

R. KADŁUBOWSKI, H. SKAŁECKA

WPLYW KWASU BETA-INDOLILOOCTOWEGO  
I 2,4-DWUCHLOROFENOKSYOCTANU SODU  
NA ZAWARTOŚĆ SAPONIN W MYDLNICY LEKARSKIEJ  
(*SAPONARIA OFFICINALIS* L.)  
I NAPARSTNICY PURPUROWEJ (*DIGITALIS PURPUREA* L.)

Z Katedry Biologii i Parazytologii Lekarskiej A. M. w Łodzi

Kierownik: doc. dr R. Kadłubowski

Zawartość ciał czynnych w roślinach leczniczych może, jak wiadomo, ulegać dużym odchyleniom pod wpływem czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych. Wykazaliśmy poprzednio, że opryskiwanie naparstnicy purpurowej (*Digitalis purpurea* L.) roztworami kwasu beta-indolilooctowego zwiększyło zawartość glikozydów działających na serce o 49% w porównaniu z kontrolą [3]. Zachęcające wyniki dały doświadczenia z bielunem dziedzierzawą (*Datura stramonium* L.), w których wzrost zawartości alkaloidów pod wpływem kwasu beta-indolilooctowego wynosił 57%. Również opryskiwanie lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.) roztworami tego kwasu lub 2,4-dwuchlorofenoksyoctanu sodu zwiększyło o 11% ewentualnie 12% zawartość tłuszczu w nasionach, nieznacznie tylko zmieniając wartość śluzową surowca [4]. Niniejsza praca stanowi dalszy ciąg badań nad wpływem substancji wzrostowych na zawartość ciał czynnych w roślinach leczniczych.

METODYKA

Na 4 jednakowych poletkach wysadzano w maju w odstępach 25×25 cm po 100 dwuletnich osobników mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) znajdujących się w okresie 5—7 liści. Rośliny otrzymano z uprawy prowadzonej przez Miejski Ogród Botaniczny w Łodzi. Rośliny opryskiwano za pomocą rozpylacza dwukrotnie w odstępie miesiąca roztworami substancji wzrostowych w wodzie przekroplonej, a mianowicie 0,01% (grupa B<sub>1</sub>) i 0,0001% roztworem kwasu beta-indolilooctowego (grupa B<sub>2</sub>) oraz 0,0001% roztworem 2,4-dwuchlorofenoksyoctanu sodu (grupa C). Rośliny kontrolne (grupa A) opryskiwano wodą przekroploną. Rośliny w okresie doświadczeń były odchwaszczone i podlewane w okresach suszy. Zbiór korzeni dokonano we wrześniu. Surowiec ważono, suszono w suszarce o ciepłocie 55° i przechowywano zgodnie z wymaganiami Farmakopei Polskiej III.

W analogicznych warunkach wysadzono wiosną na 3 poletkach w odstępach 35×35 cm dwuletnie osobniki naparstnicy purpurowej (*Digitalis purpurea* L.). Rośliny opryskiwano dwukrotnie 0,01% (grupa B<sub>1</sub>) i 0,0001% (grupa B<sub>2</sub>) roztworem kwasu beta-indoliloctowego w wodzie przekroplonej z domieszką ciał zawieszających. Rośliny kontrolne (grupa A) opryskiwano wodą przekroploną zawierającą ciała zawieszające. Pierwszy zbiór surowca nastąpił w czerwcu po 7 dniach od chwili opryskiwania. Zbierano po 3 jednakowo położone liście z 25 niekwitających osobników. Liście suszono w suszarce w ciepłocie 50—60°, proszkowano i przechowywano zgodnie z wymaganiami Farmakopei Polskiej III. Drugiego zbioru liści dokonano w podobny sposób w lipcu w odstępie 7-dniowym od drugiego opryskiwania. Rośliny w okresie doświadczeń były odchwaszczane i podlewane w okresach suszy.

Zawartość saponin w korzeniu mydlnicy oznaczano początkowo sposobem Rungego [5], używając 2% naparu i odczytując wyniki po 24 godzinach. Wobec trudności stwierdzenia, czy hemoliza jest całkowita, wprowadzono modyfikację metody, polegającą na odwirowaniu ocenianej próbki (2500 obrotów/min. w ciągu 5 minut). Hemolizę uważano za całkowitą, jeżeli po odwirowaniu nie stwierdzono czerwonego osadu. Działanie hemolityczne (D) obliczano za pomocą wzoru Rungego

$$D = 4000 \frac{W_s}{W_d},$$

w którym W<sub>s</sub> jest wskaźnikiem hemolitycznym surowca, a W<sub>d</sub> — wskaźnikiem hemolitycznym kwasu dezoksycholowego. Wskaźniki te odczytywano z tabeli Rungego [1].

