

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIII, 38

SECTIO D

1978

---

Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej.  
Wydział Farmaceutyczny. Akademia Medyczna w Lublinie  
p.o. Kierownik: dr Tadeusz Krzaczek

Jadwiga MIŁKOWSKA, Kazimiera GRZYCKA

**Badanie zawartości alkaloidu cytyzyny w nasionach *Laburnum anagyroides* Med.**

Исследование содержания алкалоида цитизина в семенах *Laburnum anagyroides* Med.

Research on the Cytisine Alkaloid Content in *Laburnum anagyroides* Med.,  
Seeds

*Laburnum anagyroides* Med., krzew należący do rodziny *Leguminosae*, dość często hodowany jest w parkach i zieleńcach jako roślina ozdobna. Zainteresowanie tą rośliną wiąże się z występowaniem w niej cytyzyny, która należy do alkaloidów chinolizydynowych, tworzących w roślinach zwartą grupę związków (Borkowski, 1973). Alkaloid cytyzyna jest związkiem farmakologicznie czynnym, wykorzystywanym w leczeniu.

W farmakopei radzieckiej cytyzyna figuruje jako lek pobudzający ośrodek oddechowy w formie ampułek pod nazwą „Citition”. W Bułgarii natomiast została wykorzystana do opracowania specyfiku odwykowego od palenia papierosów pod nazwą „Tabex” (Farmacja Polska, 1974).

Cytyzyna została po raz pierwszy wyizolowana z nasion *Cytisus anagyroides* Med. (Bukowiecki i Michalska, 1966). Dotychczasowe dane wskazują, że cytyzyna występuje jako główny alkaloid w dojrzałych nasionach oraz w ziele *Laburnum anagyroides* Med. (Kozłowski, 1968).

Celem podjętej pracy było zanalizowanie występowania alkaloidów chinolizydynowych oraz oznaczenie zawartości cytyzyny w nasionach *Laburnum anagyroides* Med., zebranych z krzewów rosnących na terenie miasta Lublina w latach 1974 i 1976, z uwzględnieniem biometrii nasion,

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

## 1. Materiał i metoda

Materiał do badań stanowiły nasiona z krzewów *Laburnum anagyroides* Med. rosnących na zieleńcach Lubelskiego Osiedla Mieszkaniowego. Badaniami objęto trzy zieleńce zlokalizowane przy ulicach: Filaretów (grupa I), Balladyny (grupa II) i Pana Tadeusza (grupa III). Nasiona zbierano w miesiącu wrześniu w latach 1974 i 1976.

Z rozdrobnionego w młynku elektrycznym surowca pobierano naważki 10 g, które ekstrahowano trzykrotnie 40 cm<sup>3</sup> wrzącego alkoholu metylowego. Przesączone ekstrakty zagęszczano na wyparce i przenoszono metanolem do kolby na 10 cm<sup>3</sup>. Analizę zawartości alkaloidów przeprowadzano metodą chromatografii cienkowarstwowej (Opieńska-Blauth i wsp., 1971) na płytkach szklanych o wymiarach 20×20 cm. Płytki pokrywano warstwą żelu krzemionkowego G firmy Merck o grubości 0,25 mm, następnie aktywowano je w temp. 105°C przez 1 godz. Chromatogramy wywoływano odczynnikami Dragendorffa według Muniera (Borkowski, 1973).

2. Analiza jakościowa alkaloidów  
w badanym surowcu

Głównym alkaloidem występującym w nasionach *Laburnum anagyroides* jest cytyzyna. Jako alkaloidy uboczne występują: anagiryna, metylocytyzyna, hydroksysparteina i lupanina (Kozłowski, 1968). Analizę jakościową poszczególnych ekstraktów alkaloidowych przeprowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej, pozwalającej na wykrywanie alkaloidów chinolizydynowych w bardzo małych stężeniach (Gill, 1964). W próbach wstępnych poszukiwano takiego układu, który dałby najlepszy rozdział alkaloidów zawartych w badanym materiale. Najlepszymi okazały się układy: benzen—metanol (1:1) i chloroform—metanol (8:2) (Borkowski, 1973).

