

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXVI, 19

SECTIO D

1981

Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej. Akademia
Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr hab. Tadeusz Krzaczek

Tadeusz KRZACZEK, Jadwiga MIŁKOWSKA,
Kazimiera GRZYCKA,
Anna SOKOŁOWSKA-WOŹNIAK

Badania aktywności cytostatycznej frakcji octanowej i etanolowej

Исследование цитостатической активности уксуснокислой и этаноловой фракций

Studies of the Cytostatic Activity of Acetate and Ethanol Fractions

Przeprowadzone dotychczas badania skринingowe (Grzycka i wsp. 1978; Miłkowska i wsp. 1979), dotyczące aktywności biologicznej wyciągów roślinnych, pozwoliły na wytypowanie do dalszych badań 19 gatunków roślin.

Wodne wyciągi tych roślin wykazywały silne działanie antymitotyczne, a zatem spełniały wymagane kryteria przydatności do szczegółowszych badań. Niektóre gatunki, pomimo różnej przynależności systematycznej, charakteryzują się obecnością garbników i często towarzyszących im kwasów: elagowego i galusowego, a mianowicie: *Betula humilis*, *Rosa rugosa*, *Alchemilla* sp., *Monotropa hypopitys* i *Erodium cicutarium* (Hegnauer 1964, 1966, 1973). Powszechnie też jest znana (Frohne, Jensen 1979) zawartość izoflawonów i alkaloidów w rodzajach z rodziny *Papilionaceae*: *Cytisus*, *Vicia*, *Lathyrus* oraz flawonoidów w rodzajach z rodziny *Asteraceae*: *Pulicaria*, *Cirsium*, *Tragopogon*, *Leontodon*, *Hieracium*. Dodatkowo dla gatunków z rodziny *Asteraceae* charakterystyczna jest obecność laktonów seskwiterpenowych (Herout, Sorm 1969). W większości badanych gatunków możliwe jest też występowanie amin i innych czynnych związków.

Wiele spośród wspomnianych substancji wykazuje aktywność cytostatyczną, a mianowicie niektóre flawonoidy i aminy (Bukowiecki, Furmanowa 1972), laktony, alkaloidy, kumaryny, fenolokwasy, garbniki i glikozydy (Borkowski 1966, 1970; Ożarowski 1972). Jak z tego wynika, wodne wyciągi z wytypowanych roślin mogły zawierać różne pod względem chemicznym substancje odznaczające się aktywnością cytostatyczną. W celu dokładniejszego określenia charakteru i aktywności występujących tu związków z ziela wytypowanych gatunków wydzielono frakcje: octanową i etanolową oraz przebadano ich wpływ na mitozę w me-
rystemach wierzchołkowych korzeni *Allium cepa* L.

MATERIAŁ I METODA

Materiał do badań stanowiło ziele, a w przypadku drzew i krzewów — liście, z 19 gatunków roślin kwiatowych. Z przeznaczonego do badań surowca przygotowywano frakcje: octanową i etanolową w sposób następujący:

50 g wysuszonego w normalnych warunkach i sproszkowanego surowca ekstrahowano czterokrotnie w 250 cm³ wrzącego 80° etanolu pod chłodnicą zwrotną, po pół godziny. Z uzyskanego ekstraktu odparowywano rozpuszczalnik w wyparce próżniowej, a suchą pozostałość rozpuszczano na gorąco w 10-krotnej ilości wody destylowanej i po ostygnięciu wstawiano do lodówki (+5°C) na 12 godz. Następnie odsączano wytrącone balasty. Klarowny przesącz wmywano dokładnie (do 8 razy) octanem etylu. Z warstwy octanowej usunięto w wyparce rozpuszczalnik, a suchą pozostałość rozpuszczono w odpowiedniej ilości wody wodociągowej, tak aby uzyskać 1% roztwór wydzielonej frakcji, który następnie użyto do badań biologicznych i kontroli chromatograficznej.

Pozostałą po odmyciu octanem etylu warstwę wodną odparowano do sucha w wyparce próżniowej, a pozostałość wymyło 5-krotnie wrzącym bezwodnym etanolem (handlowym) w celu oddzielenia ewentualnie obecnych składników zasadowych i glikozydów od sacharydów (Linskens 1959; Jerzmanowska 1967; Borkowski 1973). Z uzyskanej frakcji etanolowej usunięto w wyparce próżniowej także etanol, a suchą pozostałość rozpuszczono w wodzie wodociągowej, analogicznie jak frakcję octanową.

