

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXVII, 20

SECTIO D

1982

Zakład Botaniki i Biologii, Instytut Badania Środowiska i Bioanalizy,
Akademia Medyczna w Łodzi
Kierownik: prof. dr Bolesław Broda
Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej,
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Tadeusz Krzaczek

Lucjan ŚWIĄTEK, Jan CHYBOWSKI

**Identyfikacja niektórych składników chemicznych
w *Melittis melissophyllum* L.***

Идентификация некоторых химических компонентов в *Melittis melissophyllum* L.

Identification of some Chemical Components in *Melittis melissophyllum* L.

Melittis melissophyllum L. (miodownik melisowaty) jest byliną rozpowszechnioną w Polsce i całej prawie Europie (5). W medycynie ludowej stosuje się ziele miodownika (*Herba Melittidis*) w leczeniu chorób wrzodowych przewodu pokarmowego oraz jako środek przeciwzapalny i moczopędny (6). Miodownik wykazuje również działanie przeciwskurczowe i uspokajające.

Skład chemiczny miodownika był już częściowo badany. Z liści wyodrębniono kumarynę (8), z całego ziele — glukozydy irydoidowe (4, 9—12).

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie dalszych składników miodownika, głównie z grupy fenoli (kwasy fenolowe, flawonoidy), które dotychczas nie były badane w tym gatunku.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Rośliny do badań pochodziły ze stanowiska naturalnego (las w okolicy Majdanu k. Lublina), zbierane były w okresie kwitnienia (maj—czerwiec). Materiał badany stanowiły: a) ziele (łączy z liśćmi i kwiatami), b) liście — wymienione materiały

* Część rozprawy doktorskiej dra Jana Chybowskiego.

suszono na wolnym powietrzu, po czym średnio rozdrobniono (FP IV), c) części podziemne (kłącze z korzeniami), po wysuszeniu mialko rozdrobnione, d) kwiaty (suszone i bardzo mialko rozdrobnione), e) owoce, zebrane w stanie dojrzałym, wysuszone i grubo sproszkowane.

1. WYODRĘBNIANIE I BADANIE FRAKCJI KWASÓW FENOLOWYCH Z ZIELA

1 kg ziela odtłuszczono eterem naftowym (Soxhlet) i wyekstrahowano dwukrotnie po 6 godz. 85% wrzącym etanolem (5 l). Z ekstraktu oddestylowano etanol, pozostałość rozcieńczono gorącą wodą (1 l) i odstawiono na 12 godz. w temperaturze pokojowej. Wydzielony chlorofil i inne balasty oddzielono (Büchner). Z roztworu wodnego wyodrębniono, przy użyciu eteru etylowego i 5% NaHCO_3 , frakcję kwasów fenolowych w znany sposób (15). Uzyskano 0,32 g frakcji A w postaci oleistego jasnożółtego produktu.

Roztwór wodny po wyekstrahowaniu frakcji A podzielono na dwie równe części (po ok. 0,5 l). Jedną część zhydrolizowano 1 M HCl w ciągu 1 godz. w temperaturze wrzenia łaźni wodnej. Z hydrolizatu wyekstrahowano (eter etylowy, 5% NaHCO_3) frakcję kwasów fenolowych (mazisty, brunatny produkt, ilość 0,35 g) — frakcję B.

Drugą część roztworu wodnego poddano 6-godzinnej hydrolizie 1 M NaOH w temperaturze chłodni (ok. 4°C). Z hydrolizatu, po uprzednim zakwaszeniu (HCl), wyodrębniono frakcję kwasów fenolowych C w postaci jasnożółtego oleju, ilość 0,26 g.

1.1. Analiza chromatograficzna

Frakcje A, B i C rozpuszczano w 2 cm³ metanolu i badano na drodze chromatografii bibułowej (Whatman 1) dwukierunkowej. Plamy identyfikowano na podstawie chromatogramu wykonanego dla mieszaniny odpowiednich kwasów wzorcowych. Wyniki analizy przedstawiono na ryc. 1.

