

## **Analiza zawartości flawonoidów i kwasów fenolowych o działaniu leczniczym**

### **w koniczynie inkarnatce (*Trifolium incarnatum* L.)**

### **Analysis of content of pharmacologically active flavonoids and phenolic acids in crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.)**

\*Magdalena Majcher, \*Joanna Rataj, \*\*Weronika Wojnar, \*\*Maria Zych,  
\*Jerzy Bukowczan, \*Marlena Zagwoźdżon, \*Justyna Petelewicz,  
\*\*Ilona Kaczmarczyk-Sedlak

\*Studenckie Towarzystwo Naukowe, Koło Naukowe Katedry Farmakognozji i Fitochemii

\*\*Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny  
Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200  
Sosnowiec, e-mail: farmafit@sum.edu.pl

---

**Słowa kluczowe:** koniczyna inkarnatka, związki flawonoidowe, chromatografia, spektrofotometria  
**Keywords:** crimson clover, flavonoids compounds, chromatographic conditions, spectro-  
photometry

---

### **Streszczenie**

Koniczyna inkarnatka (*Trifolium incarnatum* L.) jest rośliną należącą do rodziny bobowatych (*Fabaceae*), do której zalicza się również inne gatunki *Trifolium*, takie jak koniczyna czerwona (*Trifolium pratense* L.) i koniczyna biała (*Trifolium repens* L.). W medycynie stosowana jest przede wszystkim koniczyna czerwona, gdyż zawiera m.in. flawonoidy i kwasy fenolowe, którym zawdzięcza swoją aktywność biologiczną. Koniczyna inkarnatka jest obecnie wczesnym źródłem nektaru do produkcji miodu przez pszczoły, zielonym nawozem oraz rośliną pastewną. Ponieważ wiele roślin z rodziny bobowatych stosowanych jest w medycynie, można podejrzewać, że koniczyna inkarnatka również może zawierać cenne związki farmakologicznie czynne, które mogą znaleźć zastosowanie w terapii różnych schorzeń. Celem niniejszej pracy była optymalizacja metod izolacji, analizy chromatograficznej oraz wstępna identyfikacja flawonoidów i kwasów fenolowych obecnych w ziele i nasionach *Trifolium incarnatum* L. Ilościowe oznaczanie zawartości flawonoidów przeprowadzono metodą spektrofotometryczną, natomiast identyfikacji związków dokonano przy użyciu jednokierunkowej i dwukierunkowej chromatografii cienkowsarstwowej. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że ziele koniczyny inkarnatki zawiera więcej związków flawonoidowych niż jej nasiona. Dzięki analizie chromatograficznej w ziele stwierdzono obecność wielu farmakologicznie czynnych flawonoidów oraz fenolokwasów. Nasiona badanej rośliny okazały się o wiele bardziej ubogie w związki farmakologicznie czynne. Powyższe wyniki wskazują, że koniczyna inkarnatka, po bardziej dokładnych analizach fitochemicznych, może stać się cennym źródłem surowca zielarskiego i farmaceutycznego.

### Summary

Crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) is a plant belonging to fabaceae family, which also includes other *Trifolium* species, such as red clover (*Trifolium pratense* L.) or white clover (*Trifolium repens* L.). In medicine the mainly used species is red clover, due to the pharmacologically active compounds such as flavonoids or phenolic acids. Nowadays, crimson clover is used as source of honey, green manure and fodder plant. Since many Fabaceae plants are used in medicine, it can be assumed that crimson clover may also provide valuable compounds useful in the therapy of various diseases. The aim of the study was to optimize isolation methods, chromatographic conditions, and preliminary identification of flavonoids and phenolic acids in the herb and seeds of *Trifolium incarnatum* L. Quantitative analysis of flavonoids was conducted spectrophotometrically, while identification of active compounds was performed using the 1D and 2D TLC. Obtained results indicate, that herb of crimson clover contains more flavonoids than the seeds. In the TLC analysis of the herb, many flavonoids and phenolic acids were found. Seeds of the test plants contained far fewer pharmacologically active compounds than the herb. It can be concluded, that crimson clover, after more complex phytochemical analyses, may become a valuable pharmaceutical.

### Wstęp

Właściwości lecznicze koniczyny odkryły ludy zamieszkujące Amerykę Południową, a pierwsze wzmianki o jej leczniczym zastosowaniu można znaleźć w dziele św. Hildegardy z Bingen (1098–1179) pt. *Physica* [1].