W toku doświadczeń przekonano się, że sposób Rungego jest pod wieloma względami niezadowolający. Do ujemnych stron sposobu można zaliczyć: subiektywną ocenę hemolizy, 24—36-godzinny okres czasu niezbędny do wykonania próby, możliwość hemolizy wywołanej w ciągu tego okresu innymi czynnikami, trudność przeliczenia działania hemolitycznego na zawartość saponin w surowcu, niejednokrotnie trudności otrzymania świeżej krwi bydlęcej i czystego kwasu dezoksycholowego.

W związku z tym opracowano własny sposób oznaczania saponin, wykorzystując ich właściwości hemolityczne. Porzebną ilość surowca zalewano 100 ml 0,72% roztworu chlorku sodu zawierającego 0,395% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O i 0,76% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ogrzewano, mieszając na łaźni wodnej w ciepłocie 90° w ciągu 30 minut, po ostudzeniu przesączano i uzupełniano objętość do 100 ml tym samym roztworem chlorku sodu: 1 ml tego wyciągu dodawano do próbki wirowniczej zawierającej 8 ml roztworu chlorku sodu z buforem fosforanowym (j. w.) i 1 ml 5% zawiesiny krwinek człowieka. Zawiesinę krwinek przygotowano z krwi konserwowanej (na „białym cytrynianie”) dwukrotnie przepłukując krwinki roztworem chlorku sodu (j. w.). Po 1 godzinie próbkę wirowano (2500 obrotów/min., 2 minuty) i oznaczano ekstynkcję (e<sub>x</sub>) płynu pobranego z nad osadu w fotometrze Pulfricha (średnica kuwety 10 mm, filtr S 57) wobec roztworu chlorku sodu (j. w.). Krzywą wzorcową otrzymano oznaczając w podobnych warunkach ekstynkcje płynów z próbek, do których użyto zamiast wyciągu roztworów saponiny (*Digitonin Merck*) w różnych stężeniach.

Równanie krzywej wzorcowej obliczano za pomocą regresji sposobem najmniejszych kwadratów. Stężenie (X) saponin w badanej próbce obliczano bezpośrednio za pomocą równania krzywej wzorcowej

$$X = \bar{C} + \frac{1}{b} (e_x - \bar{e}), \quad b = \frac{\sum e (C - \bar{C})}{\sum (C - \bar{C})^2},$$

gdzie  $C$  = średnia wartość stężeń roztworów saponiny wzorcowej,  $e$  = ekstynkcja płynu badanej próbki,  $\bar{e}$  = średnia wartość ekstynkcji próbek z roztworami saponiny wzorcowej,  $e$  ewentualnie  $C$  są wartościami ekstynkcji ewent. stężeń z roztworami saponiny wzorcowej,  $\Sigma$  = znak sumy.

Przedstawiony sposób umożliwia obiektywną ocenę hemolizy przy pomocy fotometru Pufricha. czas hemolizy jest skrócony do 1 godz., wynik podaje bezpośrednio stężenie saponin w wyciągu. Nie bez znaczenia jest także ze stanowiska medycyny oznaczenie działania hemolitycznego w stosunku do krwinek człowieka, a nie zwierzęcych.

W doświadczeniach używano 0,25% wyciągu liści naparstnicy purpurowej. Suchą masę oznaczano za pomocą suszenia surowca w ciepłocie 100–105° do stałego ciężaru. Istotność statystyczną wyników oceniano za pomocą wskaźnika  $t$  według *Fishera*.

### WYNIKI

Doświadczenia nasze wykazały, że opryskiwanie mydlnicy lekarskiej roztworami 0,01% ewent. 0,0001% kwasu beta-indoliloctowego zwiększyło zawartość saponin w korzeniu o 20% ewent. 41% w porównaniu z kontrolą (poziom wiarygodności różnicy  $P < 0,001$ ). Średnia zawartość saponin w korzeniu mydlnicy opryskiwanej tymi roztworami wynosiła odpowiednio  $3,97 \pm 0,14$  i  $4,66 \pm 0,04\%$ , u roślin kontrolnych  $3,31 \pm 0,07\%$ . Również opryskiwanie 0,0001% roztworem 2,4-dwuchlorofenoksyoctanu sodu zwiększyło zawartość saponin w korzeniu o 43%, tzn. do  $4,76 \pm 0,05\%$  ( $P < 0,001$ ). Warto zaznaczyć, że miara pośrednia ilości saponin, tzw. działanie hemolityczne według *Rungego*, wykazywało mniej wyraźne odchylenia (tab. 1).

