

Porównanie zawartości związków fenolowych w wybranych populacjach kuklika pospolitego (*Geum urbanum* L.) pochodzących ze stanowisk naturalnych i z uprawy

Agnieszka Kuczerenko, Katarzyna Bączek, Jarosław L. Przybył, Zenon Węglarz

Laboratorium Nowych Technologii Wytwarzania Produktów Zielarskich i Oceny ich Jakości
Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa, Polska

Abstrakt. Celem pracy było określenie zróżnicowania kuklika pospolitego (*Geum urbanum* L.) pod względem zawartości związków fenolowych (garbników, kwasów fenolowych i eugenolu). Materiałem badawczym były organy podziemne (kłącza z korzeniami) 10 populacji kuklika rosnących na stanowiskach naturalnych i tych samych populacji wprowadzonych do uprawy. Uzyskane surowce analizowano pod względem zawartości związków fenolowych metodą HPLC i eugenolu metodą SPME-GC. W surowcu zidentyfikowano 5 związków z grupy garbników (katechinę, epikatechinę, epigalokatechinę, galusan epikatechiny, galusan epigalokatechiny) oraz kwas elagowy i kwas galusowy, a w olejku eterycznym – eugenol jako dominujący jego składnik. Badane populacje różniły się istotnie pod względem zawartości wszystkich ww. związków, których było nieznacznie więcej w surowcach pochodzących ze stanowisk naturalnych w porównaniu z surowcami pochodzącymi z uprawy.

słowa kluczowe: kuklik pospolity, organy podziemne, garbniki, kwasy polifenolowe, eugenol

WSTĘP

Kuklik pospolity (*Geum urbanum* L.) należy do rodziny różowatych (*Rosaceae*) (Singh, 2010). Jest to bylina dorastająca do 60 cm wysokości z charakterystycznymi karbowanymi liśćmi i drobnymi, żółtymi kwiatami. Organy podziemne zbudowane są z wyraźnego grubego kłącza z licznymi drobnymi korzeniami (Czygan, Hiller, 2004). Gatunek ten występuje obficie na obszarze całej Polski w lasach liściastych i mieszanych, na stanowiskach umiarkowanie wilgotnych, słonecznych lub półcienistych, na glebach zasobnych w składniki pokarmowe (Matuszkiewicz, 2001). Surowcem u kuklika pospolitego

są organy podziemne zawierające duże ilości garbników i olejek eteryczny, którego głównym komponentem jest eugenol. Ze względu na obecność tego związku surowiec wykorzystywany jest jako przyprawa do potraw, stanowiąc namiastkę goździków (Czygan, Hiller, 2004). Zarówno ziele, jak i organy podziemne stosowane są w medycynie ludowej jako lek o właściwościach przeciwbakteryjnych, ściągających i odkażających (Hiller, Melzig, 1999). W homeopatii ekstrakty z kuklika wykorzystywane są natomiast w leczeniu nadmiernej potliwości. Surowce pochodzące z kuklika pospolitego zbierane są wyłącznie ze stanowisk naturalnych, głównie na terenie Europy Wschodniej, a na rynku dostępne są one w postaci suplementów diety (Czygan, Hiller, 2004).

W Katedrze Roślin Warzywnych i Leczniczych SGGW w Warszawie od wielu lat prowadzone są badania dotyczące zróżnicowania dziko rosnących roślin leczniczych i aromatycznych. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki stanowią kontynuację badań nad zmiennością wewnątrz- i międzypopulacyjną kuklika pospolitego, prowadzonych *in situ* i *ex situ* (Kuczerenko i in., 2010, 2011). Celem pracy było określenie różnic w zawartości związków fenolowych w organach podziemnych kuklika (garbników, kwasów fenolowych i eugenolu) pomiędzy 10 populacjami kuklika pospolitego pochodzącymi ze stanowisk naturalnych oraz tymi samymi populacjami wprowadzonymi do uprawy. Wprowadzenie badanych populacji do uprawy pozwoliło, w dużym stopniu, na wykluczenie wpływu czynników środowiskowych (działających w stanowiskach naturalnych) na gromadzenie się związków czynnych w organach surowcowych kuklika, a tym samym na bardziej precyzyjne określenie zmienności chemicznej tych populacji.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na populacjach występujących na Mazowszu (tab. 1). Wiosną 2010 roku z 10 stanowisk naturalnych pobrano po 20 młodych roślin kuklika pospolitego