Koniczyna należy do rodziny *Fabaceae* (Bobowate). Do najlepiej zbadanych gatunków koniczyny zalicza się koniczynę łąkową (*Trifolium pratense* L.) i koniczynę białą (*Trifolium repens* L.). Koniczyna łąkowa stosowana była w medycynie ludowej do leczenia stanów zapalnych błon śluzowych i chorób skóry. Aktywność biologiczna koniczyny związana jest głównie z obecnością flawonoidów, kumaryn oraz kwasów fenolowych. Natomiast fitoestrogeny zawarte w koniczynie łąkowej hamują rozwój chorób układu krążenia, nowotworów oraz zapobiegają postępującej osteoporozie. Związki te wpływają także korzystnie na łagodzenie objawów przekwitania u kobiet [2, 3].

Koniczyna inkarnatka (*Trifolium incarnatum* L.) jest nazywana inaczej koniczyną szkarłatną lub krwistoczerwoną. Koniczyna inkarnatka początkowo była uprawiana w XVIII wieku we Włoszech, Szwajcarii oraz południowej Francji. W Stanach Zjednoczonych została wprowadzona jako roślina paszowa pod koniec XIX wieku. Naturalne siedliska koniczyny inkarnatki to cieplejsze rejony basenu Morza Śródziemnego [4]. W Kalifornii koniczyna inkarnatka jest najczęściej wysiewana wraz z koniczyną łąkową w sadach oraz gajach orzechowych w celu zmniejszenia erozji gleby oraz dostarczania azotu do gleby [5]. Koniczyna inkarnatka wytwarza

również duże ilości wonnego nektaru, który wabi różne gatunki owadów, m.in. pszczoły, pluskwiaki i chrząszcze. Z tego powodu stosowana jest jako wczesne źródło miodu [6].

Koniczyna inkarnatka to prosta, wzniesiona, jednoroczna lub dwuletnia roślina (Rys. 1). Osiąga od 20 cm do 40 cm wysokości. W bardzo sprzyjających warunkach może wzrosnąć nawet do 60 cm. Roślina jest kosmato, miękko owłosiona. Ulistnienie jest jasnozielone, pokryte delikatnymi włoskami. Liście są 3-listkowe, szerokie. Najszerze powyżej połowy, listki odwrotnie jajowate, mogą osiągać od 5–30 mm długości. Koniczyna inkarnatka ma najdłuższe liście ze wszystkich gatunków koniczyny [7]. Przylistki są jajowate, niewyraźnie ząbkowate. Łodyga tej koniczyny jest pojedyncza, gruba, zazwyczaj nierozgałęziona. Podobnie jak liście jest owłosiona. *T. incarnatum*, wśród innych gatunków koniczyny, wyróżnia się wydłużonym, bordowym lub jasnokarmazynowym kwiatem. Kwiatostan jest szczytowy, długoszypułkowy, gęsty, zebrany w cylindryczne główki osiągające nawet do 6 cm długości. Główki pojedyncze, jajowate potem podługowato-walcowate. Koniczyna inkarnatka kwitnie od maja do sierpnia. Kielich jest owłosiony, nieznacznie krótszy od korony, 7–10 mm długości. Działki kielicha są cylindryczne, prążkowane a ząbki kielicha gwiazdkowato odgięte. Korona ma 10–12 mm długości i najczęściej nie przekracza kielicha. Nasiona u tego gatunku koniczyny są małe, wielkości około 3 mm, koloru od kremowego do jasnobrązowego, kształtu owalnego lub okrągłego [7, 8].

Koniczyna inkarnatka posiada korzeń palowy z wieloma drobnymi, rozgałęzionymi korzeniami bocznymi. Taki układ korzeni pozwala czerpać wodę z głębokich warstw gleby, dzięki czemu roślina może przetrwać długotrwałe okresy suszy [9].

Rośliny należące do rodziny bobowatych, w tym koniczyna łąkowa (*Trifolium pratense*) i soja (*Glycine max*) są bogate w związki flawonoidowe szeroko wykorzystywane w lecznictwie. Koniczyna inkarnatka, również należąca do rodziny bobowatych, będąca źródłem związków flawonoidowych, w przyszłości może mieć zastosowanie w terapii różnych schorzeń.

Celem niniejszej pracy była optymalizacja metod izolacji, analizy chromatograficznej oraz wstępna identyfikacja flawonoidów i kwasów fenolowych obecnych w ziele i nasionach koniczyny inkarnatki.



**Rysunek 1.** Koniczyna inkarnatka (*Trifolium incarnatum* L.)  
Źródło: Wikipedia

## **Materiał i metody**

### **Materiał roślinny**

Surowcem roślinnym wykorzystanym do badań było ziele oraz nasiona koniczyny inkarnatki (*Trifolium incarnatum* L.) produkcji firmy Małopolska Hodowla Roślin – HBP sp. z o.o. Nasiona wysiano w Ogrodzie Botanicznym w Mikołowie końcem kwietnia 2012 r. W sierpniu 2012 r. zebrano kwitnące ziele, które wysuszono w temperaturze pokojowej, w cieniu, w przewiewie. Przed wykonywaniem badań wysuszone ziele fragmentowano, a następnie, podobnie jak nasiona, mielono.

