

©Borgis

Michał Wysocki, Justyna Chanaj, Maria Sikorska, \*Irena Matławska

## Badania fitochemiczne *Asclepias tuberosa* L.

Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. Irena Matławska

### PHYTOCHEMICAL RESEARCH OF THE ASCLEPIAS TUBEROSA L.

#### SUMMARY

The aim of this work was to examine free phenolic acids and flavonoid compounds in the leaves and fruit (seeds, seed hairs, pericarps) of *Asclepias tuberosa* L. The chromatographic analysis of the fractions of ethyl ether was used to establish the presence of free phenolic acids. The compounds which were found are: *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxyphenylacetic acid, *cis/trans* *p*-coumaric acid, hydrocaffeic acid, vanillic acid, *cis/trans* ferulic acid, isovanillic acid. For the isolation and identification of flavonoids, buthanolic fraction from the methanolic and methanolic-aqueous extract of the leaves and aqueous residues received from the methanolic extract of the pericarps, as well as from the methanolic-aqueous extract of the seed hairs were used. The compounds were separated by using paper and column chromatography methods. The structure of the flavonoid compounds was determined on the basis of partial and total acidic hydrolysis, the values of  $R_f$  factor and cochromatography with reference standards. In order to determine the position of the free or substituted hydroxyl groups of flavonoids, the analysis of UV spectra was performed. The following flavonoids were isolated and their structure was described: quercetin 3-*O*-galactoside, quercetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-arabinosyl-galactoside, quercetin 3-*O*-rhamnosyl-glucoside, kaempferol 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-diglucoside, kaempferol 3-*O*-galactosyl-glucoside, kaempferol 3-*O*-rhamnosyl-glucoside.

KEY WORDS: ASCLEPIAS TUBEROSA – BUTTERFLY  
MILKWEED – FLAVONOIDS – PHENOLIC  
ACIDS

#### Wstęp

Trojeść bulwiasta (*Asclepias tuberosa* L.) jest jednym ze 100 gatunków należących do rodzaju *Asclepias* L. Są to krzewy, rośliny jednoroczne oraz byliny, występujące na obszarze Ameryki Północnej oraz południowej Afryki (1), a jeden gatunek (*Asclepias curassavica* L.) rośnie na terenie Chin (2). Cechą charakterystyczną tych roślin, z wyjątkiem *Asclepias tuberosa* L., jest obecność w liściach i łodygach soku mlecznego (3).

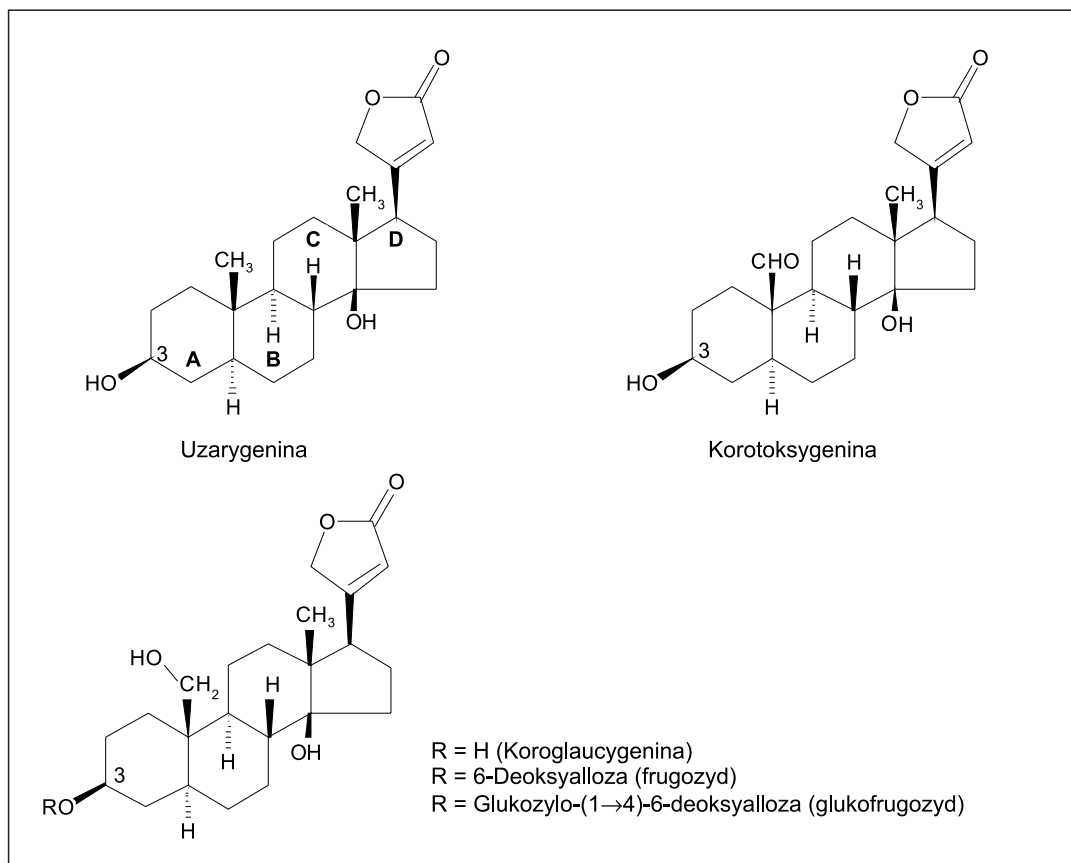
*Asclepias tuberosa* L. jest byliną o bulwiastym kłączu, preferującą piaszczystą glebę ubogą w sole mineralne oraz słoneczne lub częściowo zacienione stanowiska (4). Naturalnie występuje na terenie Stanów Zjednoczonych, głównie wzdłuż wschodniej części Ameryki Północnej (5, 6). Zasięg występowania rozciąga się od Ontario w Kanadzie i Minnesoty, na wschód po Nowy Jork, na południe po Florydę, a na zachód aż po okolice Kolorado, Teksasu i Arizony (7).