Autor do kontaktu:

Agnieszka Kuczerenko
e-mail: a.kuczerenko@wp.pl
tel. +48 22 5932247

Praca wpłynęła do redakcji 28 sierpnia 2013 r.

Tabela 1. Położenie geograficzne stanowisk naturalnych badanych populacji kuklika pospolitego.

Table 1. Geographical coordinates of common avens populations.

Populacja Population	Współrzędne geograficzne Geographical coordinates	
Mienia	N 52° 10.134'	E 021° 41.360'
Barcząca	N 52° 08.850'	E 021° 39.045'
Gliniak	N 52° 09.990'	E 021° 33.356'
Mińsk	N 52° 09.930'	E 021° 34.117'
Marianka	N 52° 09.176'	E 021° 34.375'
Laliny	N 51° 58.329'	E 021° 49.354'
Seroczyn	N 51° 59.922'	E 021° 52.192'
Kołodziej	N 52° 00.054'	E 021° 57.497'
Izydory	N 51° 58.140'	E 021° 58.209'
Kienkówka	N 51° 56.876'	E 021° 54.041'

(wykopano 1-roczone siewki z dwoma liśćmi właściwymi), a następnie posadzono je na Polu Doświadczalnym Katedry Roślin Warzywnych i Leczniczych w Wilanowie-Zawadach, w rozstawie 60 x 25 cm. Zbiór surowca przeprowadzono w następnym roku (2011), na początku wegetacji roślin (kwiecień). Z każdej rosnącej na polu populacji wybrano losowo 10 osobników. Organy podziemne tych roślin (kłącza z korzeniami) zważono, wysuszono w temperaturze 35°C, w suszarni typu „Leśniczanka”, sporządzono próbę mieszaną i poddano analizie chemicznej. W analogiczny sposób z roślin o podobnej wielkości losowo zebrano i analizowano surowce z wytypowanych wcześniej stanowisk naturalnych.

W celu określenia zawartości związków fenolowych 1 g powietrznie suchego, sproszkowanego surowca ekstrahowano 100 ml metanolu (metanol cz.d.a. 99,8% firmy POCH), w uniwersalnym urządzeniu ekstrakcyjnym B-811 (Büchi). Ekstrakcję prowadzono przez 25 cykli w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika (64,6°C) przez około 2,5 godziny. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość rozcieńczono w 10 ml metanolu, następnie przefiltrowano przez filtr strzykawkowy Supelco IsoDisc PTFE 25 mm × 0,45 µm i wykonano analizę za pomocą chromatografu cieczowego firmy Shimadzu z detektorem diodowym SPD-M10A VP. Rozdzielenie związków otrzymano poprzez zastosowanie gradientu 10% acetonitrylu zakwaszonego kwasem fosforowym 1% w wodzie (faza A) i 55% acetonitrylu w wodzie (faza B), przy przepływie 1,0 ml × min⁻¹ na kolumnie Luna 5 µm C18 (2) 250 mm × 4,6 mm (Phenomenex). Czas analizy wynosił 30 min. Sygnał z detektora rejestrowano w zakresie długości fali 190–500 nm.