### **Ilościowe oznaczanie zawartości flawonoidów w ziele i nasionach koniczyny inkarnatki**

Procentową zawartość flawonoidów w koniczynie w przeliczeniu na kwercetynę przeprowadzono metodą spektrofotometryczną opisaną w Farmacopea Polska VI [10].

### **Optymalizacja metod ekstrakcji flawonoidów i kwasów fenolowych z ziele i nasion koniczyny inkarnatki**

W celu opracowania najlepszej metody izolacji flawonoidów i kwasów fenolowych z koniczyny inkarnatki wykonano ekstrakcję różnymi metodami,

otrzymując cztery różne wyciągi – wyciąg A, B, C i D. Następnie otrzymane wyciągi poddano analizie metodą chromatografii cienkowarstwowej jednokierunkowej i dwukierunkowej z zastosowaniem różnych układów rozwijających. Do analizy chromatograficznej wykorzystano płytki TLC silica gel 60 F254. Każdą analizę fitochemiczną wykonano trzy razy.

**Wykaz identyfikowanych flawonoidów:** apigenina, biochanina A, chryzyna, daidzeina, formononetyna, genisteina, glabridina, hesperydyna, izoramnetyna, kemferol, kwercetyna, luteolina, mirycetyna, naryngenina, ramnetyna, rutozyd.

**Wykaz identyfikowanych fenolokwasów:** kwas chlorogenowy, kwas ferulowy, kwas homowanilinowy, kwas kawowy, kwas *p*-kumarowy, kwas szikimowy.

### **Ekstrakcja metanolowa (wyciąg A)**

**Badany surowiec roślinny: ziele**

Odważono 3 g surowca, dodano 20 cm<sup>3</sup> metanolu o odpowiednim stężeniu (50%, 70% lub 99,9%) i ogrzewano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 10 minut. Otrzymane wyciągi wirowano przez 15 minut [11].

### **Ekstrakcja z odseparowaniem frakcji lipidowej za pomocą eteru naftowego (wyciąg B)**

**Badany surowiec roślinny: ziele, nasiona**

Roztarty surowiec zalano 20 cm<sup>3</sup> 80% etanolu i pozostawiono w lodówce na 72 godziny. Po zwirowaniu suchą pozostałość zawieszono w 10 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Następnie dodano 10 cm<sup>3</sup> eteru naftowego w celu wyekstrahowania i usunięcia frakcji lipidowej. Po 10 minutach ekstrakcji wodną warstwę wyciągu odparowano na łaźni wodnej do suchej masy. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w 2,5 cm<sup>3</sup> 80% etanolu [12].

### **Ekstrakcja z hydrolizą glikozydów flawonoidowych (wyciąg C)**

**Badany surowiec roślinny: ziele, nasiona**

Do 2 g zmielonego materiału roślinnego dodano 2 cm<sup>3</sup> 2M kwasu chlorowodorowego oraz 10 cm<sup>3</sup> acetonitrylu. Kolbę wytrząsano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Otrzymany wyciąg odparowano na łaźni wodnej do suchej masy, którą rozpuszczono w 10 cm<sup>3</sup> 80% metanolu i zagęszczono

do objętości około 2 cm<sup>3</sup> [13; zmodyfikowany]. W ten sposób otrzymano wyciąg C. Do analizy chromatograficznej związków flawonoidowych ziela zastosowano zarówno świeży wyciąg C, jak i wyciąg C mrożony. W przypadku nasion zastosowano tylko świeży wyciąg C.

Dokonano również modyfikacji podanej powyżej metody hydrolizy glikozydów flawonoidowych.

- Modyfikacja 1 – zmniejszenie ilości acetonitrylu do 5 cm<sup>3</sup> i ilości 80% metanolu do 5cm<sup>3</sup>.
- Modyfikacja 2 – zmniejszenie ilości 80% metanolu do 5 cm<sup>3</sup> i zagęszczeniu wyciągu do objętości 1 cm<sup>3</sup>.
- Modyfikacja 3 – zwiększenie ilości surowca roślinnego do 4 g oraz objętości odczynników – acetonitrylu do 20 cm<sup>3</sup> i 2 M kwasu chlorowodorowego do 4 cm<sup>3</sup>. Dodatkowo zmniejszono ilość 80% metanolu do 5 cm<sup>3</sup>.

### **Ekstrakcja metodą opisaną w Farmakopei Polskiej VI (wyciąg D)**

#### **Badany surowiec roślinny: ziele**

Do 0,25 g sproszkowanego ziela dodano 25 cm<sup>3</sup> metanolu i ogrzewano przez 30 minut [10].