#### Skład chemiczny

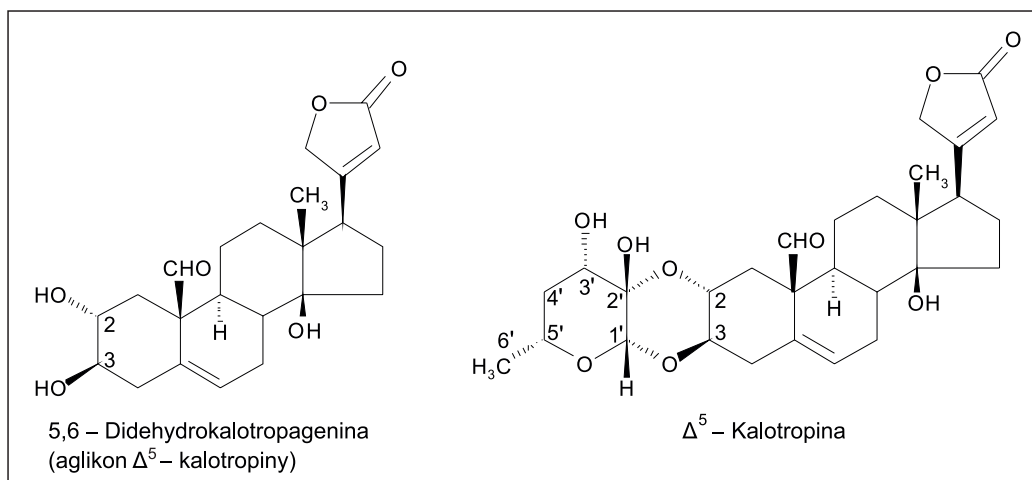
Pierwsze badania składu chemicznego korzenia trojeści bulwiastej przeprowadzono pod koniec XIX wieku. W *Asclepias tuberosa* L., według danych literaturowych, obecne są trzy grupy związków naturalnych: kardenolidy, flawonoidy oraz związki steroidowe typu androstanu i pregnanu (8, 9).

W korzeniu trojeści bulwiastej wykazano obecność dwóch typów kardenolidów, różniących się sposobem przyłączenia części cukrowej. Pierwszy typ to kardenolidy z częścią cukrową w pozycji C-3 $\beta$ , reprezentowane przez uzarygeninę, korotoksygeninę, koroglaucygeninę i ich 3-*O*-glikozydy, głównie: glukofrukozyd (3-*O*-glukozylo-(1 $\rightarrow$ 4)-6-deoksyallozyd koroglaucygeniny) oraz frugozyd (3-*O*-6-deoksyallozyd koroglaucygeniny) (ryc. 1). Ich charakterystyczną cechą jest konfiguracja *trans* pierścieni A/B układu kardenolidu (8, 10).