Sucha masa korzenia mydlnicy nie zmieniła się w sposób znamieny statystycznie we wszystkich grupach w porównaniu z kontrolą.

W pierwszym zbiorze liści naparstnicy purpurowej opryskiwanej 0,01% lub 0,0001% roztworem kwasu beta-indoliloctowego nie stwierdzono znamienych statystycznie odchylen zawartości saponin (tab. 2). Zwiększyła się natomiast sucha masa surowca o 30–34% ( $P < 0,001$ ).

W drugim zbiorze liści zawartość saponin wzrosła o 37% ( $P < 0,001$ ) u roślin opryskiwanych 0,0001% roztworem kwasu beta-indoliloctowego, a zmniejszyła się o 9% w grupie opryskiwanej 0,01% roztworem tego kwasu. Jeśli uwzględnimy, że sucha masa liścia uległa zmniejszeniu pod wpływem 0,01% roztworu ( $0,460 \pm 0,054$  g), a zwiększeniu u roślin opryskiwanych 0,0001% roztworem tego kwasu ( $0,705 \pm 0,200$  g) w porównaniu z kontrolą ( $0,574 \pm 0,004$  g), to odchylenia zawartości saponin są jeszcze wyraźniejsze. Ilość saponin w jednym liściu wynosiła mianowicie u roślin opryskiwanych 0,0001% roztworem  $1,490 \pm 0,422$  mg,  $0,647 \pm 0,076$  mg u opryskiwanych 0,01% roztworem kwasu indoliloctowego i  $0,887 \pm 0,061$  w grupie kontrolnej. Oznacza to, że opryskiwanie naparstnicy bardziej rozcieńczonym roztworem kwasu beta-indoliloctowego

zwiększa zarówno zawartość saponin w surowcu, jak i plon ogólny. Należy podkreślić, że w tych samych warunkach stwierdziliśmy poprzednio również wzrost zawartości glikozydów nasercowych w liściu naparstnicy o 48%.

*Tabela 1. Działanie substancji wzrostowych na zawartość saponin w korzeniu mydlnicy lekarskiej*  
*Table 1. Effect of growth substances on saponins content of Radix Saponaria offic.*

Grupa 1)	Sucha masa 2) %	Saponiny w suchej masie 3) %	Działanie hemolityczne 4)
A Kontrola 5)	42,5 ± 17,89 (100%)	3,31 ± 0,07 (100%)	2591 ± 164,5 (100%)
B <sub>1</sub> 0,01% kw. beta-indolilo- octowy 6) wiarogodność różnicy 7)	51,2 ± 3,50 (121%) brak	3,97 ± 0,14 (120%) p < 0,001	2926 ± 170,6 (113%) brak
B <sub>2</sub> 0,0001% kw. beta-indolilo- octowy 6) wiarogodność różnicy 7)	47,3 ± 7,75 (111%) brak	4,66 ± 0,04 (141%) p < 0,001	3185 ± 91,3 (123%) p < 0,02
C <sub>2</sub> 0,0001% 2,4-dwuchlorofe- noksyoctan sodu 8) wiarogodność różnicy 7)	57,5 ± 1,46 (135%) brak	4,76 ± 0,05 (143%) p < 0,001	2819 ± 91,3 (109%) brak

Obok średnich wartości podano średnie odchylenie.

The mean value is everywhere given with standard deviation

group 1); dried matter % 2); saponins content of dried matter % 3); hemolytic action according to Runge 4); control 5); β-indoleacetic acid 6); significance of the difference 7); sodium 2—4 dichlorophenoxyacetate.

Wyniki naszych doświadczeń wskazują na możliwość zwiększenia zawartości ciał czynnych w roślinach leczniczych za pomocą substancji wzrostowych. Wydaje się, że opisane przez nas postępowanie mogłoby znaleźć zastosowanie praktyczne po wypróbowaniu w warunkach polowych, zwłaszcza, że dostępny i tani środek chwastobójczy 2,4-dwuchlorofenoksyoctan sodu wykazał w doświadczeniach z mydlnicą podobne działanie, jak kwas beta-indoliloctowy. Z drugiej strony należałoby się liczyć ze zmianami zawartości różnych składników roślin uprawnych narażonych na działanie związków chwastobójczych.