1% roztwory frakcji octanowych i etanolowych przebadano wstępnie metodą chromatografii bibułowej (Whatman 1, n-butanol—kwas octowy—woda 4:1:5). Chromatogramy po rozwinięciu i wysuszeniu oglądano w UV przed i po działaniu amoniaku oraz wywoływano je odczynnikami Paulego (DKS), 3% wodnym roztworem FeCl₃, odczynnikami Dragendorfa i Millona (Linskens 1959; Jerzmanowska 1967; Borkowski 1973). Wyniki zestawiono w tab. 1. Na tej podstawie można stwierdzić, że frakcja octanowa zawierała głównie związki z wolną grupą fenolową, a etanolowa — związki zasadowe (prawdopodobnie głównie aminy) oraz glikozydy.

W badaniach aktywności biologicznej stosowano dla każdego gatunku 0,5% stężenie obydwu frakcji, a dla gatunków o wysokiej sile działania — także stężenia: 0,3—0,05%. Badano 24-godzinny wpływ frakcji na wzrost liniowy korzeni *Allium cepa* L. i aktywność mitotyczną według metody stosowanej w pracach poprzednich (Grzycka i wsp. 1978; Miłkowska i wsp. 1979). Uzyskane wyniki liczbowe, stanowiące średnią arytmetyczną ze średnim błędem, zestawiono w tab. 2.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Wyodrębnione z wyciągów etanolowych badanych roślin frakcje: octanowa i etanolowa, jak wynika z chromatografii bibułowej, różnią się wyraźnie charakterem chemicznym. Frakcja octanowa zawiera związki fenolowe i ich pochodne: flawonoidy, fenolokwasy i ich estry, garbniki, kumaryny i inne. Świadczy o tym duża ilość plam wykazujących fluorescencję niebieską i brunatną w UV oraz reagujących z odczynnikami na fenole (tab. 1). Frakcja etanolowa zaś jest pozbawiona związków feno-

lowych, zawiera natomiast substancje o charakterze zasadowym (prawdopodobnie aminy i alkaloidy) oraz niekiedy laktony i różne glikozydy trudno rozpuszczalne w octanie etylu (tab. 1).

Tab. 1. Wyniki chromatografii bibułowej wydzielonych frakcji
The results of paper chromatography of the selected fractions

L.p.	Gatunek	Liczba plam					
		Frakcja octanowa			Frakcja etanolowa		
		UV	UV+NH ₃	DKS	FeCl ₃	Drag.	Millon
1.	<i>Betula oycoviensis</i> Bess.	5	7	5	4	—	3
2.	<i>Betula humilis</i> Schrk.	6	7	4	4	—	3
3.	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	4	5	4	4	1	1
4.	<i>Alchemilla micans</i> Bus.	5	7	4	4	1	3
5.	<i>Cytisus ratisbonensis</i> Schoeff.	5	6	3	3	2	2
6.	<i>Vicia sepium</i> L.	2	2	3	3	1	2
7.	<i>Lathyrus pratensis</i> L.	3	3	3	3	1	—
8.	<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hérit.	7	7	7	7	2	1
9.	<i>Polygala comosa</i> Schkr.	6	7	4	4	1	2
10.	<i>Monotropa hypopitys</i> L.	5	6	3	3	—	3
11.	<i>Anchusa officinalis</i> L.	4	4	5	3	2	1
12.	<i>Melampyrum</i> <i>nemorosum</i> L.	2	3	2	2	1	2
13.	<i>Ajuga genevensis</i> L.	5	6	4	3	1	3
14.	<i>Phyteuma spicatum</i> L.	4	6	5	5	1	1
15.	<i>Pulicaria vulgaris</i> Gaertn.	5	6	3	3	1	2
16.	<i>Cirsium rivulare</i> (Jacq.) All.	4	6	4	4	1	3
17.	<i>Tragopogon orientalis</i> L.	6	8	5	5	1	2
18.	<i>Leontodon hispidus</i> L.	3	5	4	4	1	2
19.	<i>Hieracium murorum</i> L. em. Huds.	3	3	2	2	1	2

Otrzymane frakcje poddano badaniom pod względem aktywności cytotatycznej i obserwowano ich wpływ na wzrost liniowy i podziały mitotyczne w korzeniach przybyszowych *Allium cepa* L.

Jako wyjściowe zastosowano 0,5% roztwory badanych frakcji. W przypadku hamowania mitoz, powyżej 60%, przy zastosowaniu stężenia wyjściowego, badano wpływ roztworów o stężeniach niższych — 0,3 i 0,1%, a przy działaniu wyjątkowo silnym — także wpływ roztworu 0,05%. Uzyskane wyniki zestawiono w tab. 2.