Tab. 1. Wartości  $R_f$  plam alkaloidów  
The value of  $R_f$  alkaloids spots

Grupa doświad- czalna	Graniczne wartości $R_f$				
	benzen—metanol (1:1)				
	cytyzyna	lupanina	A—D	E	F
I	0,21	0,10	0,61	0,15	0,03
II	0,19	0,10	0,62	0,15	0,03
III	0,20	0,09	0,61	0,15	0,02
Wzorzec	0,18	0,09	—	—	—

## a) Przygotowanie roztworów wzorcowych

W prowadzonych badaniach korzystano ze wzorca cytyzyny firmy BDH — Anglia, otrzymanego z Instytutu Przemysłu Zielarskiego w Poznaniu, oraz z chlorowodoru lupaniny udostępnionego przez Zakład Chemii Nieorganicznej Akademii Medycznej w Lublinie. Z cytyzyny przygotowywano 0,1% roztwór metanolowy, chlorowodorek lupaniny natomiast przeprowadzano w wolną zasadę przez rozpuszczenie w wodzie i dodanie węgla sodu. Uzyskany roztwór przemywano chloroformem w rozdzielaczu. Warstwę chloroformową zagęszczano na wyparce próżniowej i sporządzano roztwór metanolowy.

## b) Przygotowanie próbek badanego surowca

Podstawowy wyciąg zawierający 10 g badanego surowca w 10 cm<sup>3</sup> rozpuszczalnika rozcieńczano metanolem w stosunku 1:5 i tak przygotowany roztwór наносzono na chromatogramy.

## c) Chromatografia

Na przygotowane uprzednio płytki z żelem krzemionkowym наносzono strzykawką Hamiltona kolejno badane próbki oraz wzorec cytyzyny i lupaniny. Chromatogramy po rozwinięciu i wysuszeniu oglądano w świetle UV, a następnie wywoływano je odczynnikami Dragendorffa. Układ benzen—metanol dawał dobry rozdział cytyzyny i lupaniny (tab. 1). Rozdział pozostałych alkaloidów, nie zidentyfikowanych z uwagi na brak wzorców, był w tym układzie niedostateczny. Na chromatogramie nie zidentyfikowane alkaloidy, oznaczone literami od A do D, nie uległy rozdziałowi, rozdzieliły się jedynie alkaloidy oznaczone literami E i F. Dobry rozdział alkaloidów A—D uzyskano natomiast przy zastosowaniu układu chloroform—metanol, co zestawiono w tab. 1. W układzie tym nie uzyskano jednak rozdziału cytyzyny, lupaniny i alkaloidów E i F, które

w stosowanych układach rozpuszczalników  
in the used solvent systems

Graniczne wartości $R_f$						
chloroform—metanol (8:2)						
cytyzyna	lupanina	A	B	C	D	E i F
0,10	0,10	0,30	0,40	0,48	0,55	0,10
0,10	0,10	0,30	0,40	0,48	0,55	0,10
0,10	0,10	0,30	0,40	0,48	0,55	0,10
0,10	0,10	—	—	—	—	—

na chromatogramie tworzyły jedną, dużą plamę o tej samej wartości współczynnika ( $R_f=0,10$ ).