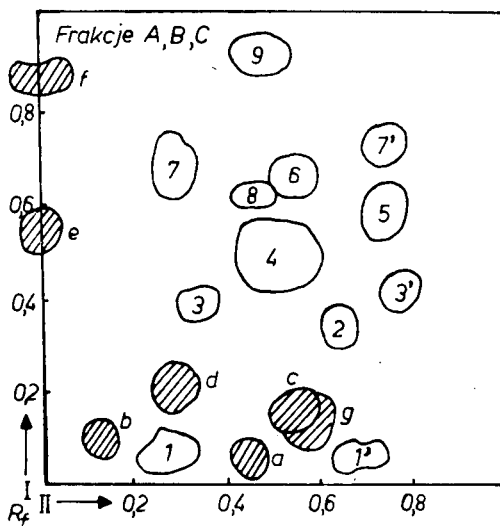
1.2. Wyodrębnianie kumaryny

Roztwory eteru etylowego, pozostałe po oddzieleniu frakcji A i B przy użyciu 5% NaHCO_3 , połączono, odparowano, pozostałość wymyto wrzącym eterem naftowym (25 cm³). Z roztworu eteru naftowego, po ochłodzeniu, wydzielił się osad krystaliczny D, który odsączono, przemyto rozpuszczalnikiem. Ilość osadu: 0,49 g, temperatura topnienia 67—68°C. Mieszanina osadu D z oryginalną próbką kumaryny (firmy Schuchardt) nie wykazuje depresji temperatury topnienia. Tożsamość osadu D ($15 \cdot 10^{-4}\%$ roztwór w metanolu) potwierdzono metodą spektrofotometryczną w nadfiolecie (Beckman, model 26) — tab. 1.

1.3. Analiza spektrofotometryczna niektórych składników frakcji kwasów fenolowych

Z dwóch chromatogramów dwukierunkowych, wykonanych dla frakcji B, wycięto krążki bibuły w miejscach odpowiadających plamom nr 4 i 5 (ryc. 1). Położenie i zabarwienie tych plam wskazywało, że mogą one pochodzić od kwasu o-kumarowego i melilotowego (3-(o-hydroksyfenilo)-propionowego) — związków rzadko

Ryc. 1. Chromatogram bibułowy frakcji kwasów fenolowych A, B i C; kierunek I: benzen—kwas octowy—woda (6 : 7 : 3); kierunek II: mrówczan sodowy—kwas mrówkowy—woda (10 : 1 : 200); wywoływacze: 1) zdwuazowany kwas sulfanilowy w 10% Na_2CO_3 (=KS), 2) zdwuazowana p-nitroanilina w 10% Na_2CO_3 (=NA); numery plam: 1 — kwas kawowy, 2 — p-hydroksybenzoesowy, 3 — p-kumarowy, 4 — o-kumarowy (zabarwienie w UV zielonożółte, z KS — czerwionopomarańczowe, z NA — fioletowoczerwone), 5 — melilotowy (z KS żółtopomarańczowe, z NA — wiśniowoczerwone), 6 — wanilinowy, 7 — ferulowy, 8 — syringowy, 9 — kumaryna



(w UV zielone); zabarwienie pozostałych plam — patrz piśmiennictwo (13); apostrofem oznaczono formę cis kwasu; a—g — plamy nie zidentyfikowane, fluoryzujące w UV niebiesko (a) lub fioletowo (b, c, d, f); plama e z KS czerwona, g z NA fioletowa

Paper chromatogram of phenolic acid fractions A, B and C (see text), developed in: I benzene—acetic acid—water 6 : 7 : 3, II sodium formate—formic acid—water 10 : 1 : 200, observed in UV and after application of diazotized sulphanilic acid in 10% Na_2CO_3 (=KS) or diazotized p-nitroaniline in 10% Na_2CO_3 (=NA). 1 — caffeic, 2 — p-hydroxybenzoic, 3 — p-coumaric, 4 — o-coumaric (in UV green-yellow, with KS red-orange, with NA violet-red), 5 — melilotic (with KS yellow-orange, with NA cherry-red), 6 — vanillic, 7 — ferulic, 8 — syringic, 9 — coumarin (in UV green); colours of remaining spots — see literature (13). Cis isomers denoted with an apostrophe; a—g — unidentified spots, in UV blue (a) or violet (b, c, d, f). Spot e with KS red, g — with NA violet

spotykanych w roślinach. Z krążków wyeluowano substancje metanolem (5 cm^3). Eluaty analizowano w nadfiolecie (patrz wyżej). Wyniki analizy podano w tab. 1.