### **Wykaz układów rozwijających zastosowanych w metodzie chromatografii cienkowarstwowej jednokierunkowej**

1. Dichlorometan: izopropanol  
28,75 : 1,25 v/v [12]
2. Toluen: chloroform : aceton  
40 : 25 : 35 v/v [14]
3. Octan etylu: kwas octowy : kwas mrówkowy : woda  
100 : 11 : 11 : 27 v/v [15]
4. Chloroform: aceton : kwas mrówkowy  
75 : 16,5 : 8,5 v/v [16]
5. Benzen: kwas octowy : woda  
125 : 72 : 3 v/v [17]
6. Chloroform: aceton : 25% amoniak  
50 : 50 : 1v/v [17]

7. Metanol: dichlorometan : woda : kwas mrówkowy  
70,5 : 25 : 4,5 : 1 v/v [18]
8. Chloroform: metanol : octan etylu : woda  
16,2 : 18,8 : 52 : 3 v/v [18]
9. Toluen: octan etylu : kwas mrówkowy : woda  
1 : 9 : 2,5 : 2 v/v [19]
10. Toluen: octan etylu : kwas octowy  
14 : 6 : 1 v/v [20]
11. Octan etylu: metyloetyloketon : kwas mrówkowy : woda  
50 : 30 : 10 : 10 v/v [21]
12. N – propanol: metanol : woda  
4 : 1 : 4 v/v [22]
13. Octan etylu: metanol : woda  
100 : 17 : 13 v/v [11]

### **Wykaz układów rozwijających zastosowanych w metodzie chromatografii cienkowarstwowej dwukierunkowej**

W celu dokładniejszego rozdzielania związków zawartych w wyciągach w koniczynie inkarnatce zastosowano dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową. Zestawienie układów rozwijających zastosowanych w tej metodzie przedstawia Tabela 1.

**Tabela 1.** Układy rozwijające użyte w metodzie TLC dwukierunkowej

Lp.	Kierunek 1	Kierunek 2
1.	Dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v	Toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v
2.	Toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v	Dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v
3.	Dichlorometan : izopropanol 28,5 : 1,5 v/v	Toluen : chloroform : aceton 40: 25 : 35 v/v
4.	Dichlorometan : izopropanol 25 : 5 v/v	Toluen : chloroform : aceton 40: 25 : 35 v/v
5.	Dichlorometan : izopropanol 28,65 : 1,25 v/v	Octan etylu : kwas octowy : kwas mrówkowy : woda 100 : 11 : 11 :27 v/v
6.	Dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v	Chloroform : aceton : kwas mrówkowy 75 : 16,5 : 8,5 v/v

Lp.	Kierunek 1	Kierunek 2
7.	Dichlorometan 30 v/v	Toluen : chloroform : aceton 40: 25 : 35 v/v
8.	Toluen : chloroform : aceton 40 : 25 :35 v/v	Octan etylu : kwas octowy : kwas mrówkowy : woda 100 : 11 : 11 : 27 v/v
9.	Toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v	Chloroform : aceton : kwas mrówkowy 75 : 16,5 : 8,5 v/v

## Wyniki

### Wyniki ilościowego oznaczania zawartości flawonoidów w ziele i nasionach koniczyny inkarnatki

Procentowa zawartość związków flawonoidowych w przeliczeniu na kwercetinę wynosiła dla ziela i nasion odpowiednio 0,332 % i 0,033 % flawonoidów.

### Wyniki oznaczeń fitochemicznych ekstraktów koniczyny inkarnatki metodą chromatografii cienkowarstwowej jednokierunkowej

Na podstawie przeprowadzonych analiz metodą chromatografii cienkowarstwowej jednokierunkowej stwierdzono, że w wyciągu A, otrzymanym z zastosowaniem metanolu o stężeniu 70%, występują flawonoidy, jednak nie było możliwości zidentyfikowania konkretnych związków. Ekstrakty wykonane przy użyciu metanolu o stężeniach 50% i 99,9% nie pozwalały na analizę zawartości flawonoidów i kwasów fenolowych w badanym materiale roślinnym.

Ekstrakcja z usunięciem frakcji lipidowej przy użyciu eteru naftowego (wyciąg B) nie była odpowiednia do analizy składu fitochemicznego badanego surowca.