#### WNIOSKI

1. Opryskiwanie mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) roztworami 0,01 lub 0,0001% kwasu beta-indoliloctowego zwiększa zawartość

saponin w korzeniu mydlnicy o 20 lub 41% w porównaniu z kontrolą. Również opryskiwanie 0,0001% roztworem 2,4-dwuchlorofenoksyoctanu sodu powoduje wzrost zawartości saponin w korzeniu mydlnicy o 43%.

## 2. Zawartość saponin w liściu naparstnicy purpurowej (*Digitalis pur-*

Tabela 2. Działanie substancji wzrostowych na zawartość saponin w liściu naparstnicy purpurowej

Table 2. Effect of growth substances on saponins content of *Folium Digitalis purp.*

Grupa 1)		Sucha masa 2) %	Saponiny w suchej masie 3) %	Saponiny w suchej masie 1 liścia mg
I zbiór 8)	A Kontrola 5)	18,1±2,25 (100%)	0,112±0,0034 (100%)	0,184±0,0302 (100%)
	B <sub>1</sub> 0,01% kw. beta-indoliloctowy 6) wiarogodność różnicy 7)	24,4±1,36 (134%) p<0,001	0,110±0,0065 ( 99%) brak	0,169±0,0121 ( 91%) brak
	B <sub>2</sub> 0,0001% kw. beta-indoliloctowy 6) wiarogodność różnicy 7)	23,5±3,63 (130%) p<0,001	0,110±0,0090 ( 99%) brak	0,186±0,0352 (101%) brak
II zbiór 9)	A Kontrola 5)	21,5±0,77 (100%)	0,155±0,0346 (100%)	0,887±0,0605 (100%)
	B <sub>1</sub> 0,01% kw. beta-indoliloctowy 6) wiarogodność różnicy 7)	20,4±2,63 ( 95%) brak	0,141±0,0014 ( 91%) p<0,001	0,647±0,0761 ( 73%) p<0,001
	B <sub>2</sub> 0,0001% kw. beta-indoliloctowy 6) wiarogodność różnicy 7)	20,8±1,49 ( 97%) brak	0,211±0,0520 (137%) p<0,02	1,490±0,4220 (170%) p<0,001

Obok średnich wartości podano średnie odchylenie.

The mean value is everywhere given with standard deviation.

Group 1): dried matter % 2); saponins content of dried matter % 3); saponins in dried matter of 1 leaf mg 4); control 5); 3-indoleacetic acid 6); significance of the difference 7); first crop 8); second crop 9).

pu-za L.) jednokrotnie opryskiwanej 0,01 lub 0,0001% roztworem kwasu beta-indoliloctowego nie ulega zmianie. Dwukrotne opryskiwanie naparstnicy 0,0001% roztworem tego kwasu powoduje wzrost zawartości saponin o 37%. Po uwzględnieniu przyrostu masy liścia zwiększenie zawartości saponin wynosi 70%. Opryskiwanie 0,01% roztworem kwasu beta-indoliloctowego obniża zawartość saponin i zmniejsza masę liścia.

Przedstawione wyniki mogą mieć również znaczenie praktyczne.

Pani Doc. Zielińskiej-Sowickiej, Kierownikowi Katedry Farmakognozji A. M. dziękujemy uprzejmie za umożliwienie prowadzenia doświadczeń w Miejskim Ogrodzie Botanicznym w Łodzi.

## PIŚMIENNICTWO

1. Büchner S.: Metody badania roślinnych surowców leczniczych. Warszawa, 1956.
2. Fisher R. A.: Statistical methods for research workers. London, 1936.
3. Kadłubowski R., Skatecka H.: Acta Physiol. Pol., 1957, 8, 365.
4. Kadłubowski R., Skatecka H., Wika A.: Acta Physiol. Pol. (w druku).
5. Runge P. A.: Helv. Physiol. Pharm. Acta, 1952, 27, 315.

Otrzymano: 5. 11. 1960.

Adres autorów: Katedra Biologii i Parazytologii A. M. w Łodzi, ul. Kościuszki 85.