W większości przypadków można zauważyć, że roztwory hamujące wzrost liniowy korzeni wywierają także zdecydowane działanie mitodepresyjne. Można więc przypuszczać, że inhibicyjne działanie roztworów na wzrost korzeni polega na hamowaniu podziałów mitotycznych w komórkach merystematycznych. Prawdliwość tę obserwowano również przy badaniu antymitotycznego działania wyciągów z grzybów wyższych (Turowska i wsp. 1971).

Jak wynika z danych liczbowych (tab. 2), 0,5% roztwory frakcji octanowej powodują zahamowanie wzrostu korzeni i podziałów mitotycznych o ponad 50% z 18 gatunków na 19 badanych, a 13 z nich nawet ponad 60%. Nieco słabsze działanie wywierają roztwory frakcji etanolowej, gdzie na 19 badanych hamowanie wzrostu korzeni i mitoz powyżej 50% wywoływały 0,5% roztwory tej frakcji z 13 gatunków roślin, a ponad 60% — jedynie z 8 gatunków

Zastosowanie niższych stężeń (0,3% i 0,1%) badanych frakcji pozwoliło na stwierdzenie, że silniejszy wpływ na omawiane procesy wywiera frakcja octanowa. Przy stężeniu 0,3% roztwory frakcji octanowej z 12 gatunków, a frakcji etanolowej z 5 gatunków wywierają silny wpływ hamujący, a stężenia 0,1% frakcji octanowej 9 badanych gatunków wywołują zahamowanie wzrostu korzeni i mitoz przynajmniej w 50%, podczas gdy te same stężenia frakcji etanolowej jedynie w przypadku 2 gatunków hamują mitozy powyżej 50%.

Silnym działaniem odznaczają się gatunki z rodziny *Betulaceae*. Frakcja octanowa z liści *Betula oycoviensis* powoduje zahamowanie mitoz w granicach od 85,67% przy stężeniu 0,5% do 56,02% przy stężeniu 0,1%, a wpływ tej samej frakcji z *Betula humilis* obserwuje się jeszcze przy zastosowaniu roztworu 0,05%, gdzie hamowanie mitoz wynosi 79,81%. Podobnie wysoki jest procent zahamowania wzrostu korzeni pod wpływem działania frakcji octanowej z obu badanych gatunków. Działanie frakcji etanolowej jest zdecydowanie słabsze (tab. 2).

Z rodziny *Compositae* ze względu na siłę działania wyróżniają się *Pulicaria vulgaris*, *Cirsium rivulare* i *Hieracium murorum*, których frakcja octanowa w stężeniu 0,5% hamuje mitozy o ok. 90%, a roztwór 0,1% powoduje jeszcze zahamowanie podziałów powyżej 50 lub 60%. I tu ob-

serwuje się silniejsze działanie frakcji octanowej, jedynie z *Hieracium murorum* frakcja etanolowa wykazuje równie jak octanowa silne działanie — 0,1% roztwór frakcji octanowej hamuje mitozy o 56,26%, a etanolowej — o 57,08%.

Z pozostałych rodzin na uwagę zasługują: *Erodium cicutarium* — 0,1% roztwór frakcji octanowej hamuje w 85,2% mitozy i 84% wzrost liniowy korzeni; *Lathyrus pratensis* — 0,1% roztwór daje jeszcze 71,7% hamowania mitoz i 80% wzrostu korzeni; *Monotropa hypopitys* — 0,05% roztwór powoduje jeszcze 51,78% zahamowania mitoz i 80% wzrostu korzeni; *Phyteuma spicatum* — 0,1% roztwór frakcji octanowej hamuje o 53,87% mitozy i 56% wzrost korzeni.

Ajuga genevensis stanowi jedyny spośród badanych gatunków, którego frakcja octanowa wywiera stosunkowo słabe działanie, natomiast etanolowa hamuje mitozy w granicach od 80,64% (stęż. 0,5%) do 52,84% przy stężeniu 0,05%, a wzrost korzeni od 100 do 58% (tab. 2).

Z zasługujących na szczególną uwagę badanych przez nas gatunków jedynie *Pulicaria vulgaris* znana jest z antytumorowego działania (Hartwell 1968). Z pozostałych interesujących rodzajów piśmiennictwa podaje obserwacje innych gatunków niż w naszych badaniach. Hartwell (1968, 1969) stwierdził antytumorowe działanie wyciągów z *Betula alba*, *Ajuga reptans* i *Cirsium eriophorum*, a Farnsworth (1966, 1968) też antytumorowe działanie wyciągów z *Lathyrus latifolius*, *Hieracium pilosella* i *Cirsium arvense*. Pod względem aktywności cytostatycznej badano tylko surowy wyciąg z liści *Betula verrucosa* (Oświecimska i wsp. 1977), gatunek spokrewniony z *B. oycoviensis*.