Należy zaznaczyć, że kwas melilotowy, w odróżnieniu od kwasu o-kumarowego, nie wykazuje przesunięcia batochromowego pod wpływem AlCl_3 , co jest zgodne z danymi piśmiennictwa (7).

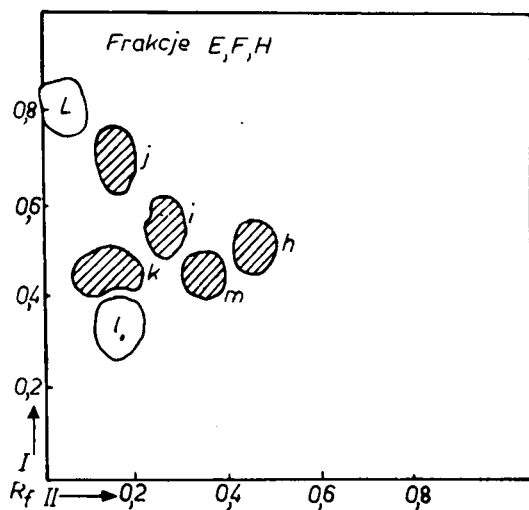
2. WYODRĘBNIANIE I ANALIZA FRAKcji FLAWONOIDÓW

100 g ziela ekstrahowano dwukrotnie wrzącym metanolem (po 0,5 l). Z ekstraktu oddestylowano metanol, pozostałość (27 g) wymyło gorącą wodą (0,4 l). Roztwór wodny uwolniono od chlorofilu (jak w pkt 1), następnie wyekstrahowano kolejno eterem etylowym i octanem etylu. Z ekstraktu eterowego i octanowego usunięto kwasy fenolowe przez 5-krotne wytrząsanie z 5% NaHCO_3 , po czym przemyto go wodą, wysuszono (Na_2SO_4), odparowano rozpuszczalnik. Uzyskano frakcje flawonoidów: E z wyciągu eterem etylowym (żółtozielony gęsty produkt 0,03 g) i F z wyciągu octanowego (ciemnozielona mazista masa, 0,07 g).

Próbkę (5 cm³) roztworu wodnego, pozostałego po ekstrakcji frakcji E i F, odparowano do sucha. Otrzymaną półstałą pozostałość (0,02 g) oznaczono jako frakcję H.

2.1. Analiza chromatograficzna

Frakcje E, F i H rozpuszczono w 2 cm³ metanolu i badano metodą chromatografii bibułowej (Whatman 3) dwukierunkowej. Równocześnie, chromatografowano flawonoidy wzorcowe, którymi dysponowano: luteolinę i 7-0-glukozyd luteoliny. Wyniki analizy przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Chromatogram bibułowy frakcji flawonoidowej E, F, H z zielela; kierunek I: III rz. butanol—kwas octowy—woda (3 : 1 : 1); kierunek II: kwas octowy—woda (15 : 85); zabarwienie plam po wyłowaniu 1% AlCl₃ w metanolu: w świetle dziennym zielonożółte, w UV — żółte; L — luteolina, l — 7-0-glukozyd luteoliny, h—m — plamy nie zidentyfikowane
Paper chromatogram of flavonoid fraction E, F, H from herba I — III-butanol—acetic acid—water 3 : 1 : 1, II acetic acid—water 15 : 85 Colours of spots after spraying with 1% AlCl₃ in methanol: green-yellow, in UV yellow, L — luteolin, l — 7-0-luteolin-glucoside, h—m — unidentified spots

2.2. Analiza spektrofotometryczna

Z trzech chromatogramów dwukierunkowych, wykonanych dla frakcji E, F, wzorcowej luteoliny i 7-0-glukozydu luteoliny, wycięto krążki odpowiadające położeniu plam L i l (ryc. 2) oraz wymienionych wzorców i wyeluwano analogicznie, jak opisano w pkt 1.3. Eluaty badano metodą spektrofotometryczną. Wyniki zestawiono w tab. 1.

