
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XIX, 46

SECTIO EE

2001

Katedra Biochemii i Toksykologii Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie

JERZY TRUCHLIŃSKI, MAGDALENA CENDROWSKA

*Oznaczanie kwasu kawowego jako wskaźnika zawartości kwasów
fenolowych w jeżówce purpurowej, krwawniku pospolitym i babce
lancetowatej, stosowanych jako immunostymulacyjne dodatki paszowe*

Determination of Caffeic Acid as Indicator of Phenolic Acid in Purple Coneflower, Yarrow,
Great Plantain as Immunostimulative Nutrition Additives

Wielkotowarowy, intensywny, chów zwierząt stwarza wiele zagrożeń dla ich zdrowia i środowiska. Przy najmniejszych nawet zaburzeniach odporności organizmu dochodzi do spadku jego obronności. Dotyczy to zarówno deficytów elementów odpornościowych zwierzęcia (immunosupresja), jak i nadmiernego wzrostu tych parametrów (nadwrażliwość).

W ostatnich latach pojawiła się rosnąca liczba raportów o immunomodulacyjnych właściwościach metabolitów roślinnych. Może się to przejawiać na różne sposoby: wzrostem aktywności makrofagów, wzrostem liczby limfocytów T lub B, wzrostem liczby interferonów lub wzbudzaniem interleukin. Rozważając wieloraką biologiczną aktywność interferonów, wiele uwagi poświęca się poszukiwaniu roślinnych induktorów interferonów. Większość z nich pochodzi z rodziny *Asteraceae*. Spośród roślin szczególną uwagę skupia się na *Echinacea* sp., ze względu na jej wieloraką aktywność immunostymulującą (13).

Również i inne rośliny, jak np. ziele krwawnika (*Achillea millefolium*) czy ziele babki lancetowatej (*Plantago lanceolata*), posiadają wiele ciał czynnych o działaniu immunomodulującym i są przedmiotem badań w celu zastosowania ich jako dodatki paszowe dla zwierząt zarówno gospodarskich, jak i łownych.

Działanie immunomodulujące wykazują: nukleotydy, polisacharydy, glikoproteiny, proteiny, peptydy, taniny, garbniki, śluz jak również związki nisko-

cząsteczkowe: alkaloidy, olejki eteryczne, flawonoidy, a także fenole, polifenole i fenolokwasy (15).

Kwasy fenolowe występujące w wielu roślinach leczniczych posiadają działanie farmakologiczne. W większości surowców wspomagają działanie głównych ciał czynnych, same również wykazują właściwości lecznicze. Badania *in vitro* oraz doświadczenia na zwierzętach z preparatami stosowanymi w profilaktyce i leczeniu przebiegów ograniczyły się do oznaczenia podwyższonej zdolności fagocytarnej granulocytów i makrofagów, pomiaru zwiększonego uwalniania rodników tlenowych, podwyższonego poziomu substancji bakteriobójczych w osoczu, wzrostu aktywności enzymów lizosomalnych.

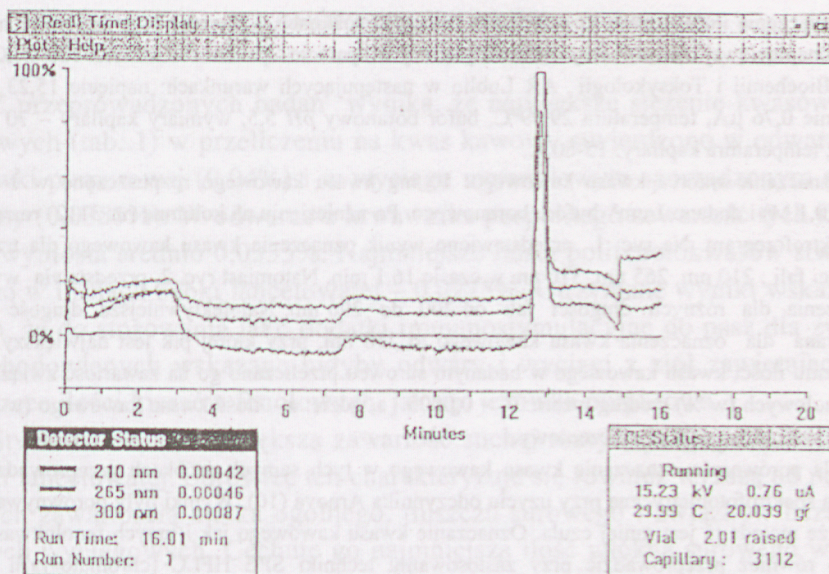
Większość wyciągów w zależności od zastosowanej dawki może pobudzać (dawki niskie) lub hamować (dawki wysokie) reakcje immunologiczne. Pochodne kwasu kawowego mają ciekawe działanie biologiczne – co uzasadnia stosowanie wielu surowców w fitoterapii (5). Stwierdzono, że specyficzne działanie przeciwwirusowe warunkuje reszta cząsteczki kwasu kawowego. Nie wykazały go natomiast równolegle testowane pochodne kwasu cynamonowego, kwas ferulowy i flawonoidy (2, 3). Nową grupą związków biologicznie czynnych, pokrewnych garbnikom, są kawolidy. Zalicza się do nich pochodne kwasu kawowego i innych fenolokwasów, wywodzących się od kwasu cynamonowego (2).