PIŚMIENICTWO

1. Borkowski B.: Naturalne związki onkostatyczne. Biul. Inst. Leków. 4, 675, 1966.
2. Borkowski B.: Zarys farmakognozji. PZWL, Warszawa 1970.
3. Borkowski B.: Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej. PZWL, Warszawa 1973.
4. Bukowiecki H., Furmanowa M.: Cytostatyki pochodzenia roślinnego. Farm. Pol. 28, 585, 1972.
5. Farnsworth N. R. i wsp.: Biological and Phytochemical Evaluation of Plants. Lloydia 6, 29, 1966.
6. Farnsworth N. R.: Pflanzen als Quelle neuer Arzneimittel gegen Krebs. Pharm. Ztg. 35, 1293, 1968.
7. Frohné D., Jensen U.: Systematik des Pflanzenreichs unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. Gustav Fischer Verl. Stuttgart 1979.
8. Grzycka K. i wsp.: Badania aktywności biologicznej wybranych gatunków roślin kwiatowych. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D 33, 275, 1978.

Tab. 2. Wpływ frakcji octanowej i etanolowej na wzrost liniowy i podziały mitotyczne w korzeniach *Allium cepa* L.
The effect of acetate and ethanol fractions on the linear growth and mitotic division in roots of *Allium cepa* L.

L.p.	Nazwa rośliny	Stężenie w %	Frakcja octanowa		Frakcja etanolowa	
			procent zahamowania		procent zahamowania	
			mitoz	wzrostu korzeni	mitoz	wzrostu korzeni
1.	<i>Betula oycoviensis</i> Bess.	0,5 0,3 0,1	85,67 ± 0,20 69,18 ± 0,48 56,02 ± 0,39	82 77 69	53,77 ± 3,10	66
2.	<i>Betula humilis</i> Schrk.	0,5 0,3 0,1 0,05	95,48 ± 0,04 70,09 ± 0,99 97,34 ± 0,06 79,81 ± 0,80	100 80 85 80	85,56 ± 0,27 48,28 ± 0,99	77 56
3.	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	0,5	50,61 ± 0,55	62	59,19 ± 0,91	78
4.	<i>Alchemilla micans</i> Bus.	0,5 0,3 0,1	67,19 ± 0,78 65,41 ± 0,50 46,94 ± 0,66	100 78 72	80,05 ± 0,43 61,15 ± 1,27 36,29 ± 0,78	80 55 20
5.	<i>Cytisus ratisbonensis</i> Schoeff.	0,5	57,58 ± 0,37	86	58,28 ± 0,26	100
6.	<i>Vicia sepium</i> L.	0,5	52,42 ± 0,85	33	42,65 ± 0,57	55
7.	<i>Lathyrus pratensis</i> L.	0,5 0,3 0,1	86,9 ± 0,46 97,26 ± 0,13 71,7 ± 0,24	67 90 80	30,51 ± 1,15	25
8.	<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hérit	0,5 0,3 0,1	92,5 ± 0,32 91,1 ± 0,22 85,2 ± 0,29	97 85 84	25,3 ± 0,56	58
9.	<i>Polygala comosa</i> Schkr.	0,5	45,44 ± 0,36	100	31,8 ± 1,38	40