Aglikon drugiego typu związków kardenolidowych charakteryzuje się obecnością grup hydroksylowych w pozycjach C-2 $\alpha$  i C-3 $\beta$ , do których przyłączona jest zmodyfikowana deoksyheksuloza. Głównym związkiem jest  $\Delta^5$ -kalotropina oraz jej pochodne: octan, 3'-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozyd, (3'S)-3'--tiazolidynon oraz S-tlenek (3'R)-3'-tiazolidynonu (ryc. 2) (8).



Ryc. 1. Struktura chemiczna wybranych kardenolidów występujących w trojeści bulwiastej.



Ryc. 2. Struktura chemiczna wybranych kardenolidów w trojeści bulwiastej.

W liściach trojeści bulwiastej występują związki flawonoidowe: 3-O- $\beta$ -D-ksylopiranozylo-(1→2)- $\beta$ -D-galaktopiranozyd kwercetyny, odpowiedzialny prawdopodobnie za przywabianie motyli monarszych (*Danaus plexippus*) (11), stąd angielska nazwa rośliny butterfly milkweed.

Związki steroidowe typu androstanu reprezentowane są przez askandrozyd (17-O- $\alpha$ -L-arabinopiranozylo-

-(1→6)- $\beta$ -D-glukopiranozyd 17 $\alpha$ -hydroksyandrosta-4,6,15-trien-3-onu). Steroidy typu pregnanu, pochodne lineolonu, ikemageniny oraz pleurogeniny, występują w formie 3-O-glikozydów, w których od 3 do 7 cząsteczek cukrów (cymarozoy, oleandrozy, digitoksozy, kanarozoy, tewetozoy i glukozy) połączonych jest wiązaniami  $\beta$ -(1→4) (9). Struktura chemiczna wybranych związków steroidowych wystę-

pujących w trojeści bulwiastej przedstawiona została na rycinie 3.

## Działanie i zastosowanie

### Aktywność biologiczna

Badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej wyciągów wodno-etanolowych z liści, kwiatów, łodyg i owoców *Asclepias tuberosa* L. przeprowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną wobec drobnoustrojów: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Candida albicans*. Strefa zahamowania wzrostu *Staphylococcus aureus* przez wyciąg z kwiatów wynosiła 7 mm, podczas gdy próby kontrolnej (chloramfenikol) 27 mm (12).