Zastosowano metodę krzywej kalibracyjnej wykreślonej na podstawie powierzchni pików substancji wzorcowych w programie CLASS VP 7.3. Wzorce zakupiono w firmie ChromaDex. Sporządzono metanolowe roztwory podstawowe poszczególnych substancji, postępując zgodnie z instrukcjami producenta (ChromaDex Tech Tip 0003:

Reference Standard Recovery and Dilution). Roztwory podstawowe wzorców sporządzono poprzez przeniesienie ilościowe poszczególnych substancji z fiolek transportowych do kolb miarowych o pojemności 10 ± 0,025 ml klasy A, rozpuszczenie w metanolu o czystości gradientowej do HPLC i uzupełnienie do kreski. Masę substancji wzorcowych wyznaczono odejmując od masy pełnej fiołki transportowej masę fiołki pustej, dokładnie wysuszonej w strumieniu azotu. Każdy tak przygotowany roztwór podstawowy odpipetowano do kolbek miarowych o pojemności 10 ± 0,025 ml klasy A za pomocą automatycznych, jednomicznych pipet o pojemnościach: 10, 50, 100, 200, 500 i 1000 µl i uzupełniono do kreski. Roztwory kalibracyjne nastrzykiwano w ilości 10,0 µl przy użyciu automatycznego podajnika próbek SIL-20A firmy Shimadzu i chromatografowano w opisanych wyżej warunkach. Stworzono tabelę czasów retencji, a także bibliotekę elektronowych widm absorcyjnych poszczególnych związków w zakresie 190–400 nm.

Wyniki zintegrowano przy następujących długościach fali: 206 nm ((+)-katechina, (-)-epikatechina, (-)-galusan epikatechiny, (-)-epigalokatechina, (-)-galusan epigalokatechiny), 254 nm (kwas elagowy), 280 nm (kwas galusowy). Identyfikację pików przeprowadzono na podstawie znanych czasów retencji i widm standardów badanych związków. Zawartość ww. związków określono na podstawie powierzchni pików i podano w mg na 100 g suchego surowca.

Do określenia zawartości eugenolu w organach podziemnych zastosowano technikę mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Przed rozpoczęciem badań zoptymalizowano parametry mikroekstrakcji, które obejmowały wybór:

- rodzaju włókna (50/30 mm DVB/CarboxenTM/PDMS StableFlexTM, 100 mm Polidimethylsiloxane Coating);
- optymalnego czasu ekstrakcji (20, 30, 40 minut);
- optymalnej temperatury ekstrakcji (30, 40, 50, 60°C);
- optymalnego stężenia NaCl w roztworze (5%, 10%, 20%, roztwór bez NaCl).

0,5 g powietrznie suchego surowca umieszczono w szklanym naczyniu o pojemności 15 ml i zalano 5 ml 5% wodnego roztworu NaCl. Do absorpcji lotnych związków użyto włókna Carboxen-polydimethylsiloxane-divinylbenzene (CAR-PDMS-DVB). Ekstrakcję prowadzono w temp. 60°C przez 30 min. Analizę chromatograficzną przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett Packard 6890 Series GC z detektorem FID i kolumną kapilarną Carbowax 20 M (średnica 0,32 mm, długość 25 m, grubość filmu 0,3 µm). Warunki rozdzielania były następujące: temperatura detektora: 250°C, temperatura komory nastrzykowej: 220°C, gaz nośny: hel – 2,3 ml/min, temp. początkowa pieca – 60°C przez 2 min; przyrost temp.: 4°C/min; temp. końcowa: 220°C przez 5 min.

Wszystkie przedstawione wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy warian-

Tabela 2. Zawartość [mg/100 g] zidentyfikowanych związków fenolowych w organach podziemnych roślin pozyskanych ze stanowisk
Table 2. The content of identified phenolic compounds in underground organs of wild growing (N) and cultivated (U) plants [mg/100 g].