*Р. Кадлубовски, Г. Скалэцка*

ВЛИЯНИЕ  $\beta$  ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ И 2,4-ДИХЛОРОФЕНОКСИАЦЕТАТА НАТРИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ САПОНИНОВ В АПТЕЧНОЙ МЫЛЬНЯНКЕ (*SAPONARIA OFFICINALIS L.*) И КРАСНОЙ НАПЕРСТЯНКЕ (*DIGITALIS PURPUREA L.*)

### *Содержание*

Растения выращиваемые в стандартных условиях, опрыскивались двукратно растворами  $\beta$ -индолилуксусной кислоты или 2,4-дихлорфеноксиацетата натрия с помощью пульверизатора. Сырье в виде корня *Saponaria* и листьев *Digitalis* собирали, сушили и хранили согласно требованиям Польской Фармакопеи III.

Содержание сапонинов определяли собственным методом: 0,25 г (корня) либо 2,00 (листьев) сырья заливали буферным раствором хлората натрия.

После 1 часа пробу (10 мл) центрифугировали и определяли экстинкцию жидкости в фотометре Пульфриха (диаметр кюветы 10 мм, фильтр S 57) в присутствии раствора хлората натрия. Стандартную кривую определяли используя вместо экстрактов растворов — Digitonin Merck. Уравнение кривой вычислили с помощью регрессии по методу наименьших квадратов.

Спрыскивание *Saponaria officinalis L.* растворами 0,01 или 0,0001%  $\beta$ -индолилуксусной кислоты увеличило содержание сапонинов в корне на 20 до 41% по сравнению с контролем. Также спрыскивание 0,00001% раствором 2,4-дихлорфеноксиацетата натрия увеличивало содержание сапонинов в корне на 43% (таб. 1).

Содержание сапонинов в листьях *Digitalis purp. L.* однократно спрыскиваемых 0,01 или 0,0001% раствором  $\beta$ -индолилуксусной кислоты не изменяется. Двукратное спрыскивание наперстянки 0,0001% раствором этой кислоты увеличивало содержание сапонинов на 37%. Учитывая прирост массы листьев, увеличение содержания сапонинов составляло 70%. Спрыскивание 0,01% раствором  $\beta$ -индолилуксусной кислоты понижало содержание сапонинов и уменьшало массу листы (таб. 2).

Подчеркивается возможность увеличения содержания активных начал в лечебных растениях используя возрастные субстанции.

R. Kadłubowski, H. Skatecka

THE EFFECTS OF BETA-INDOLYLACETIC ACID AND SODIUM 2,3-DICHLORO-PHENOXYACETATE ON THE SAPONIN CONTENT OF SOAPWORT (*SAPONARIA OFFICINALIS* L.) AND PURPLE FOXGLOVE (*DIGITALIS PURPUREA* L.)

*Summary*

The plants were grown under standard conditions and sprayed repeatedly with either beta-indolylacetic acid or sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate solutions. Soapwort roots and foxglove leaves were collected, dried, and stored as prescribed by Polish Pharmacopeia III.

The authors' own method was used to determine saponin content: the raw material (root 0.25 g., or leaves 2.00 g.) were poured over with a buffered isotonic solution of sodium chloride, heated (90°C, 30 min.) cooled, filtered, completed to 100 ml and added in 1-ml. portions to centrifuge tubes containing a 0.5% suspension of human red cells in buffered sodium chloride.

After 1 hour, the mixture (10 ml.) was centrifuged, and extinction was measured on a Pulfrich photometer (10-ml. cells, filter S 57) against a sodium chloride solution (as above). Digitonin Merck solution was used to plot the standard curve. The equation of the curve was computed with the aid of regression by the method of least squares.

Spraying of soapwort with 0.01 and 0.0001% solutions of beta-indolylacetic acid increased the saponin content in the roots by 20 and 41 percent respectively with reference to controls. Similarly, a 0.0001% solution of sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate increased the saponin content by 43 per cent (Table 1).

The saponin content in foxglove leaves was unaffected by single spraying with either 0.01 or 0.0001% solutions of beta-indolylacetic acid. Twofold spraying with a 0.0001% solution, however, increased the saponin content by 37 percent, and allowing for the increase in leaf weight even by 70 percent. Spraying with a 0.01% solution of the acid diminished both the saponin content and leaf weight (Table 2).

The paper emphasizes the practicability of increasing the content of active substances in medicinal plants with the aid growth hormones.