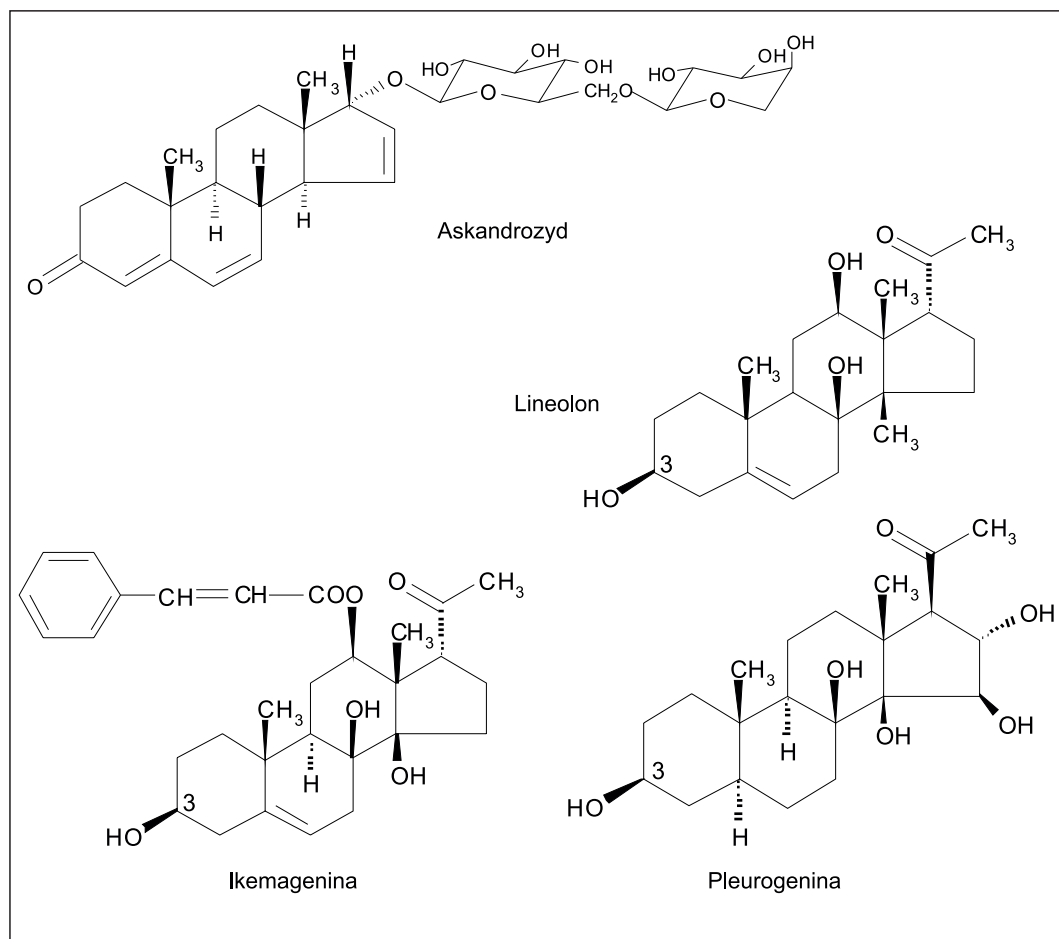
Właściwości antyoksydacyjne metanolowych ekstraktów z owoców *Asclepias tuberosa* L. badano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl), a otrzymana wartość wyrażona jako ekwiwalent Troloxu ( $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ ) wynosiła  $6,605\ \mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$  (13), co wskazuje na nieznaczną aktywność antyoksydacyjną.

Wykazano również właściwości kurczące macicę i działanie estrogenne trojeści bulwiastej, stąd stosowanie wyciągów przeciwwskazane jest w ciąży oraz w okresie laktacji (14, 15).

### Zastosowanie

Korzeń trojeści bulwiastej wykorzystywany był przez Indian jako środek wykrztusny i ułatwiający oddychanie w zapaleniu opłucnej i płuc, a także jako środek napotny; ponadto w stanach zapalnych błon śluzowych, biegunkach, czerwonce, bólach reumatycznych i bólach brzucha (16, 17). Jego właściwości napotne, wykrztusne i przeciwbólowe wykorzystywano w łagodzeniu objawów grypy podczas pandemii w Hiszpanii w latach 1918-1919 (18).

Pranalewka przygotowana z części podziemnych trojeści bulwiastej jest wykorzystywana w homeopatii w zapaleniu opłucnej z towarzyszącym suchym kaszlem, w nerwobólach międzyżebrowych oraz objawach przypominających dusznicę bolesną w przebiegu dolegliwości reumatycznych (zespół Tietze'a) i biegunkach (19). Dostępne są również wieloskładnikowe leki ho-



Ryc. 3. Struktura chemiczna wybranych związków steroidowych występujących w trojeści bulwiastej.

meopatyczne, np. preparaty firmy Heel: BHI Chest®, Rhododendroneel®, Ranunculus-Homaccord®.

### Działania uboczne

Najczęściej obserwowanymi objawami ubocznymi są: zaburzenia dyspeptyczne (nudności, wymioty, biegunka), duszność, trudności w utrzymaniu równowagi i chodzeniu (osłabienie), wzrost temperatury ciała, bradykardia, rozszerzenie źrenic, hipokalemia (skurcze mięśni gładkich), a nawet śpiączka (20, 21). Obserwowano też zatrucia spowodowane spożyciem rośliny w ilości około 2% masy ciała przez owce, kozy, konie oraz bydło (22).