Zidentyfikowane związki fenolowe Identified phenolic compounds	Populacje;									
	Gliniak		Marianka		Barcząca		Mienia		Mińsk	
	N	U	N	U	N	U	N	U	N	U
Garbniki Tannins										
(+)-katechyna (+)-catechin	297,8 D	255,8 e	601,7 C	501,4 d	898,5 A	779,8 ab	815,7 B	822,1 a	690,5 C	655,0 c
(-)-epikatechyna (-)-epicatechin	312,3 D	298,7 d	501,6 B	467,0 b	409,8 C	422,3 bc	597,9 A	591,2 a	452,9 C	398,8 c
(-)-epigalokatechyna (-)-epigallocatechin	88,0 D	88,2 d	101,3 C	100,8 c	134,5 B	122,3 b	176,9 A	167,6 a	139,0 B	98,2 c
(-)-galusan epikatechiny (-)-epicatechin gallate	39,0 D	44,2 d	223,9 A	212,5 a	198,6 B	167,9 b	201,1 B	197,6 ab	143,7 C	135,3 c
(-)-galusan epigalokatechiny (-)-epigallocatechin gallate	76,5 C	66,0 de	85,2 C	81,2 d	266,0 B	271,2 b	321,7 A	320,2 a	229,8 B	217,0 c
Kwasy polifenolowe Polyphenolic acids										
elagowy elagic	88,0 C	81,5 c	157,8 A	145,2 a	100,8 B	98,8 b	54,3 D	55,2 d	100,9 B	101,1 b
galusowy gallic	54,8 D	55,1 d	154,2 A	142,3 a	139,7 A B	142,4 a	131,9 B	129,2 b	112,4 C	100,8 c

Jednakowymi literami (dużymi dla surowców ze stanowisk naturalnych, małymi dla surowców z uprawy) oznaczono w wierszach wartości nie różniące się
The values marked with the same letters (capital for raw materials from natural sites and small for raw materials from cultivation) don't differ significantly at

cji w programie Statgraphics Plus wersja 4.1, z zastosowaniem testu Tukeya, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DYKUSJA

Organy podziemne kuklika pospolitego stanowią interesujący surowiec leczniczy ze względu na wysoką zawartość związków fenolowych, w szczególności (+)-katechiny i jej pochodnych, a także surowiec przyprawowy ze względu na obecność w nim eugenolu (Czygan, Hiller, 2004; Strzelecka, Kowalski, 2000; Hiller, Melzig, 1999).

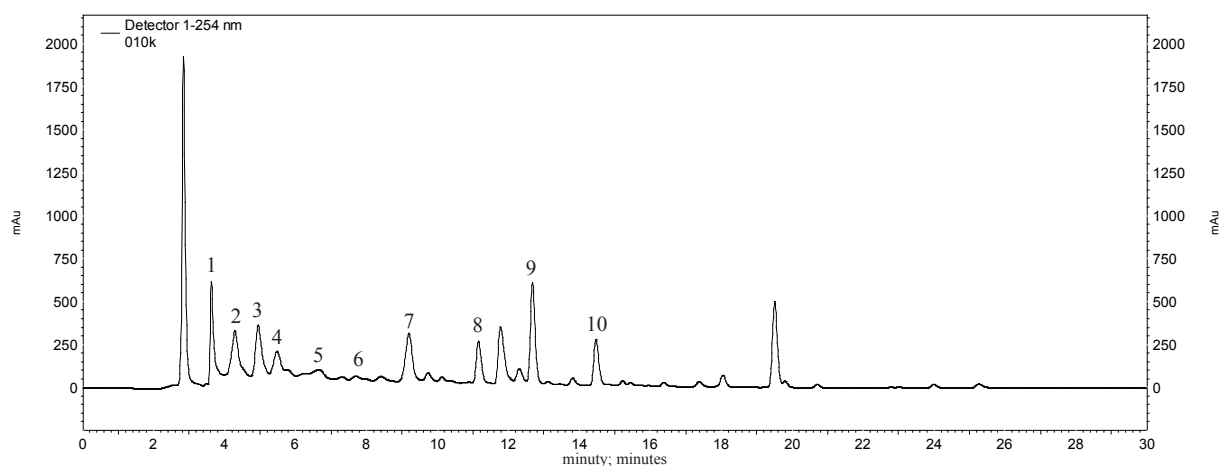
W organach podziemnych populacji kuklika pospolitego będących obiektami badań w tej pracy zidentyfikowano 5 związków z grupy garbników katechinowych, tj.: (+)-katechinę, (-)-epikatechinę, (-)-epigalokatechinę, (-)-galusan epikatechiny, (-)-galusan epigalokatechiny, 2 kwasy fenolowe, tj.: kwas elagowy i galusowy (rys. 1), oraz eugenol, składnik olejku eterycznego, należący także do fenoli (rys. 2).