Pochodne fenolokwasów – depsydy i depsydony, zwane kwasami porostowymi, w medycynie ludowej były stosowane w sytuacji obniżenia odporności organizmu (12). Jednak zastosowanie ziół w żywieniu zwierząt, ze względu na specyfikę zarówno wielkości dawki, jak i sposobu ich podawania, wymaga przeprowadzenia standaryzacji zawartych w nich substancji czynnych. Celowe zatem wydało się określenie ilości kwasu kawowego jako wskaźnika zawartości kwasów fenolowych, należących do immunostymulatorów, w jeżówce purpurowej, babce lancetowatej i krwawniku pospolitym.

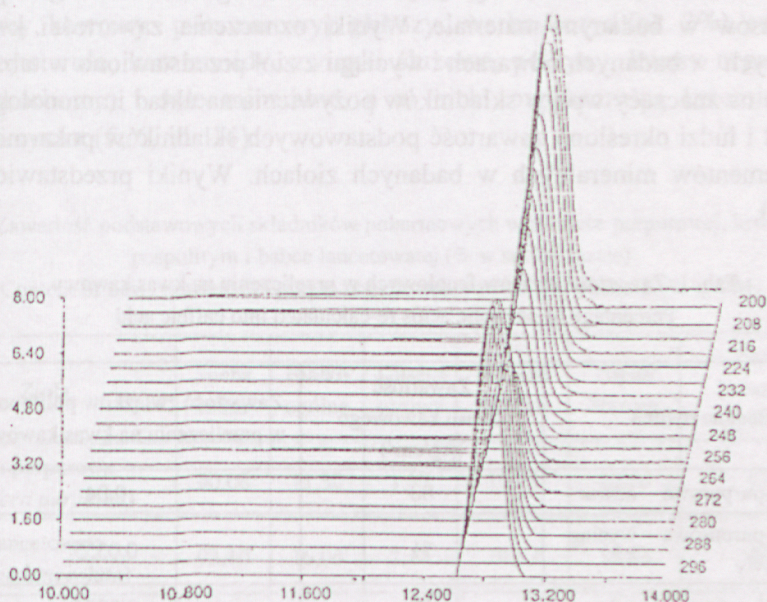
MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano ziele jeżówki purpurowej, ziele krwawnika pospolitego i liście babki lancetowatej, pochodzące z Zakładów Zielarskich „Kawon” z Gostynia.

Próbki badanych ziół rozdrobniono w młynie rotacyjnym przez okres 3 min. przy 3000 obr./min. Z badanych surowców sporządzono wyciągi (80% metanolem w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika) celem oznaczenia techniką HPCE oraz HPLC, zmodyfikowaną metodą Ibrahima i Towersa, a stosowaną przez Krzaczka (8). Natomiast dla oznaczeń metodą spektrofotometryczną przy użyciu odczynnika Arnova wykorzystano wyciąg metanolowy z jeżówki purpurowej oraz odvary z trzech badanych ziół.