3. WYODRĘBNIANIE I BADANIE FRAKCJI IRYDOIDÓW

Z materiałów w ilościach: liście — 50 g, kwiaty — 20 g, części podziemne — 5 g i owoce — 1 g, izolowano frakcję irydoidów w następujący sposób. Materiał ekstrahowano dwukrotnie po 2 godz. wrzącym 80% etanolem. Ekstrakt oddestylowano, pozostałość rozcieńczono gorącą wodą. Z roztworu wodnego, po ochłodzeniu, usunięto zanieczyszczenia (sączenie, ekstrakcja eterem naftowym). Oczyszczony roztwór wodny chromatografowano na tlenku glinu obojętnym (stopień I aktywności wg Brockmanna) na kolumnie, elując wodą. Eluat wodny zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 5—0,5 cm³ (w zależności od ilości użytego materiału roślinnego), zmieszano z węglem aktywnym (50—5 g), pozostawiono na 24 godz. w temperaturze pokojowej. Węgiel odsączono (Büchner), przemyto wodą, zawieszono

Tab. 1. Położenie pasm absorpcji eluatów z chromatogramu, osadu D oraz substancji wzorcowych
 Position of absorptive bands of eluate from chromatogram, substance D and standard substances

L.p. No.	Substancje badane i wzorce *** Analyzed substances and standards ***	Maksima absorpcji w nm Maximum absorbtions in nm	
		MeOH	MeOH + AlCl ₃ ***
	Kwasy fenolowe Phenolic acids		
1.	Eluat plamy nr 4 * Eluate of spot No. 4 *	217, 274, 320	220, 280, 334
2.	Kwas o-kumarowy o-Coumaric acid	217, 274, 321	220, 281, 335
3.	Eluat plamy nr 5 * Eluate of spot No. 5 *	215, 275	215, 275
4.	Kwas melilotowy Melilotic acid	215, 274	215, 274
	Kumaryny Coumarins		
5.	Osad D Substance D	211, 274, 312	211, 274, 312
6.	Kumaryna Coumarin	211, 274, 312	211, 274, 312
	Flawonoidy Flavonoids		
7.	Eluat plamy L** Eluate of spot L**	255, 268, 292, 350	274, 302, 328, 427
8.	Luteolina Luteolin	253, 267, 291, 350	274, 300, 328, 426
9.	Eluat plamy 1** Eluate of spot 1**	255, 267, 348	274, 298, 329, 432
10.	7-0-glukozyd luteoliny Luteolin 7-0-glucoside	254, 266, 348	273, 297, 328, 431

* Patrz ryc. 1.

** Patrz ryc. 2.

*** Do roztworu metanolowego (MeOH) o objętości 2 cm³ w kuwecie (l=1 cm) dodawano 2 krople 1% AlCl₃ w metanolu.

* See Fig. 1.

** See Fig. 2.

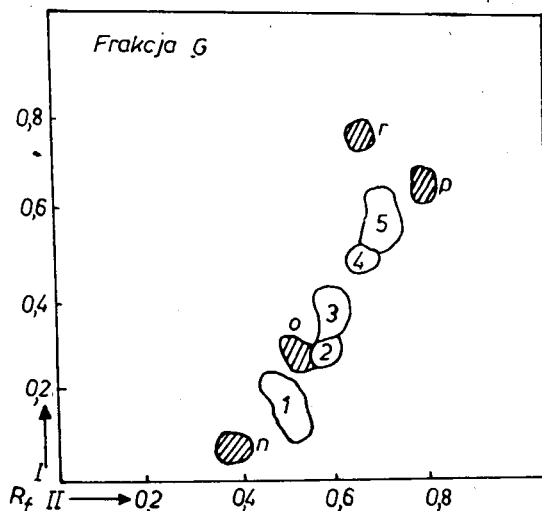
*** Two drops of 1% AlCl₃ in methanol were added to 2 cm³ of methanol (MeOH) solution in test-tube (l=1 cm).

w 96% etanolu i pozostawiono na 12 godz., często mieszając. Oddzielono węgiel (sączenie) i odrzucono, przesącz oddestylowano (zmniejszone ciśnienie) uzyskując oleistą, żółtawą pozostałość w ilości: z liści — 0,5 g, z kwiatów — 0,2 g, z części podziemnych — 0,05 g, z owoców — 0,01 g. Są to frakcje zawierające glukozydy irydoidowe.

