A, Salaritabar A i wsp. Determination of total phenolic and flavonoid contents of *Leonurus cardiaca* L. in compare with antioxidant activity. *Res J Biol Sci* 2010; 5(7):484-7.
42. Matkowski A, Piotrowska M. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the *Lamiaceae*. *Fitoterapia* 2006; 77(5):346-53.
43. Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J Med Plants Res* 2008; 2(11):321-30.
44. Sattar AA, Bankova V, Kujumgiev A i wsp. Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some *Lamiaceae* plants. *Die Pharmazie* 1995; 50(1):62-5.
45. Tasdemir D, Brun R, Perozzo R i wsp. Evaluation of anti-protozoal and plasmodial enoyl-ACP reductase inhibition potential of turkish medicinal plants. *Phytother Res* 2005; 19:162-6.
46. Agnihotri VK, ElSohly HN, Smillie TJ i wsp. New labdane diterpenes from *Leonurus cardiaca*. *Planta Med* 2008; 74:1288-90.
47. Fokina GI, Frolova TV, Roikhel VM i wsp. Experimental phytotherapy of tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii* 1991; 36(1):18-21.
48. Szöcs D, Feszt G, Dogaru MT. Antinociceptive effect of some *Lamiaceae*-species and their interactions with naloxone and verapamil. *Fundam Clin Pharmacol* 1999; 13(s1):211s.
49. Brand K, Zampirolo J, Schlemper V i wsp. Antinociceptive effect of furanic labdane diterpenes. *Arch Pharm* 1999; 331(suppl. 2):6.
50. Ritter M, Melichar K, Strahler S i wsp. Cardiac and electrophysiological effects of primary and refined extracts from *Leonurus cardiaca* L. (Ph. Eur.). *Planta Med* 2010; 76(6):572-82.
51. Liu XH, Pan LL, Chen PF i wsp. Leonurine improves ischemia-induced myocardial injury through antioxidative activity. *Phytomed* 2010; 17:753-9.
52. Rác G, Rác-Kotilla E. Sedative and antihypertensive activity of *Leonurus quinquelobatus*. *Planta Med* 1989; 55:97.
53. Qi J, Hong ZY, Xin H i wsp. Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rats cerebral cortex. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(12):1958-64.
54. Polyakov NG. Investigation into biological activity of valerian and motherwort (*Leonurus*) tinctures on rabbits. *Farmakologija i toksikologija* 1962; 25:423-7.
55. Chen ZS, Chen CX, Kwan CY. *Leonurine*, an alkaloid from *Leonurus artemisia*, induces contraction in mouse uterine smooth muscle but relaxation in vascular smooth muscle of rat portal vein. *Biomed Res* 2000; 11(2):209-12.
56. Kong YC, Ng KH. Stimulatory effect of *Leonurus artemisia* (I-Mu Ts'ao) on the contraction of human myometrium *in vitro*. *Experientia* 1974; 30(11):1281-2.
57. Yeung HW, Kong YC, Lay WP i wsp. The structure and biological effect of leonurine. A uterotonic principle from the Chinese drug, I-mu Ts'ao. *Planta Med* 1977; 31(1):51-6.
58. *Farmakopea Polska VI*, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2002.
59. *Farmakopea Polska VIII*, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2008, T. I.
60. Strzelecka H, Kamińska J, Kowalski J i wsp. Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych. PZWŁ, Warszawa 1987; 82-3.
61. Dudek M, Matławska I, Szkudlarek M. Phenolic acids in the flowers of *Althaea rosea* var. *nigra*. *Acta Pol Pharm - Drug Res* 2006; 63(3):207-11.

62. Robbins RJ, Bean SR. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography–photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *J Chromatogr A* 2004; 1038:97-105.
63. Karamać M, Kosińska A. Rozdział natywnych fenolokwasów w pszenicy metodą RP-HPLC-DAD. *Bromat Chem Toksykol* 2007; 40(2):173-7.
64. Sokołowska-Krzaczek A, Skalicka-Woźniak K, Czubkowska K. Variation of phenolic acids from herb and roots of *Salsola kali* L. *Acta Societ Botanic Poloniae* 2009; 78(3):197-201.
65. Schwarz M, Rodríguez MC, Guillén DA i wsp. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *J Separ Sci* 2009; 32:1782-90.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 11.01.2024

zaakceptowano/accepted: 01.02.2024

Adres/address:

*dr n. rol. Marcin Szymański

Centrum Zaawansowanych Technologii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10

61-614 Poznań

e-mail: marcin.szymanski@amu.edu.pl