### Materiały i metody

Materiałem do badań były wysuszone liście oraz owoce *Asclepias tuberosa* L., które rozdzielono na owocnie, włoski nasienne oraz nasiona. Ekstrakcję prowadzono na łaźni ultradźwiękowej w temperaturze wrzenia metanolu i mieszaniny metanol-woda (1:1). Otrzymane wyciągi z liści oraz z poszczególnych części owoców po odparowaniu do suchej masy, zalano gorącą wodą i pozostawiono na 24 godziny w celu wytrącenia substancji balastowych. Następnie przeprowadzono frakcjonowanie wyciągów rozpuszczalnikami organicznymi, otrzymując frakcje chloroformowe, eteru etylowego i pozostałości wodne. Wyciągi uzyskane z liści wytrząsano dodatkowo butanolem. Do analizy wolnych kwasów fenolowych przeznaczono frakcje eteru etylowego. Natomiast do izolacji związków flawonoidowych wykorzystano pozostałości wodne, uzyskane z ekstraktów metanolowych z owocni i ekstraktów metanolowo-wodnych z włosków nasiennych oraz połączone frakcje butanolowe otrzymane z ekstraktu metanolowego i metanolowo-wodnego z liści.

Identyfikację kwasów fenolowych we frakcji eteru etylowego przeprowadzono za pomocą dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej na płycie aluminiowej pokrytej celulozą (DC-Alufolien Cellulose 60 firmy Merck). Chromatogramy po rozwinięciu i wysuszeniu analizowano w świetle lampy UV<sub>365 nm</sub>, porównując uzyskane obrazy z równoległe wykonanym chromatogramem z wzorcowymi kwasami fenolowymi.

Do izolacji związków flawonoidowych z owoców wykorzystano bibułową chromatografię preparatywną (Whatman nr 3). Rozwinięte i wysuszone chromatogramy analizowano w świetle lampy UV<sub>365 nm</sub>. Fluoryzujące brunatno pasma zaznaczono, wycinano, po czym eluowano każdorazowo dwukrotnie metanolem oraz mieszaniną metanol-woda (1:1) na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Uzyskane eluaty przesączono i zagęszczono, otrzymując jednorodne chro-

matograficznie związki. W przypadku liści pierwszym etapem izolacji było zastosowanie chromatografii kolumnowej (celuloza Whatman CF-11). Substancje eluowano układem rozpuszczalników: octan etylu-metanol-woda (100:6:20). Następnie odpowiednio połączone frakcje poddano rozdziałowi przy użyciu bibułowej chromatografii preparatywnej, uzyskując w ten sposób związki jednorodnie chromatograficznie.

W celu identyfikacji wyizolowanych flawonoidów poddano je hydrolizie kwasowej częściowej oraz całkowitej. Produkty hydrolizy analizowano chromatograficznie, identyfikując aglikony i cukry, a także powstające w wyniku hydrolizy częściowej związki wtórne. Celem ustalenia położenia wolnych, bądź podstawionych grup hydroksylowych, przeprowadzono analizę spektralną w nadfiolecie (Spectrometer UV-VIS Lambda 35 firmy Perkin Elmer Instruments). Wykonano widma UV dla roztworów metanolowych, a następnie po dodaniu odczynników jonizujących i kompleksotwórczych: CH<sub>3</sub>COONa, CH<sub>3</sub>COONa/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>ONa. Analizę uzyskanych widm przeprowadzono według Mabry'ego i wsp. (23). Dodatkowo wyizolowane flawonoidy porównano chromatograficznie z flawonoidami wyizolowanymi z innych gatunków z rodzaju *Asclepias* L. (24-28).

### Dyskusja

Wyniki badań wskazują na obecność związków flawonoidowych w liściach oraz owocniach i włoskach nasiennych pochodzących z owoców *Asclepias tuberosa* L. W nasionach nie stwierdzono obecności flawonoidów.

W uzyskanych widmach UV określono położenie I i II maksimum oraz ich przesunięcia po dodaniu odczynników jonizujących i kompleksotwórczych w stosunku do widma w metanolu. Analiza widm UV wykazała, że wszystkie flawonoidy są flawonolami, z zablokowanymi grupami hydroksylowymi w pozycji C-3 (wartość I maksimum w metanolu w granicach 328-357 nm), wolnymi grupami hydroksylowymi w pozycjach C-4' (przesunięcie I maksimum w granicach 40-65 nm pod wpływem metylanu sodu) i C-7 (przesunięcie II maksimum w granicach 5-20 nm pod wpływem octanu sodu). Przesunięcie natomiast I maksimum w widmie z octanem sodu i kwasem borowym w granicach 12-36 nm, świadczy o obecności w związkach 1, 2, 3, 4 ugrupowania ortodihydroksylowego w pierścieniu B (wolne grupy hydroksylowe w pozycji C-3' i C-4'), charakterystycznego dla pochodnych kwercetyny, przy braku tego ugrupowania (pochodne kemferolu) w związkach 5, 6, 7, 8 (brak przesunięcia ww. zakresie).