Badane populacje różniły się istotnie pod względem zawartości tych związków (tab. 2). Kuklik pochodzący ze stanowiska naturalnego Barcząca charakteryzował się szczególnie wysoką zawartością (+)-katechiny (898,47 mg/100 g). Surowiec ze stanowiska Mienia zawierał natomiast najwięcej (-)-epikatechiny (597,88 mg/100 g), (-)-epigalokatechiny (176,89 mg/100 g) i (-)-galusanu epigalokatechiny (321,67 mg/100 g). Najwyższą zawartością (-)-galusanu epikatechiny (223,87 mg/100 g), kwasu elagowego (157,80 mg/100 g) i kwasu galusowego (154,17 mg/100 g) odznaczały się organy podziemne roślin ze stanowiska Marianka. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia Kuczerenko i in. (2010) na temat różnic chemicznych pomiędzy dziko rosnącymi populacjami kuklika pospolitego. O wartości przyprawowej kłączy kuklika pospolitego w największym stopniu decyduje obecność w nich eugenolu (Czygan, Hiller, 2004). Badane populacje kuklika różniły się wyraźnie zawartością tego związku. Najwięcej eugenolu stwierdzono w surowcu pochodzącym

naturalnych (N) i z uprawy (U)

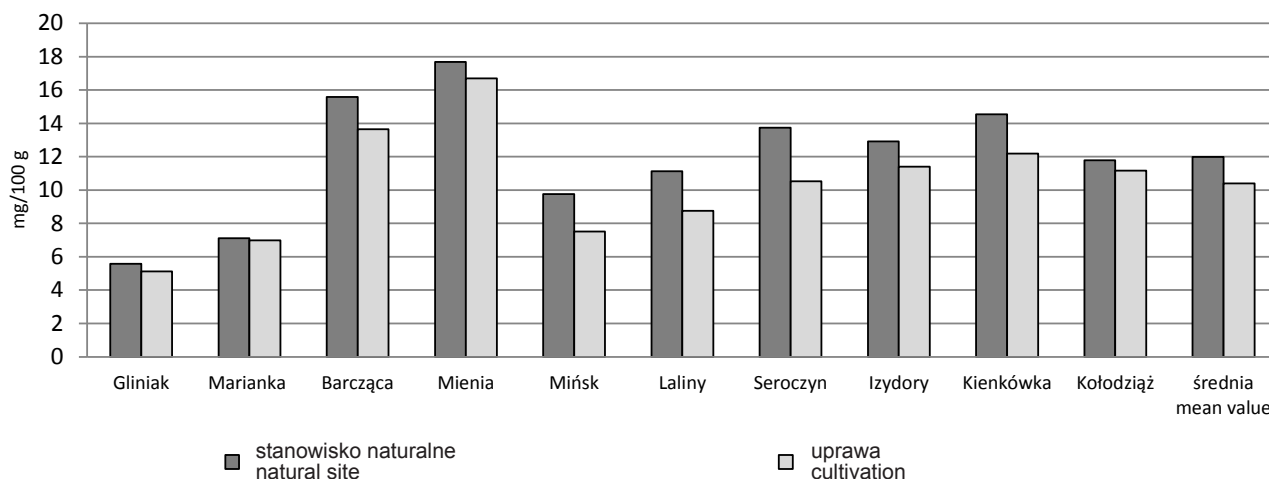
Populations										Średnia	
Laliny		Seroczyn		Izydory		Kienkówka		Kołodziej		Mean value	
N	U	N	U	N	U	N	U	N	U	N	U
201,6 E	201,0 f	122,0 F	123,5 h	183,3 E	169,9 g	278,9 D	254,4 e	147,2 F	134,0 h	423,7	389,7
172,3 F	169,8 e	118,3 G	111,9 fg	147,2 FG	129,9 f	245,5 D	241,9 d	100,6 H	98,3 g	305,8	293,0
50,9 E	48,4 e	35,9 F	34,2 f	43,4 F	44,4 e	55,5 E	51,4 e	40,9 F	41,2 e	86,6	79,6
40,7 E	38,5 e	39,3 E	35,4 e	50,5 D	48,8 d	45,9 E	45,1 d	31,1 E	31,0 e	101,4	95,6
43,2 E	41,0 f	55,9 E	51,6 e	38,7 E	38,2 f	29,6 F	27,9 f	50,9 D	49,4 e	119,7	116,4
25,9 E	21,3 f	25,9 E	21,0 f	32,3 E	30,9 e	28,9 E	29,5 e	21,7 E	22,6 f	63,6	60,7
38,0 E	38,1 e	35,9 E	32,1 e	41,9 E	41,1 e	55,7 E	51,0 d	39,3 E	40,9 e	80,4	77,3

istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$ wg testu Tukeya
 $\alpha = 0.05$ according to Tukey's test.



1 – kwas galusowy, gallic acid; 2 – (-)-epigalokatechina, (-)-epigallocatechin; 3 – (+)-katechina, (+)-catechin; 4 – kwas chlorogenowy, chlorogenic acid; 5 – (-)-epikatechina, (-)-epicatechin; 6 – kwas kawowy (kwas 3-4-dihydroksycynamonowy), caffeic acid (3-4-Dihydroxycinnamic acid); 7 – (-)-galusan epigalokatechiny, (-)-epigallocatechin galate FN37; 8 – (-)-galusan epikatechiny, (-)-epicatechin gallate FN35; 9 – kwas elagowy, ellagic acid; 10 – astragalina (3-O-glukozyd kemferolu), astragalol (Kaempferol-3-O-glucoside)

Rysunek 1. Przykładowy chromatogram ekstraktu z organów podziemnych kuklika pospolitego
 Figure 1. A model chromatogram of common avens underground organs extract.



Jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$ wg testu Tukeya
The values marked with the same letters don't differ significantly at $\alpha = 0,05$ according to Tukey's test

Rys. 2. Zawartość eugenolu w organach podziemnych roślin ze stanowisk naturalnych i z uprawy [mg/100 g]
Fig. 2. The content of eugenol in underground organs of plants from natural sites and from cultivation [mg/100 g].

ze stanowiska Mienia (17,68 mg/100 g), a najmniej ze stanowiska Gliniak (5,57 mg/100 g) (rys. 2).

Ze względu na wymagania przemysłu fitofarmaceutycznego i spożywczego odnośnie jakości i cen surowców zielarskich przeznaczonych do przetwórstwa, dziko rosnące rośliny lecznicze coraz częściej wprowadzane są do uprawy mimo dość powszechnej opinii o wyższej jakości surowców „dzikich”. Wyniki dotychczasowych badań dotyczących porównywania jakości surowców pochodzących ze stanowisk naturalnych i z uprawy są jednakże niejednoznaczne. Doświadczenia prowadzone na dziurawcu pospolitym (*Hypericum perforatum* L.) (Osińska, 2004) wykazały brak zależności pomiędzy pochodzeniem surowca a zawartością hiperycyny i związków fenolowych. Badania dotyczące kocanek piaskowych (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.) (Sawilska, 2010; Sawilska, Mielcarek, 2009) wskazują na wyższą zawartość flawonoidów w materiale pochodzącym z uprawy oraz na wyższą zawartość kwasów fenolowych w surowcu ze stanowisk naturalnych.