Ryc. 1. Wyniki oznaczenia kwasu kawowego w metanolewym jeżówce purpurowej techniką HPCE dla trzech długości fali: 210 nm, 265 nm i 310 nm w czasie 16,1 minut
Results for caffeic acid determination in methanol extract of purple coneflower by means of HPCE technique for wavelengths: 210 nm, 265 nm and 310 nm during 16.1 min



Ryc. 2. Wynik oznaczenia kwasu kawowego dla różnych długości fali: 200 nm – 290 nm
Results for caffeic acid determination for wavelengths 200 nm and 290 nm

Oznaczenie ilości kwasu kawowego w badanych roślinach wykonano przy użyciu techniki wysokonapięciowej elektroforezy cienkokapilarnej w aparacie Spektro PHORESIS 100 w Katedrze Biochemii i Toksykologii AR Lublin w następujących warunkach: napięcie 15,23 kV, natężenie 0,76 μ A, temperatura 29,99°C, bufor boranowy pH 5,5, wymiary kapilary – 70 cm: 75 μ m, temperatura kapilary: 15-60°C.

Oznaczenie wzorca kwasu kawowego: 10 mg kwasu kawowego rozpuszczono w 1 cm³ KOH (0,1 M) i dodano 1 cm³ buforu boranowego. Po naniesieniu na kolumnę (nr 3112) rozwijało elektroforegram. Na ryc. 1 przedstawiono wynik oznaczenia kwasu kawowego dla trzech długości fali: 210 nm, 265 nm, 310 nm w czasie 16,1 min. Natomiast ryc. 2 przedstawia wynik oznaczenia dla różnych długości fali od 200 do 296 nm. Najefektywniejsza długość fali stosowana dla oznaczenia kwasu kawowego to 210 nm, przy której pik jest największy. Po określeniu ilości kwasu kawowego w badanym surowcu przeliczano go na zawartość związków polifenolowych (w %) według wzoru: $X = 0,0005 \cdot a$, gdzie: a – ilość kwasu kawowego (w μ g), 0,0005 – współczynnik przeliczeniowy.

Dla porównania oznaczanie kwasu kawowego w tych samych próbkach przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy użyciu odczynnika Arnova (10). Wyniki były porównywalne, mimo że metoda ta jest mniej czuła. Oznaczanie kwasu kawowego jak i innych fenolokwasów, można również przeprowadzić przy zastosowaniu techniki SPE HPLC (chromatografii cieczowej).

WYNIKI

Na podstawie oznaczenia stężenia kwasu kawowego określono ilość polifenolokwasów w badanym materiale. Wyniki oznaczenia zawartości kwasów fenolowych w badanych odwarach i wyciągu z ziół przedstawiono w tab. 1. Ze względu na znaczący wpływ składników pożywienia na układ immunologiczny zwierząt i ludzi określono zawartość podstawowych składników pokarmowych oraz elementów mineralnych w badanych ziołach. Wyniki przedstawiono w tab. 2 i 3.

Tab. 1. Zawartość kwasów fenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy
Percentage of phenolic acids re-calculated into caffeic acid

Badana roślina	Zawartość kwasu kawowego (μ g/cm ³)	Zawartość związków polifenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy (%)
Jeżówka purpurowa – odwar	80	0,04
Jeżówka purpurowa – wyciąg metanolowy	71	0,0355
Krwawnik pospolity – odwar	55	0,0275
Babka lancetowata – odwar	67	0,0335

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z przeprowadzonych badań wynika, że największe stężenie kwasów fenolowych (tab. 1) w przeliczeniu na kwas kawowy stwierdzono w odwarze z jeżówki purpurowej (0,04%) i w wyciągu metanolowym sporządzonym z tej rośliny (0,0355%). W odwarze z krwawnika pospolitego zawartość tych kwasów wyniosła średnio 0,0335%. Najmniejsze ilości polifenolokwasów stwierdzono w liściach babki lancetowatej – 0,0275%. Otrzymane wyniki wskazują na to, że do stosowania jako dodatki immunostymulacyjne do pasz dla zwierząt hodowlanych wskazane byłyby odwary i wyciągi z ziół zawierających znaczące ilości kwasów fenolowych, jak np. jeżówka purpurowa.