Najlepszą metodą ekstrakcji była hydroliza kwasowa (wyciąg C). Modyfikacje, polegające na zmianach ilości dodawanego kwasu chlorowodorowego lub acetonitrylu, nie poprawiały jakości uzyskanego ekstraktu. Mrożenie uzyskanego ekstraktu również nie wpłynęło na zawartość związków aktywnych w wyciągu. Najlepszymi układami do rozdzielania flawonoidów i związków fenolowych w wyciągu C były:

- Dichlorometan: izopropanol 28,75 : 1,25 v/v



## Analiza zawartości flawonoidów i kwasów fenolowych...

- Toluen: chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v
- Chloroform: aceton : kwas mrówkowy 75 : 16,5 : 8,5 v/v

W wyciągu D również stwierdzono flawonoidy i niektóre kwasy fenolowe, a najlepszym układem rozwijającym umożliwiającym ich rozdział był układ:

- Octan etylu : kwas octowy : kwas mrówkowy : woda 100 : 11 : 11 : 27 v/v

Pozostałe układy użyte do analizy chromatograficznej nie pozwoliły na odpowiednią analizę fitochemiczną ekstraktów otrzymanych z ziela i nasion koniczyny inkarnatki.

W Tabeli 2 przedstawiono związki chemiczne zidentyfikowane w wyciągu C i D za pomocą chromatografii jednokierunkowej.

**Tabela 2.** Wyniki oznaczeń fitochemicznych ekstraktów otrzymanych z ziela i nasion koniczyny inkarnatki wykonanych metodą chromatografii cienkowarstwowej jednokierunkowej

Wyciąg	Surowiec roślinny	Układ rozwijający	Zidentyfikowane flawonoidy i kwasy fenolowe
Wyciąg C	ziele	dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v	daidzeina, formononetyna, genisteina, hesperydyna, kemferol, kwas ferulowy, kwercetyna
		toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v	daidzeina, formononetyna, genisteina, kemferol, kwas ferulowy
		chloroform : aceton : kwas mrówkowy 75 : 16,5 : 8,5 v/v	apigenina, daidzeina, formononetyna, kwercetyna
	nasiona	dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25	daidzeina, formononetyna
		toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v	daidzeina, formononetyna
Wyciąg D	ziele	octan etylu : kwas octowy : kwas mrówkowy: woda 100 : 11 : 11 : 27 v/v	apigenina, kwercetyna

Wyciąg C – wyciąg otrzymany metodą ekstrakcji z hydrolizą glikozydów flawonoidowych [13]

Wyciąg D – wyciąg otrzymany metodą opisaną w Farmakopei Polskiej VI [10]

Zastosowanie odczynnika wywołującego (Natural product reagent) znacznie ułatwiło identyfikację wyizolowanych flawonoidów i kwasów fenolowych w materiale roślinnym.

## Wyniki oznaczeń fitochemicznych ekstraktów koniczyny inkarnatki metodą chromatografii cienkowsarstwowej dwukierunkowej

Analizę chromatograficzną dwukierunkową przeprowadzono z wykorzystaniem wyciągu C otrzymanym z ziele, a zidentyfikowane związki przedstawiono w Tabeli 3.

**Tabela 3.** Wyniki oznaczeń fitochemicznych ekstraktów otrzymanych z ziele koniczyny inkarnatki wykonanych metodą chromatografii cienkowsarstwowej dwukierunkowej

Wyciąg	Surowiec roślinny	Układ rozwijający	Zidentyfikowane flawonoidy i kwasy fenolowe
Wyciąg C	Ziele	1 kierunek – dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v, 2 kierunek – toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v	apigenina, daidzeina, formononetyna, genisteina, glabridina, hesperydyna, kemferol, kwas ferulowy
		1 kierunek – toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v, 2 kierunek – dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v	biochanina A, daidzeina, formononetyna, genisteina, glabridina, kwas ferulowy
		1 kierunek – toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v, 2 kierunek – chloroform : aceton : kwas mrówkowy 75 : 16,5 : 8,5 v/v	apigenina, formononetyna, kwas ferulowy, luteolina

Wyciąg C – wyciąg otrzymany metodą ekstrakcji z hydrolizą glikozydów flawonoidowych [13]

### Dyskusja

Materiałem badawczym w niniejszej pracy było ziele i nasiona koniczyny inkarnatki (*Trifolium incarnatum* L.). Większą zawartością flawonoidów charakteryzowało się ziele koniczyny inkarnatki (0,332%). Nasiona zawierały 10 razy mniej flawonoidów (0,033%), dlatego większość badań została przeprowadzona na ziele badanej rośliny.