### 3. Oznaczanie zawartości cytyzyny

W celu ilościowego oznaczenia zawartości cytyzyny przygotowano metanolowy roztwór cytyzyny wzorcowej zawierający w 10 cm<sup>3</sup> rozpuszczalnika 10 mg wzorca. Z uzyskanego w ten sposób roztworu podstawowego  $R$  sporządzono serię rozcieńczeń, pobierając kolejno malejącą ilość roztworu podstawowego i dopełniając ją metanolem do objętości 10 cm<sup>3</sup>. Następnie przeprowadzono analizę chromatograficzną, stosując układ benzen—metanol dla ustalenia progu wykrywalności. Granicę wykrywalności obliczono według wzoru (Oświecimska i wsp., 1972):

$$G_w = \frac{A \cdot b \cdot V_{lim}}{R \cdot 10}$$

gdzie:

- $A$  — ilość substancji (g),
- $b$  — objętość nanoszonej próbki (0,005 cm<sup>3</sup>),
- $V_{lim}$  — najmniejsza objętość  $R$  dająca po rozcieńczeniu do 10 cm<sup>3</sup> jeszcze widoczną plamę,
- $R$  — objętość roztworu podstawowego (cm<sup>3</sup>).

Ustalone w ten sposób stężenie cytyzyny wzorcowej, warunkujące wykrywalność jej na chromatogramach, wynosiło 0,0000001 g. Przy stężeniach niższych plamy cytyzyny były już niewidoczne.

W ten sam sposób przeprowadzono chromatografię przygotowanych ekstraktów z badanego materiału, z tym, że roztwór wyjściowy zawierał 10 g surowca w 10 cm<sup>3</sup> metanolu. Ustalono minimalne stężenia roztworów wszystkich grup doświadczalnych, przy których uzyskiwano identyczne z granicznym roztworem wzorca plamy cytyzyny o tej samej wartości współczynnika  $R_f$ .

W oparciu o uzyskane wyniki obliczono procentową zawartość cytyzyny w badanym surowcu według wzoru:

$$p = \frac{R \cdot 10 \cdot G_w \cdot 100}{V_{lim} \cdot b \cdot a}$$

gdzie:

- $p$  — procentowa zawartość,
- $R$  — całkowita objętość wyciągu z surowca (cm<sup>3</sup>),
- $G_w$  — granica wykrywalności,
- $V_{lim}$  — najniższa objętość wyciągu, która po rozcieńczeniu do 10 cm<sup>3</sup> daje widoczną plamę,
- $b$  — objętość nanoszonej próbki (0,005 cm<sup>3</sup>),
- $a$  — ilość surowca wyjściowego.

Z uwagi na to, że do ekstrakcji używano nasiona powietrznie suche, oznaczano w nich zawartość wody według Farmakopei Polskiej IV przez suszenie badanego surowca w temp. 105°C do stałego ciężaru, a zawartość graniczną cytyzyny przeliczano na surowiec bezwodny. Uzyskane wyniki zestawiono w tab. 2.

Tab. 2. Przeciętna procentowa zawartość cytyzyny w nasionach *Laburnum anagyroides* M e d.

The mean percentage content of cytisine in the *Laburnum anagyroides* M e d., seeds

Grupa doświadczalna	Średnia zawartość cytyzyny	
	r. 1974	r. 1976
I	0,135	0,124
II	0,111	0,121
III	0,095	0,092

Tab. 3. Charakterystyka biometryczna nasion *Laburnum anagyroides* M e d. w zależności od roku zbioru

The biometrical characteristic of *Laburnum anagyroides* M e d., seeds depending on the year of harvest

Grupa doświadczalna	Średni ciężar nasion w g r. 1974 r. 1976		Średnie wymiary nasion w mm							
			r. 1974				r. 1976			
			długość	szerokość	grubość	objętość	długość	szerokość	grubość	objętość
I	3,07	2,95	4,79	3,66	2,66	195,19	4,40	3,26	2,79	167,48
II	2,96	2,62	4,75	3,43	2,70	184,04	4,60	3,23	2,73	169,88
III	2,92	3,03	4,62	3,45	2,70	180,21	4,47	3,10	2,88	167,10