Stwierdzono, iż największa zawartość suchej masy występuje w liściach babki lancetowatej. Surowiec ten charakteryzuje się również wyższą od pozostałych zawartością białka ogólnego, tłuszczu surowego i związków bezazotowych wyciągowych. Cechuje go najmniejsza ilość włókna surowego w suchej masie. Główną grupą związków biologicznie czynnych występujących w liściu babki wąskolistnej (lancetowatej) są surowce śluzowe. Zbierane podczas kwitnienia rośliny liście zawierają liczne wielocukry, flawonoidy (bajkaleina i skutelareina), glikozydy irydoidowe, zwłaszcza aukubinę do 1,69% (o działaniu bakteriostatycznym i ochraniającym miąższ wątroby) oraz katalpol, nieco garbników, liczne fenolokwasy (jak kwas chlorogenowy, neochlorogenowy, kawowy i p-kumarowy), glikozyd-werbaskozyd (ok. 2%), enzymy, gorycze, sterole, karotenoidy, związki śluzowe, pektyny, kwasy organiczne (np. askorbowy) i sole mineralne, a w nich rozpuszczalną krzemionkę i związki cynku (5, 6, 11, 14).

Tab. 2. Zawartość podstawowych składników pokarmowych w jeżówce purpurowej, krwawniku pospolitym i babce lancetowatej (% w suchej masie)

Content of basic nutrients in purple coneflower, yarrow and plantain (% in DM)

Zioła	Sucha masa	Białko ogólne	Tłuszcz surowy	Włókno surowe	Popiół Surowy	Związki bezazotowe wyciągowe
Jeżówka purpurowa (<i>Echinacea purpurea</i>)	90,06	11,30	1,97	19,18	10,76	46,85
Babka lancetowata (<i>Plantago lanceolata</i>)	93,10	16,06	2,14	10,17	14,82	49,91
Krwawnik pospolity (<i>Achillea millefolium</i> L.)	90,65	10,29	1,94	30,15	19,52	28,75

Tab. 3. Zawartość składników mineralnych w jeżówce purpurowej, krwawniku pospolitym i babce lancetowatej (g/kg)

Content of mineral components in purple coneflower, yarrow and great plantain (g/kg)

Badana roślina	Ca	Na	Mg	K	Cu	Zn	Fe	Mn
Jeżówka purpurowa (<i>Echinacea purpurea</i>)	15,85	0,35	0,05	20,37	0,01	0,06	0,19	0,34
Babka lancetowata (<i>Plantago lanceolata</i>)	11,46	0,75	0,02	37,45	0,02	0,05	0,30	0,19
Krwawnik pospolity (<i>Achillea millefolium</i> L.)	10,83	0,33	0,03	25,87	0,01	0,06	0,16	0,26

Wykazano, że wyciągi z krwawnika i babki są naturalnymi, niespecyficznymi stymulatorami interferonu, a więc mogą mieć znaczenie w leczeniu chorób wirusowych. Wadą stosowanych ziół w formie naparów i odwarów jest konieczność sporządzania ich *ex tempore*.

W suchej masie ziela krwawnika pospolitego stwierdzono najwyższe stężenie popiołu surowego i włókna surowego; najniższe natomiast wartości przybierały: białko ogólne, tłuszcz surowy i substancje bezazotowe wyciągowe. Surowiec ten zawiera poliiny z pontykaepoksydem, cis i transestry matrykariowe, triterpeny, sterole, garbniki tanoidowe, cyjanogenne glukozydy (m. in. prunazyne). Kwas kawowy i salicylowy należą do występujących tu fenolokwasów, a obecne w ziele flawonoidy to apigenina, luteolina i ich 7-O-glukozydy oraz glikozyloflawony (1, 7).

Ziele jeżówki purpurowej, odmian uprawianych w Polsce, wykazuje spośród oznaczanych podstawowych składników pokarmowych badanych ziół wyższą wartość jedynie związków bezazotowych wyciągowych (tab. 2). Preparaty z trzech gatunków jeżówek: purpurowej, różowej i wąskolistnej obecnie zaliczane są w fitoterapii do najczęściej stosowanych roślinnych środków immunostymulujących. Udowodniono w badaniach *in vitro* i *in vivo*, że przetwory z wymienianych gatunków jeżówek po podaniu pozajelitowym lub doustnym zwiększają liczbę krwinek białych i komórek śledziony, aktywizują fagocytozę ludzkich granulocytów i pobudzają naturalne siły obronne organizmu. Surowcem w zależności od gatunku są: korzeń, ziele lub cała roślina. Jako półprodukty preparatów leczniczych lub gotowe leki stosuje się soki, wyciągi, wodno-alkoholowe i wyciągi wodne (9).