3.1. Analiza chromatograficzna

Frakcje z glukozydami irydoidowymi rozpuszczono w ok. 0,5 cm³ metanolu i badano metodą chromatografii bibułowej dwukierunkowej (Whatman 3). Plamy na chromatogramie rozpoznawano na podstawie równocześnie wykonanych chromato-

gramów dla odpowiednich irydoidów wzorcowych*. Obraz chromatogramu wykonanego dla frakcji z liści G przedstawiono na ryc. 3. Analiza frakcji z pozostałych organów roślinnych wykazała, że zespół występujących w nich irydoidów jest identyczny, jak we frakcji z liści.



Ryc. 3. Chromatogram bibułowy frakcji glukozydów irydoidowych z liści G, wywołany odczynnikiem Godina (2); kierunek I: n-butanol—kwas octowy—woda (4 : 1 : 5); kierunek II: n-butanol—pirydyna—woda (45 : 25 : 40); numer plamy: 1 — melitozyd, 2 — monomelitozyd, 3 — harpagid, 4 — ajugol, 5 — octan harpagidu; plamy n—r — nie zidentyfikowane; zabarwienie plam: 1, 2 — brunatne, 3, 5 — czerwone, 4, n, o, p, r — różowe

Paper chromatogram of iridoid fraction from leaves G, developed with Godin reagent (2). I n-butanol—acetic acid—water 4 : 1 : 5, II n-butanol—pyridine—water 45 : 25 : 40. 1 — melitose, 2 — monomelitose, 3 — harpagide, 4 — ajugol, 5 — acetylharpagide. Spots n—r — unidentified. Colour of spots: 1, 2 — brown, 3, 5 — red; 4, n, o, p, r — pink

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Ziele krajowego gatunku *Melittis melissophyllum* L., jak wynika z naszych badań, zawiera kwasy fenolowe: p-hydroksybenzoesowy, wanilinowy, syringowy, o-kumarowy, p-kumarowy, kawowy, ferulowy i melilotowy; flawony: luteolinę i 7-0-glukozyd luteoliny oraz pięć innych, nie rozpoznanych substancji o charakterze flawonoidów; kumaryne; glukozydy irydoidowe: melitozyd, monomelitozyd, harpagid, octan harpagidu, ajugol oraz cztery składniki dające reakcje barwne właściwe irydoidom.

Kwasy fenolowe występują w suchym ziele, zarówno w stanie wolnym, jak i związanym, wykryliśmy je bowiem w ekstrakcie przed i po przeprowadzonej hydrolizie.

* Autorzy dziękują prof. C. Trogolowi i prof. M. L. Scarpatiemu (z Uniwersytetu w Rzymie) za otrzymane wzorce melitozydu, monomelitozydu, harpagidu i octanu harpagidu; prof. O. Sticherowi (z Instytutu Farmaceutycznego w Zurychu) za wzorec ajugolu.

Kumaryna i glukozydy irydoidowe były już znane w tym gatunku. Wykazaliśmy, że w organach podziemnych (w kłączach z korzeniami) i nadziemnych (w liściach, kwiatach, owocach) występuje zespół irydoidów o identycznym składzie jakościowym (por. ryc. 3).

Interesujące jest występowanie w miodowniku kwasu o-kumarowego, melilotowego i kumaryny. W świecie roślin znane są dotychczas nieliczne gatunki (z rodziny *Papilionaceae*), w których znaleziono wymienione trzy związki występujące obok siebie (3). Tworzą one wzajemnie powiązany układ metaboliczny w roślinie. O występowaniu kwasu melilotowego w roślinach z rodziny *Labiatae* nie było dotąd wzmianek.

Właściwości lecznicze miodownika (antyseptyczne, uspokajające) mogą pochodzić od składników z grupy irydoidów i kwasów fenolowych. Znane jest na przykład działanie antybiotyczne niektórych związków należących do wymienionych grup (14), a także właściwości uspokajające kwasu syringowego (1).