Uzyskane w wyniku kwasowej hydrolizy całkowitej aglikony i cukry porównano chromatograficznie z substancjami wzorcowymi, potwierdzając, że agliko-

nem związków 1, 2, 3, 4 jest kwercetyna, a aglikonem związków 5, 6, 7, 8 jest kemferol. Obecność galaktozy stwierdzono w związku 1, glukozy w związkach 2, 5, 6, arabinozy i galaktozy w związku 3, ramnozy i glukozy w związkach 4, 8, a galaktozy i glukozy w związku 7. Brak związków wtórnych w związkach 1, 2, 5 świadczył, że są to monozydy. Pozostałe związki hydrolizowały do glikozydów wtórnych, które porównano chromatograficznie z odpowiednimi wzorcami, stwierdzając, że są to: 3-*O*-galaktozyd (w związku 3) i 3-*O*-glukozyd kwercetyny (w związku 4) oraz 3-*O*-glukozyd kemferolu (w związkach 6, 7, 8).

Wyizolowane i zidentyfikowane flawonoidy z liści oraz poszczególnych części owoców *Asclepias tuberosa* L. zestawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Związki flawonoidowe w liściach i owocach trojeści bulwiastej.

Flawonoidy (w nawiasach podano numery związków)	Liście	Owoce	
		Owocnia	Włoski nasienne
3- <i>O</i> -galaktozyd kwercetyny (1)	-	+	-
3- <i>O</i> -glukozyd kwercetyny (2)	+	-	-
3- <i>O</i> -arabinozylogalaktozyd kwercetyny (3)	-	+	-
3- <i>O</i> -ramnozyloglukozyd kwercetyny (rutynozyd kwercetyny) (4)	+	+	-
3- <i>O</i> -glukozyd kemferolu (5)	+	+	+
3- <i>O</i> -diglukozyd kemferolu (6)	-	+	+
3- <i>O</i> -galaktozyloglukozyd kemferolu (7)	-	+	+
3- <i>O</i> -ramnozyloglukozyd kemferolu (rutynozyd kemferolu) (8)	+	-	-

Wyniki analizy wolnych kwasów fenolowych przedstawiono w tabeli 2.

## Wnioski

1. W liściach, owocniach i włoskach nasiennych *Asclepias tuberosa* L. stwierdzono obecność związków flawonoidowych z grupy flawonoli, pochodnych kwercetyny (związki 1, 2, 3, 4) i kemferolu (związki 5, 6, 7, 8).
2. We włoskach nasiennych występują wyłącznie pochodne kemferolu.
3. Związkiem flawonoidowym występującym zarówno w liściach, owocniach, jak i włoskach nasiennych jest 3-*O*-glukozyd kemferolu.
4. Kwasami fenolowymi występującymi we wszystkich analizowanych częściach owocu, a także w liściach są: kwas *p*-hydroksybenzoesowy i kwas *p*-hydroksyfenylooctowy.

## Piśmiennictwo

1. Davis RH. Butterfly weed. Horticult 1993; 71 (7):8. 2. Wu ZY, Raven PH. Flora of China, Vol 16. *Gentianaceae* through *Boraginaceae*. Sci Press (Beijing), Miss Bot Garden (St Louis) 1995. 3. Barkley TM. Flora of the great plains by the Great Plains Flora Assoc. Univ Press, Lawrence, Kansas 1986; p. 614-7, 629. 4. Gilman EF. *Asclepias tuberosa*. Univ Florida 1999; 1-3. 5. Wyatt R. The reproductive biology of *Asclepias tuberosa*: I. Flower number, arrangement, and fruit-set. New Phytol 1980; 85:119-31. 6. Wyatt R. The reproductive biology of *Asclepias tuberosa*: II. Factors determining fruit-set. New Phytol 1981; 88:375-85. 7. Tucker K. Butterfly-weed (*Asclepias tuberosa*); Virginia Wildflower 1992. 8. Abe F, Yamauchi T. An androstane bioside and 3'-thiazolidinone derivatives of doubly-linked cardenolide glycosides from the roots of *Asclepias tuberosa*. Chem Pharm Bull 2000; 48:991-3. 9. Abe F, Yamauchi T. Pregnane glycosides from the roots of *Asclepias tuberosa*. Chem Pharm Bull 2000; 48:1017-22. 10. Neuwinger HD. African ethnobotany – poisons and drugs. Chemistry, pharmacology, toxicology. Chapman and Hall, Weinheim 1996. 231. 11. Haribal M, Renwick JAA. Identification and distribution of oviposition stimulants for monarch butterflies in host and nonhost. J Chem