Kuklik pospolity dotychczas pozyskiwany był wyłącznie ze stanowisk naturalnych. Wyniki badań przedstawione w tej pracy wskazują, że zawartość oznaczonych związków fenolowych w surowcu pochodzącym ze stanowisk naturalnych była wyższa niż z uprawy, ale tylko w nieznanym stopniu. Wydaje się jednak że surowiec pochodzący z uprawy, znacznie łatwiejszy do standaryzacji, jest bardziej atrakcyjny dla przemysłu fitofarmaceutycznego i spożywczego.

WNIOSKI

1. Badane populacje kuklika pospolitego różniły się istotnie pod względem zawartości wszystkich badanych związków fenolowych.
2. Surowcem najbardziej zasobnym w związki fenolowe były organy podziemne roślin ze stanowiska Mienia.
3. Zawartość związków fenolowych w surowcach ze stanowisk naturalnych była nieco większa niż w surowcach pozyskanych z tych samych populacji kuklika przeniesionych do uprawy.

PIŚMIENNICTWO

- Czygan F.C., Hiller K., 2004.** *Gei urbani rhizoma*. W: Herbal drugs and phytopharmaceuticals; (ed.) Wichtl M., 3rd Ed. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, ss. 243-244.
- Hiller K., Melzig M.F., 1999.** Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, ss. 359-360.
- Kuczerenko A., Węglarz, Z., Przybył, J.L., 2010.** Chemical variability of wild growing *Geum urbanum* L. Acta Hort. (ISHS), 860: 113-117.
- Kuczerenko A., Przybył J.L., Sarniak D., Bączek K., Węglarz Z., 2011.** Accumulation of biologically active compounds in above- and underground organs of common avens (*Geum urbanum* L.). Acta Hort. (ISHS), 925: 193-197.

- Matuszkiewicz J.M., 2001.** Zespoły leśne Polski. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, ss. 181-267.
- Osińska E., 2004.** Zmienność krajowych dziko rosnących populacji dziurawca (*Hypericum* sp.) w warunkach ich uprawy. Wyd. SGGW, Warszawa.
- Sawilska A.K., 2010.** The influence of habitat and cultivation conditions on generative shoot production of sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) and the content of flavonoid compounds in their inflorescences. *Herba Pol.*, 56(1): 19-27.
- Sawilska A.K., Mielcarek S., 2009.** The content of flavonoids and polyphenolic acids in inflorescences of sandy everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) from natural stands and plantations. *Herba Pol.*, 55(3): 118-126.
- Singh G., 2010.** Plant systematics. An integrated approach. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, ss. 563-566.
- Strzelecka H., Kowalski J., 2000.** Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 261-262.

A. Kuczerenko, K. Bączek, J.L. Przybył, Z. Węglarz

INTRASPECIFIC VARIABILITY OF WILD GROWING
AND CULTIVATED COMMON AVENS (*GEUM URBANUM* L.)
IN RESPECT OF ACCUMULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS

Summary

Ten populations of common avens (*Geum urbanum* L.) were compared for the content of phenolic compounds (tannins, phenolic acids and eugenol) in the underground organs of plants growing either at their natural sites or farm-cultivated. Five tannin compounds, namely: catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate, 2 phenolic acids, i.e.: ellagic and gallic acids were identified by using HPLC and eugenol – by SPME-GC. The investigated populations differed for the content of all detected phenolic compounds. The raw materials originating from natural sites were characterized by slightly higher content of all identified substances in comparison to those from cultivation.

key words: common avens, underground organs, tannins, polyphenolic acids, eugenol