Przeprowadzona analiza fitochemiczna opierała się na badaniach z wykorzystaniem chromatografii cienkowsarstwowej jednokierunkowej i chromatografii cienkowsarstwowej dwukierunkowej. W chromatografii cienkowsarstwowej jednokierunkowej najlepszym układem rozwijającym do rozdzielania flawonoidów i kwasów fenolowych zawartych w koniczynie inkarnatce był układ dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v [12]. Układ ten pozwolił na zidentyfikowanie w ziele koniczyny inkarnatki 7 związków czynnych: daidzeiny, formononetyny, genisteiny, hesperydyny, kemferolu, kwasu ferulowego, kwercetyny. Kolejny układ to: toluen : chloroform : ace-

ton 40 : 25 : 35 v/v [14]. Pozwolił wykryć w badanym materiale roślinnym 5 związków czynnych: daidzeinę, formononetynę, genisteinę, kemferol, kwas ferulowy. Innym układem o równie dobrej rozdzielczości okazał się układ chloroform : aceton : kwas mrówkowy 75 : 16,5 : 8,5 v/v [16]. Umożliwił on identyfikację 4 związków czynnych: apigeninę, daidzeinę, formononetynę, kwercetynę. Kolejnym układem, który pozwolił na wyodrębnienie związków czynnych z zieleń koniczyny inkarnatki w metodzie chromatografii cienkwarstwowej jednokierunkowej był układ: octan etylu : kwas octowy : kwas mrówkowy : woda 100 : 11 : 11 : 27 v/v [15]. Przy zastosowaniu tego układu wykryto w badanym zieleń jedynie 2 związki aktywne – apigeninę i kwercetynę. Jednak na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że układ ten jest nieodpowiedni do rozdzielania flawonoidów, ponieważ większość z nich migrowała razem z czołem rozpuszczalnika.

Metodą znacznie lepszą do rozdzielania związków czynnych zawartych w zieleń koniczyny inkarnatki okazała się metoda chromatografii cienkwarstwowej dwukierunkowej. Metoda ta pozwoliła na zidentyfikowanie większej ilości związków aktywnych. Najlepszymi układami rozwijającymi w metodzie dwukierunkowej były: 1 kierunek – dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v [12], 2 kierunek – toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v [14]. Rozpoznano aż 8 związków czynnych zawartych w zieleń koniczyny inkarnatki (formononetynę, genisteinę, daidzeina, kemferol, apigeninę, glabridin, hesperydynę i kwas ferulowy). W przeprowadzonych badaniach zastosowano również metodę odwrotną do wcześniej opisanej. Układami rozwijającymi były: 1 kierunek – toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v [14], 2 kierunek – dichlorometan : izopropanol 28,75 : 1,25 v/v [12]. Metoda ta była nieco gorsza od poprzedniej, ponieważ pozwoliła zidentyfikować tylko 6 związków czynnych: biochaninę A, formononetynę, daidzeinę, genisteinę, glabridin i kwas ferulowy. W metodzie chromatografii cienkwarstwowej dwukierunkowej zastosowano także inną kombinację układów rozwijających: 1 kierunek – toluen : chloroform : aceton 40 : 25 : 35 v/v [14], 2 kierunek – chloroform : aceton : kwas mrówkowy 75 : 16,5 : 8,5 v/v [16]. Dzięki tej metodzie zidentyfikowano 4 związki czynne takie jak: formononetyna, apigenina, luteolina i kwas ferulowy.

Pozostałe układy rozwijające użyte w celu identyfikacji flawonoidów i kwasów fenolowych, pomimo że były proponowane w artykułach i książkach naukowych nie były odpowiednie do rozdzielania związków czynnych obecnych w zieleń i nasionach koniczyny inkarnatki [12, 14, 15, 16].

Jednym ze związków farmakologicznie czynnych, który wykryto przy pomocy wszystkich wykorzystanych w pracy układów rozwijających była

formononetyna. Formononetyna należy do izoflawonów (podgrupa flawonoidów) i występuje również w koniczynie łąkowej. Podobnie jak inne izoflawony, wykazuje zdolność do wiązania z receptorami estrogenowymi. Powinowactwo do receptorów estrogenowych jest jednak znacznie mniejsze niż w przypadku daidzeiny. Formononetyna charakteryzuje się działaniem ochronnym na układ sercowo-naczyniowy, obniża ryzyko raka piersi i prostaty oraz działa korzystnie na układ kostny [23, 24]. Obecność tego flawonoidu w ziele koniczyny inkarnatki potwierdziły również inne badania [25].

Przeprowadzone badania pozwoliły także na wykrycie w ziele koniczyny inkarnatki genisteiny. Obecność tego związku została potwierdzona przez większość zastosowanych układów rozwijających. Genisteina, podobnie jak formononetyna, występuje powszechnie w koniczynie łąkowej i koniczynie białej [26]. Właściwości estrogenowe genisteiny wykorzystywane są głównie w zapobieganiu i łagodzeniu objawów menopauzy u kobiet [23, 26, 27, 28]. Badania kliniczne potwierdziły działanie przeciwnowotworowe genisteiny. Dodatkowo substancja ta wykazuje silne właściwości przeciwutleniające, znacznie silniejsze niż inne izoflawony np. daidzeina [23, 27].