**Tabela 2.** Kwasy fenolowe występujące w trojeści bulwiastej.

Kwas fenolowy	Liście	Owoce		
		owocnia	włoski nasienne	nasiona
Kwas <i>p</i> -hydroksybenzoesowy	+	+	+	+
Kwas <i>p</i> -hydroksyfenylooctowy	+	+	+	+
Kwas <i>cis p</i> -kumarowy	+	+	-	+
Kwas <i>trans p</i> -kumarowy	+	+	-	-
Kwas hydrokawowy	+	-	-	-
Kwas wanilinowy	-	+	+	-
Kwas <i>cis</i> ferulowy	-	+	+	-
Kwas <i>trans</i> ferulowy	-	+	+	-
Kwas izowanilinowy	-	+	+	-



- Ecol 1998; 24:891-904. **12.** Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer C i wsp. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *J Med Plant Res* 2008; 2:98-110. **13.** Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer C i wsp. Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin. *J Med Plant Res* 2008; 2:81-93. **14.** Ernst E. Herbal medicinal products during pregnancy: are they safe? *Int J Obstet Gynaecol* 2002; 109:227-35. **15.** Costello CH, Butler CL. The estrogenic and uterine-stimulating activity of *Asclepias tuberosa*. A preliminary investigation. *J Am Pharm Assoc* 1950; 39:233-7. **16.** LaGow B. PDR for herbal medicines. 3rd editon. Thomson PDR, Montvale 2004; 644-5. **17.** Charles D. Monograph: *Asclepias tuberosa*. *J Am Herb Guild* 2007; 7(2):13-20. **18.** Abascal K, Yarnell E. Herbal treatments for pandemic influenza. Learning from the Eclectics' Experience. *Altern Complement Ther* 2006; 12:214-21. **19.** Demarque D, Jouanny J, Poitevin B i wsp. Homeopatyczna materia medica. PZWL, Warszawa 2010; 83-4. **20.** Poppenga RH. Herbal medicine: potential for intoxication and interactions with conventional drugs. *Clin Techn Small Anim Pract* 2002;17(1):6-18. **21.** Stevens M. Butterfly milkweed – *Asclepias tuberosa* L. Plant Guide. Nat Plant Data Center. **22.** Everest JW, Powe TA, Freeman J. D. Poisonous plants of the Southeastern United States. **23.** Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York 1970. **24.** Sikorska M. Flavonoids on the leaves of *Asclepias incarnata* L. *Acta Pol Pharm* 2003; 60:471-5. **25.** Sikorska M, Matławska I. Kaempferol, isorhamnetin and their glycosides in the flowers of *Asclepias syriaca* L. *Acta Pol Pharm* 2001; 58:269-72. **26.** Sikorska M, Matławska I. Quercetin and its glycosides in the flower of *Asclepias syriaca* L. *Acta Pol Pharm* 2000;7(4):321-4. **27.** Sikorska M, Matławska I, Frański R. Kaempferol and its glycosides in the seeds hair of *Asclepias syriaca* L. *Acta Pol Pharm* 2001; 58:211-7. **28.** Sikorska M, Matławska I. Związki polifenolowe w liściach *Asclepias fascicularis* DCNE. *Herba Pol* 2007; 53:147-8.

otrzymano/received: 18.06.2011  
zaakceptowano/accepted: 15.07.2011

Adres/address:  
\*prof. dr hab. Irena Matławska  
Katedra i Zakład Farmakognozji  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego  
ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań  
tel.: (61) 854-67-01, fax: (61) 856-67-01  
e-mail: farmakognozja@ump.edu.pl