Skład chemiczny poszczególnych surowców z różnych gatunków jeżówek jest niezwykle bogaty i bardzo zróżnicowany w sile oddziaływania biologicznego. Wyodrębniono różne grupy substancji, jak: olejki eteryczne, poliacetyleny, alkamidy, kwasy tłuszczowe, polifenolokwasy, zwłaszcza pochodne kwasu

kawowego i chinowego, polisacharydy i glikoproteiny. Znalezione również dwa alkaloidy pirolizydynowe bez działania hepatotoksycznego (9).

Początkowo działanie lecznicze jeżówek przypisywano składnikom olejków eterycznych. Obecnie za to działanie czyni się odpowiedzialnymi cztery grupy związków: 1) pochodne kwasu kawowego (najsilniejsze działanie immunostymulujące ma kwas cychorynowy, słabsze echinakozyd), 2) oligosacharydy (zwiększają fagocytozę), 3) glikoproteiny (zwiększają aktywność limfocytów B wytwarzających przeciwciała), 4) alkaloidy (zwiększają fagocytozę oraz wykazują aktywność przeciwzapalną) – 9.

Wszystkie badane zioła spośród siedmiu analizowanych pierwiastków zawierają najwyższe ilości wapnia i potasu. Są one około dziesięciokrotnie wyższe niż zawartość pozostałych elementów mineralnych. Ziele jeżówki purpurowej (tab. 3) cechuje największe stężenie wapnia i magnezu, a najmniejsza zawartość potasu w porównaniu z ich zawartością w pozostałych analizowanych surowcach. Należy podkreślić, że w jeżówce purpurowej występuje prawie dwukrotnie większa zawartość magnezu niż w krwawniku pospolitym i babce lancetowatej. Ma to szczególne znaczenie w stymulacji metabolizmu, ponieważ magnez jako „pierwiastek życia” uczestniczy jako aktywator enzymów w ok. 1000 reakcji wewnątrzkomórkowych, w tym w ok. 100 podstawowych, takich jak glikoliza, cykl Krebsa, biosynteza białka, biosynteza kwasów nukleinowych i innych. Uczestniczy również w wielu procesach odpornościowych organizmu ludzkiego i zwierzęcego.

W ziele krwawnika pospolitego stwierdzono szczególnie dużą zawartość sodu, potasu i żelaza w porównaniu z innymi badanymi ziołami. Zwłaszcza terapeutyczne działanie żelaza związane jest z mechanizmem hamowania krwotoków. Rola jego polega też na uzupełnianiu ubytku żelaza, które odgrywa w organizmie jedną z ważniejszych ról (oddychanie wewnątrzkomórkowe – cytochromy, przenoszenie tlenu – hemoglobina, enzymy i białka regulatorowe zawierające ten pierwiastek). Również duże ilości sodu i potasu są niezbędne podczas transportu substratów (np.: kanały jonowe) oraz prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego.

W kilogramie świeżej masy liści babki lancetowatej stwierdzono zawartość sodu, żelaza i cynku zbliżoną do tej, jaka znajduje się w ziele jeżówki purpurowej.

Z dotychczasowych badań wynika, że najwłaściwsze byłoby stosowanie jako dodatków immunostymulacyjnych do pasz roślin świeżych lub suszonych w formie lizawki, odwaru, naparu czy maceratu. Dodatki suszonych ziół wahają się w granicach 0,54-4% paszy pełnodawkowej (4).