Kolejnym flawonoidem, którego obecność w koniczynie inkarnatce potwierdziły przeprowadzone badania jest daidzeina. Podobnie jak wcześniejsze związki występuje ona również w koniczynie łąkowej [26]. Posiada właściwości estrogenopodobne, działa silnie antyoksydacyjnie i antyagregacyjnie [23].

Innymi flawonoidami, które wykryto w przeprowadzonych badaniach są kwercetyna i kemferol. Kwercetyna to flawonoid, który występuje powszechnie w koniczynie łąkowej i koniczynie białej, natomiast kemferol obecny jest głównie w koniczynie łąkowej [23, 29]. Są to związki flawonoidowe wykazujące silne działanie diuretyczne, antyoksydacyjne, przeciwalergiczne i przeciwzapalne. Dodatkowo kwercetyna posiada właściwości przeciwcukrzycowe. Badania kliniczne potwierdziły także skuteczność kwercetyny w hamowaniu wzrostu gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) [27, 30].

Ponadto przeprowadzone badania pozwoliły na wykrycie także flawonoidu hesperydyny. Hesperydyna, podobnie jak inne flawonoidy, wykazuje silne działanie antyoksydacyjne. Badania kliniczne potwierdziły działanie przeciwzapalne tego związku [28]. W publikacjach naukowych brak jest informacji na temat obecności hesperydyny w koniczynie łąkowej lub białej.

W badanym ziele koniczyny inkarnatki stwierdzono obecność apigeniny i luteoliny. Są to związki działające diuretycznie, przeciwzapalnie i rozkurczająco na mięśnie dróg moczowych. Flawonoidy te występują w koniczy-

nie łąkowej [3, 23, 27]. Wcześniejsze badania prowadzone metodą HPLC potwierdziły obecność tych związków w koniczynie inkarnatce [25].

Związkiem, który występuje w ziele koniczyny inkarnatki jest glabridina. Substancja ta została zidentyfikowana za pomocą dwóch układów rozwijających w chromatografii dwukierunkowej. Podobnie jak inne izoflawony charakteryzuje się aktywnością estrogenową, poprzez redukcję masy ciała oraz zmniejszanie stężenia glukozy we krwi może korzystnie wpływać na pacjentów z otyłością [31, 32].

### Podsumowanie

Przeprowadzone badania udowodniły także obecność biochaniny A – flawonoidu powszechnie występującego w koniczynie łąkowej oraz wykrytego metodą HPLC w koniczynie inkarnatce. Związek ten, podobnie jak genisteina, może wykazywać działanie profilaktyczne w terapii nowotworów [2, 23, 25].

Wykonane w niniejszej pracy analizy chromatograficzne umożliwiły również identyfikację kwasu ferulowego – związku należącego do kwasów fenolowych występującego także w koniczynie łąkowej [33]. Obecność tego związku potwierdziło większość zastosowanych układów rozwijających. Kwas ferulowy wykazuje hipotensyjne i antyoksydacyjne działanie [34].

Ziele i nasiona koniczyny inkarnatki, dzięki obecności flawonoidów i kwasów fenolowych, mogą okazać się źródłem cennego surowca leczniczego. Należy jednak wykonać badania fitochemiczne, które umożliwią obliczenie procentowe udziału tych związków w *Trifolium incarnatum*.

### Literatura

- [1] Sęczyk M., *Trifolium pratense* (Koniczyna łąkowa), *Magazin Vitae*, 2010, 4 (8). ([www.energy.sk/pl/info/1004/1004.asp#8](http://www.energy.sk/pl/info/1004/1004.asp#8)).
- [2] Vadeboncoeur S., Red clover (*Trifolium pratense*), CAM – Cancer Consortium, 2013, s. 1–8.
- [3] Senderski M.E., *Prawie wszystko o ziołach. Poradnik*. Podkowa Leśna, 2007, s. 344–347.
- [4] Hanelt P. i Büttner R., *Mansfeld's Encyclopedia of agricultural and horticultural crops*, Berlin: Springer-Verlag, 2011, s. 892–893.
- [5] Smith G.R., History of crimson clover in the USA, ([http://ihsg.agricscience.info/subsites/conference2010/documents/IHSC2010OralProceedings\(24\).pdf](http://ihsg.agricscience.info/subsites/conference2010/documents/IHSC2010OralProceedings(24).pdf)).
- [6] Sattel R., Crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.), *Oregon Cover Crops*, 1998, EM 8696.
- [7] Rutkowski L., *Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej*, PWN, Warszawa, 2008, s. 274–278.