#### 4. Biometria nasion

Badania biometryczne przeprowadzano na 100 nasionach pobranych losowo z każdego okazu grupy doświadczalnej, na których wykonano pomiary: długości, szerokości i grubości nasion, przy użyciu noniusza. Ponadto ustalono średnią liczbę nasion w strąku. Obliczono wielkości średnie (tab. 3), określając jednocześnie wartości minimalne, maksymalne i modalne.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W wyniku przeprowadzonych badań chromatograficznych w nasionach *Laburnum anagyroides* M e d. stwierdzono obecność 8 plam dających

reakcje charakterystyczne dla alkaloidów. W oparciu o posiadane substancje wzorcowe, wykazujące wartości  $R_f=0,18$  dla cytyzyny i  $R_f=0,09$  dla lupaniny (tab. 1) dwie z tych plam dające zgodne z substancjami wzorcowymi wartości współczynnika  $R_f$ , a mianowicie 0,19, 0,20 i 0,21 uznano za cytyzynę, a 0,09 i 0,10 za lupaninę. Pozostałych natomiast nie zidentyfikowano z powodu braku odpowiednich substancji wzorcowych (tab. 1). Jak wynika z tab. 2, największą zawartością cytyzyny (0,135%) charakteryzują się nasiona z grupy I doświadczalnej z r. 1974, niższą pozostałe dwie grupy. Nasiona z r. 1976 zawierały nieco mniej cytyzyny w stosunku do r. 1974. Odpowiednio do zawartości cytyzyny kształtują się: średni ciężar nasion oraz ich objętość (tab. 3). Badane nasiona różnią się między sobą wymiarami: długość ich waha się w granicach 3,30—6 mm, szerokość 2,50—4,60 mm, a grubość 2—3,1 mm. Wartość modalna wynosi dla długości 5 mm, dla szerokości 4 mm, a dla grubości 2,8 mm. Na uwagę zasługują nasiona grupy I doświadczalnej. Odznaczają się one dorodnością oraz najwyższą zawartością cytyzyny. Jeden z krzewów wymienionej grupy wytwarzał jedynie duże i średnie strąki, a tym samym, zawierały one więcej nasion, dając większy plon.

Średnia zawartość cytyzyny w nasionach *Laburnum anagyroides* Med., zebranych z krzewów rosnących na terenie miasta Lublina, waha się w granicach 0,092—0,135%. Znaczna liczba krzewów złotokapu, rosnących na terenie miasta Lublina, może być wykorzystana w celu pozyskania nasion, a następnie produkcji cytyzyny.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Borkowski B.: Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej. PZWL, Warszawa 1973.
2. Bukowiecki H., Michalska Z.: Acta Pol. Pharmac. 23, 315, 1966.
3. Farmacja Polska, PZWL, 30, 10, 952, 1974.
4. Farmakopea Polska IV. PZWL, Warszawa 1970.
5. Gill S.: Acta Pol. Pharmac. 21, 379, 1964.
6. Kozłowski J.: Herba Polonica. Supl. I, Poznań 1968.
7. Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuszkiewicz H.: Zarys chromatografii cienkowarstwowej. PWRiL, Warszawa 1971.
8. Oświecimska M., Bednarska D., Sendra J.: Farmacja Polska 28, 1095, 1972.

Otrzymano 12 X 1977.

#### РЕЗЮМЕ

Методом тонкослойной хроматографии на силикагеле G (Merck) алкалоиды, содержащиеся в семенах *Laburnum anagyroides* Med., сначала разделялись, а затем на основе установления порога обнаруженности определялось со-

держание цитизина. Среднее содержание в семенах *Laburnum anagyroides* Med. растущих на территории Люблина, колебалось в границах 0,092—0,135%. Дается биометрическая характеристика образцам семян.

#### S U M M A R Y

By applying thin layer chromatography on cytisine gel (Merck) alkaloids contained in the *Laburnum anagyroides* Med., seeds were divided and next on the basis of determining the detection threshold, the content of cytisine was defined. The average content of cytisine in the *Laburnum anagyroides* Med., seeds, growing in the Lublin area fluctuates within the limits of 0,092 to 0,135%. The examined samples of seeds were also biometrically characterized.