10.	<i>Monotropa hypopitys</i> L.	0,5 0,3 0,1 0,05	73,01 ±1,75 87,71 ±0,55 89,6 ±0,24 51,78 ±1,82	100 83 86 80	79,56 ±0,83 38,97 ±1,60	75 50
11.	<i>Anchusa officinalis</i> L.	0,5 0,3 0,1	72,6 ±0,21 55,8 ±0,26 35,6 ±0,36	100 100 33	40,2 ±0,41	25
12.	<i>Melampyrum nemorosum</i> L.	0,5 0,3 0,1	95,25 ±0,13 85,14 ±0,60 34,88 ±0,70	89 67 38	53,75 ±0,49	50
13.	<i>Ajuga genevensis</i> L.	0,5 0,3 0,1 0,05	57,61 ±2,12	80	80,64 ±0,46 75,92 ±0,27 92,91 ±0,22 52,84 ±0,77	100 100 86 58
14.	<i>Phyteuma spicatum</i> L.	0,5 0,3 0,1	88,9 ±0,38 65,31 ±0,42 53,87 ±0,52	100 68 56	73,19 ±1,58 67,30 ±0,76 42,72 ±0,55	67 57 33
15.	<i>Pulicaria vulgaris</i> Gaertn.	0,5 0,3 0,1	96,61 ±0,32 91,48 ±0,85 69,56 ±1,22	83 85 80	62,68 ±0,98 58,59 ±2,15 43,9 ±6,46	66 46 46
16.	<i>Cirsium rivulare</i> (Jacq.) All.	0,5 0,3 0,1	89,05 ±0,56 68,64 ±0,66 62,09 ±1,66	90 80 60	61,18 ±0,27 30,07 ±0,38	86 71
17.	<i>Tragopogon orientalis</i> L.	0,5	51,96 ±3,33	100	52,03 ±0,53	60
18.	<i>Leontodon hispidus</i> L.	0,5 0,3 0,1	94,7 ±0,61 63,4 ±0,47 32,3 ±0,36	92 61 43	46,7 ±0,31	56
19.	<i>Hieracium murorum</i> L. em. Huds.	0,5 0,3 0,1	96,61 ±0,05 83,47 ±0,58 56,26 ±0,26	91 60 55	88,63 ±0,12 83,03 ±0,69 57,08 ±0,60	73 85 33

9. Hartwell J. L.: Plants Used against Cancer. *Lloydia* **31**, 2, 71, 1968.
10. Hartwell J. L.: Plants Used against Cancer. *Lloydia* **33**, 1, 79, 1969.
11. Hegnauer R.: Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart. **3**, 1964; **4**, 1966; **6**, 1973.
12. Herout V., Sorm F.: Chemotaxonomy of the Sesquiterpenoids of the *Compositae*. [w:] Perspectives in Phytochemistry. Edited by J. B. Harborne and T. Swain. Academic Press, London and New York 1969.
13. Jerzmanowska Z.: Substancje roślinne. Metody wyodrębniania. PWN, Warszawa 1967.
14. Linskenš H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Springer Verlag. Berlin—Göttingen—Heidelberg 1959.
15. Miłkowska J. i wsp.: Badania aktywności biologicznej wybranych gatunków roślin kwiatowych. Część II. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D **35**, 169, 1980.
16. Oświecimska M. i wsp.: Skriningowe badania cytostatycznej aktywności wyciągów roślinnych. Acta Pol. Pharm. **34**, 313, 1977.
17. Ożarowski A.: Poszukiwania nowych substancji pochodzenia naturalnego o działaniu przeciwnowotworowym. Farm. Pol. **28**, 593, 1972.
18. Turowska I. i wsp.: Badania biologicznej aktywności kilku gatunków grzybów wyższych przy zastosowaniu testu cebulowego. Herba Pol. **17**, 123, 1971.

Otrzymano 20 II 1980.

РЕЗЮМЕ

Исследовалась цитостатическая активность уксуснокислой и этаноловой фракций из выделенных в результате проведенного ранее скрининга (Гжицка и сотр. 1978; Миłковска и сотр. 1979) 19 видов цветочных растений. Установлено, что в 10 видах более сильное действие оказывала уксуснокислая фракция, в одном — этаноловая, а в остальных 8 видах сила действия обеих фракций была более или менее одинаковой (табл. 2).

Дальнейшего внимательного исследования заслуживают уксуснокислые фракции из *Betula humilis*, *B. oycoviensis*, *Pulicaria vulgaris*, *Cirsium rivulare*, *Hieracium murorum*, *Lathyrus pratensis*, *Monotropa hypopitys*, *Phyteuma spicatum* и этаноловая фракция из *Ajuga genevensis*.

SUMMARY

Examinations were made of the cytostatic activity of acetate and ethanol fractions from 19 species of flower plants selected as a result of earlier screening examinations (Grzycka et al. 1978, Miłkowska et al. 1979). A stronger activity of acetate fraction was found in 10 species of flower plants. In the case of one species a stronger activity of ethanol fraction was assessed. In the remaining 8 species the degree of the activity of both fractions was similar (Table 2).

Detailed examinations of cytostatic activity of acetate fraction ought to be made from *Betula humilis*, *B. oycoviensis*, *Pulicaria vulgaris*, *Cirsium rivulare*, *Hieracium murorum*, *Lathyrus pratensis*, *Monotropa hypopitys* and *Phyteuma spicatum*. The activity of ethanol fraction from *Ajuga genevensis* is to be also examined.