- [8] Broda B., Mowszowicz J., Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych, PZWL, Warszawa, 2000, s. 308–316.
- [9] Hackney B., Crocker G., Dear B., Crimson clover, Primefacts, 2007, 382, s. 1–4.
- [10] Praca zbiorowa, Farmakopea Polska, Wydanie VI, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa, 2002.
- [11] Strzelecka H. i wsp., Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych, PZWL, Warszawa, 1982, s. 26–27, 46–48, 146–147, 280.
- [12] Lapčik O. i wsp., Immunoanalysis of isoflavonoids in *Pisum sativum* and *Vigna radiate*, Plant Science, 1999, 148, s. 111–119.
- [13] Kim S.H., Analysis of isoflavone concentration and composition in soybean [*Glycine max* (L.)] seeds between the cropping year and storage for 3 years, European Food Research and Technology, 2005, 220, s. 207–214.
- [14] D'arcy- Lameta A., Study of soybean and lentil root exudates, Plant and Soil, 1986, 92, s. 113–123.
- [15] Kotkar H.M., Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*, Pest Management Science, 2001, 58, s. 33–37.
- [16] Wagner H. i Blatt S., Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas, Springer, 2009, s. 196.
- [17] Hagmann M., Grisebach H., Enzymatic rearrangement of flavanone to isoflavone, Febs Letters, 1984, 175, s. 199–202.
- [18] Waksmundzka-Hajnos M. i wsp., Thin layer chromatography in phytochemistry, Boca-Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008, s. 405–423.
- [19] Paduch R. i wsp., Investigation of biological activity of *Lamii albi flos* extracts, Journal of Ethnopharmacology, 2007, 110, s. 69–75.
- [20] Wichtl M., Herbal Drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis, MedPharm Scientific Publishers, 2000, s. 40.
- [21] Maleš Ž. i Medić-Šarić M., Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. et Kit, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001, 24, s. 353–359.
- [22] Chopra S. i wsp., Validated high-performance thin-layer chromatography method for determination of trigonelline in herbal extract and pharmaceutical dosage form, Analytica Chimica Acta, 2006, 577, s. 46–51.
- [23] Wang S., Variable isoflavone contents of red clover products affect intestinal disposition of biochanin A, formononetin, genistein and daidzein, Journal of Alternative and Complementary Medicine, 2008, 14, s. 287–297.
- [24] Kaczmarczyk-Sedlak I., Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis, Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, s. 1–10.
- [25] Zgórka G., Studies on phytoestrogenic and nonphytoestrogenic compounds in *Trifolium incarnatum* L. and other clover species using pressurized liquid extraction and high performance column liquid chromatography with photodiode-array and fluorescence detection, Journal of AOAC International, 2011, 94, s. 22–31.
- [26] Kaczmarczyk-Sedlak I., Właściwości lecznicze izoflawonoidów koniczyny czerwonej, [www.salusnatura.pl](http://www.salusnatura.pl) (02.2013)
- [27] Majewska M. i Czczot H., Flawonoidy w profilaktyce i terapii, Terapia i leki, 2009, 65, s. 369–377.

## Analiza zawartości flawonoidów i kwasów fenolowych...

- [28] Lamer-Zarawska E., Kowal- Gierczok B., Niedworok J., *Fitoterapia i leki roślinne*, PZWL, Warszawa, 2012, s. 64–66.
- [29] Kaurinovic B., Popovic M., Vlaisavljevic S., Schwartzova H., Vojinovic-Miloradov M., *Antioxidant profile of Trifolium pratense L.*, *Molecules*, 2012, 17, s. 11156–11172.
- [30] Gross M., *Flavonoids and cardiovascular disease*, *Pharmaceutical Biology*, 2004, 42, s. 21–35.
- [31] Hasanein P., *Glabridin as a major active isoflavan from Glycyrrhiza glabra (licorice) reverses learning and memory deficits in diabetic rats*, *Acta Physiologica Hungarica*, 2011, 98, s. 221–230.
- [32] Tamir S. i wsp., *Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells*, *Cancer Research*, 2000, 60, s. 5704–5709.
- [33] Kicel A. i Wolbiś M., *Phenolic acid in flowers and leaves of Trifolium repens L. and Trifolium pratense L.*, *Herba Polonica*, 2006, 52, s. 51–58.
- [34] Suzuki A., Kagawa D., Fujii A., Ochiai R., Tokimitsu I., Saito I., *Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats*, *American Journal of Hypertension*, 2002, 15, s. 351–357.

Do cytowania:

Majcher M., Rataj J., Wojnar W., Zych M., Bukowczan J., Zagwoźdżon M., Patlewicz J., Kaczmarczyk-Sedlak I., *Analiza zawartości flawonoidów i kwasów fenolowych o działaniu leczniczym w koniczynie inkarnatce (*Trifolium incarnatum* L.)*, *Herbalism*, 2016, 1 (2), s. 67–81.