PISMIENNICTWO

1. Dar M. S., Ikram M.: Studies on *Quercus* in *Fectoria*: Isolation of Syringic Acid and Determination of Its Central Depressive Activity. *Planta med.* **35**, 156, 1979.
2. Godin P.: A New Spray Reagent for Paper Chromatography of Polyols and Cetoses. *Nature* **174**, 134, 1954.
3. Griffiths L. A.: On the Co-occurrence of Coumarin, o-Coumaric Acid and Melilotic Acid in *Gliricidia sepium* and *Dipteryx odorata*. *J. exper. Botany* **13**, 169, 1962.
4. Guiso M. i wsp.: Iridoids — XIII: Ajugoside and Ajugol: Structure and Configuration. *Gazz. chim. ital.* **104**, 25, 1974.
5. Hegi G.: *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, Bd. V/4. Carl Hanser (Verlag), München 1920.
6. Jurkiewicz I. D., Miszenin I. D.: *Lekarstwiennyje rastienija i ich primienienije*. Izd. Nauka i Technika, Minsk 1974.
7. Nakagawa Y. i wsp.: Spectral Identification Studies of Phenolic Acids Using Aluminum Chloride. *Anal. Biochem.* **7**, 374, 1964.
8. Salgues R.: Les variations du taux de la coumarine chez le *Melittis melissophyllum* L. *Rev. gener. Sci.* **52**, 35, 1942.
9. Scarpati M. L.: Ricerche sulle sostanze iridoidi. *Corsi Semin. Chim.* **11**, 40, 1968.
10. Scarpati M. L., Esposito P.: Iridoidi (III). Struttura e configurazione del Melittoside. *Gazz. chim. ital.* **97**, 1209, 1967.
11. Scarpati M. L., Esposito P.: Iridoidi — IV. Monomelittoside. *Ric. sci.* **37**, 840, 1967.
12. Scarpati M. L. i wsp.: Iridoids. I. Harpagide Acetate from *Melittis melissophyllum*. *Tetrahedron Lett.* 3439, 1965.
13. Świątek L.: Pharmacobotanic Investigations on some Species of Fam. *Scrophulariaceae*. Part III. Chemical Constituents of *Veronica spicata* L. *Dissert. pharm. pharmacol.* **21**, 545, 1969.

14. Świątek L.: Znaczenie lecznicze irydoidów roślinnych. *Farm. Pol.* **31**, 409, 1975.
15. Świątek L.: Kwasy fenolowe i glukozydy irydoidowe w niektórych krajowych gatunkach leczniczych z rodzaju *Plantago*. *Herba polon.* **23**, 201, 1977.

РЕЗЮМЕ

При помощи хроматографических и спектрофотометрических методов в траве *Melittis melissophyllum* L. обнаружено следующие фенолокислоты: п-оксибензойная, ванилиновая, сиреневая, п-кумаровая, о-кумаровая, кофейная, феруловая, мелилитовая, а также флавоны: лутеолин, 7-0-гликозид лутеолина и 5 неидентифицированных соединений о характере флавоноидов. Обнаружено тоже присутствие кумариновых и иридоидовых гликозидов — мелитозида, монотелитозида, гарпагида и его ацетата и аюгола. Установлено, что химический состав комплекса иридоидов, изолированный из разных вегетативных частей растения, как: из корновища с корнем, листья, цветов и плодов является одинаковым. Предложено принять присутствие кумарины, о-кумаровой и мелилитовой кислот как важный таксономический фактор для *Melittis melissophyllum* L.

SUMMARY

In the herbs of *Melittis melissophyllum* L. growing in Poland the presence of phenolic acids such as p-hydroxybenzoic, vanillic, syringic, p-coumaric, o-coumaric, caffeic, ferulic and melilotic acids; flavones: luteolin and luteolin 7-0-glucoside as well as five unidentified compounds of flavonoid nature have been demonstrated by means of chromatographic and partly by spectrophotometric methods. Occurrence of coumarin and iridoid glucosides: melitoside, monomelitoside, harpagide, acetyl-harpagide and ajugol have been confirmed. It was found that the composition of iridoid complex isolated from rhizoma with roots, from leaves, flowers and fruits of *M. melissophyllum* L. was the same. The co-occurrence of coumarin, o-coumaric and melilotic acids was recognized as characteristic for this species.