WNIOSKI

1. Kwas kawowy może być stosowany jako wskaźnik zawartości kwasów fenolowych w jeżówce purpurowej, krwawniku pospolitym i babce lancetowej, podawanych jako dodatki immunostymulacyjne pasz.
2. Zawartość kwasu kawowego można określić w badanych ziołach przy użyciu metody spektrofotometrycznej z zastosowaniem odczynnika Arnova, techniki elektroforezy cienkokapilarnej (HPCE).
3. Spośród trzech badanych ziół najlepszą przydatność jako proponowany immunostymulator paszowy wykazała jeżówka purpurowa ze względu na najwyższą zawartość kwasów fenolowych.
4. Przydatność jeżówki purpurowej jako immunostymulatora oraz aktywatora metabolizmu potwierdza również fakt obecności w niej dużej zawartości magnezu, który stymuluje ok. 100 podstawowych przemian wewnątrzkomórkowych, w tym również procesów immunologicznych.
5. Krwawnik pospolity zawiera około trzykrotnie wyższą ilość żelaza i około dwukrotnie wyższą ilość sodu i potasu niż pozostałe zioła, toteż wskazany byłby jako dodatek paszowy dla zwierząt, u których mogą wystąpić zaburzenia układu hematologicznego i neurologicznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Borkowski B.: Aktywność biologiczna kwasu kawowego i jego pochodnych. Acta Polonica Pharmaceutica, vol. 49, (5), 89, 1992.
2. Borkowski B., Miłkowska K.: Garbniki, tanoidy i związki pokrewne. Cz. 4. Kawolidy. Herba Polonica, tom XLII (3), 174-181, 1996.
3. Borkowski B., Biesiadecka A., Litwińska B.: Porównanie aktywności wirusostatycznej kwasów: kawowego, chlorogenowego i rozmarynowego. Herba Polonica, tom XLII, (4), 317, 1996.
4. Grela E.: Zioła w żywieniu świń. Trzoda Chlewna, 23, 4, 1996.
5. Jaroniecki W.: Babka lancetowata znana roślina lecznicza. Wiad. Ziel., (4), 10-11, 1993.
6. Jędrzejko K., Kłama H., Żarnowiec J.: Zarys wiedzy o roślinach leczniczych. Śląska Akademia Medyczna w Katowicach, 285, 1997.
7. Kohlünzer S.: Farmakognozja, PZW, 1993.
8. Krzaczek W., Krzaczek T.: Phenolic Acids of Native Species of the Ros L. Genus in Poland. Acta Soc. Bot. Pol., (18), 327, 1978.
9. Lamer-Zarawska E.: Leki roślinne immunotropowe i adaptogenne. Wad. Ziel., 10, 1-7, 1997.
10. Norma Zakładowa ZN-90/MRLGZ/L-10/724. Succus Echinaceae (sok z jeżówki purpurowej), Przemysłowo-Rolne Zakłady Zielarskie „Herbapol” w Kłęce.

11. O ż a r o w s k i A.: Ziołolecznictwo. Rośliny lecznicze stosowane w fitoterapii. PZWL, 44-45, 206-207, Warszawa 1982.
12. S a w i c k a T.: Wpływ kwasów porostowych na sterydoodporność tymocytów myszy.. Herba Polonica, tom XL, (1-2), 31-33, 1994.
13. S t r z e l e c k a H., G l i n k o w s k a G., S k o p i Ń s k a-R ó ż e w s k a E., S o k o l n i c k a I., M a ł k o w s k a-Z w i e r z W., S i k o r s k a E.: Aktywność immunostymulująca wyciągów roślinnych. I. Wpływ wyciągów wodnych wybranych surowców roślinnych na odporność humoralną i komórkową. Herba Polonica, 41, 23-32, 1995.
14. T r e b e n M.: Wracamy do natury – stres na co dzień. SDAR, 23, Warszawa, 1993.
15. W o l s k i T., H e t m a n J., W o l s k i P.: Jeżówka purpurowa cenna roślina o właściwościach leczniczych. Hodowla Roślin i Nasiennictwo, 32-36, 1996.

SUMMARY

Recently, addition of herbs to fodder mixtures for animals as immunomodulating agents has become very popular. However, due to the specificity of both the dose and the way of their submission to animals, the standardization process upon active chemicals is necessary. Phenolic acids content in plant raw material determined on the basis of caffeic acid percentage, can be one of the indices.

Phenolic acids content re-calculated into caffeic acid was determined in coneflower (*Echinacea purpurea* L.), yarrow (*Achillea millefolium* L.) and great plantain (*Plantago lanceolata* L.) through analysis of caffeic acid level by means of high potential capillary electrophoresis (HPCE) and spectrophotometry using Arnov's reagent. Caffeic acid content amounted to 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in con decoction, 67 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in great plantain decoction, 55 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in yarrow decoction, and 71 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in purple coneflower extract. On the basis of caffeic acid percentage in polyphenolic acids, their amount in raw material applied as an addition to fodder was evaluated. Usually, the dose of dried herb addition ranges between 0.54% to 4% of full dose.