

INDAGINE SUL CONTENUTO DI COLCHICINA IN COLCHICUM AUTUMNALE L. DELL'ITALIA SETTENTRIONALE

Laura COASSINI LOKAR, Franca TOMÈ, Livio POLDINI, Maurizio PORRATI

Keywords: *Colchicum autumnale*, L., Liliaceae, Alkaloids, Colchicine.

Abstract

The colchicine content in *Colchicum autumnale* L. of North Italy.

The colchicine content of different parts (bulb, flower, leaves, seeds, capsules) of *C. autumnale* L. has been identified. The specimens were collected in North Italy, in stations with different altitudinal, climatic and vegetational conditions.

Colchicine is present in all the studied parts, with a concentration gradient going from a maximum in the seeds to a minimum in the bulbs.

The colchicine content in the bulbs varies according to the principal phases of the life-cycle (flowering, fruiting, budding), whereas in the seeds it depends from the degree of ripeness, being higher in the first stages.

On the basis of results, it is suggested to take into consideration also leaves and flowers for the extraction of the alkaloid.

Premessa

Le numerose ricerche condotte anche recentemente su diverse specie di *Colchicum*, al fine di determinare il contenuto e il tipo di alcaloidi presenti, ci hanno indotto a intraprendere un'indagine su *Colchicum autumnale* L., specie notevolmente diffusa nell'Italia settentrionale. È stata scelta tale specie quale oggetto di indagine, essendo *C. autumnale* L. la fonte europea più comune di colchicina, alcaloide a struttura tropolonica.

C. autumnale L. è specie appartenente al genere *Colchicum*, uno dei più difficili e meno noti dal punto di vista sistematico sino alla revisione citosistemica di F. D'Amato (1955, 1957a, 1957b). L'Autore ha inoltre precisato l'area di distribuzione geografica delle specie presenti in Italia, di cui *C. autumnale* L. è una specie diffusa solo nell'Italia settentrionale: Alpi, Prealpi, Pianura padana superiore e media a nord del Po, Appennino dalla Liguria alla Toscana.

Malgrado le accurate ricerche di D'Amato, il problema sistematico dà adito ancora a ulteriori approfondimenti.

Molte sono le notizie relative al contenuto di alcaloidi nelle varie parti di *C. autumnale* L. di località dell'Europa centro-orientale, in semi, in bulbi, in fiori e in foglie (Šantavý, 1954a, 1954b, 1954c; Niemann, 1933; Šantavý e Buchniček, 1949; Gašič et al., 1976; Potešilová et al., 1967; Malichova et al., 1979). Oltre alla

colchicina sono state isolate dal *Colchicum* numerose altre sostanze, di struttura simile a quella della colchicina, che sono state distinte in principi tropolonici e non tropolonici.

La distribuzione istochimica della colchicina nei tessuti di *C. autumnale* L. è stata studiata da Albo (1901), Liptak (1927), Klein e Pollauf (1929), e Grimme (1920). Secondo Liptak l'alcaloide è concentrato prevalentemente nell'endosperma e nel terzo strato del tegumento del seme, secondo Blau e Grimme nella cuticola.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di esaminare il contenuto di colchicina delle varie parti (bulbo, fiori, foglie, semi e cassule) di *C. autumnale* L. proveniente da popolamenti di località situate a diverse altitudini e con caratteristiche climatico-vegetazionali diverse di Lombardia, Veneto e Friuli-Venezia Giulia, e la variabilità di tale alcaloide durante le varie fasi del ciclo biologico della pianta.

I campioni sono stati raccolti sia in ambienti che sono quelli di elezione del colchico (pascoli concimati ed irrigui, prati con terreno umifero) sia in ambienti meno propri, come i boschi radi e i pascoli sassosi.

TABELLA 1

Località	altitudine m/slm	caratteristiche ambientali
1. Feltre (Belluno)	200	prati da sfalcio
2. Follina (Treviso)	200	terreno fresco e umifero ai margini di boschi di castagni
3. Rupingrande (dolina nel Carso triestino)	300	fondo di dolina, terreno umifero a vegetazione subigrofila
4. Buia (Friuli)	300	querco-carpinetto rado
5. Canzo (Brianza)	400	prati da sfalcio ai margini di bosco
6. Monte Carso (Carso triestino)	400	terreno carsico, pineta di rimboschimento
7. Lasnigo (Brianza)	600	prato umifero
8. Monte Pianezze (Prealpi venete)	1000	pascolo sassoso da sfalcio
9. Pian dei Resinelli (Prealpi lombarde)	1200	resti di prato da sfalcio antropizzati
10. Fusine (Alpi Giulie)	1200	prato umifero da sfalcio

Tab. 1 — Località di prelievo dei campioni con le caratteristiche altitudinali e ambientali.

Parte sperimentale

Raccolta. I vari campioni di *C. autumnale* L. da analizzare sono stati raccolti in maniera statisticamente significativa e notevolmente rappresentativa nell'ambito di ogni popolazione, nelle varie fasi del ciclo biologico della pianta nel periodo tra il 1977 e il 1979 in diverse località dell'Italia settentrionale. Nella Tab. 1 sono indicate le caratteristiche altitudinali e ambientali di ogni stazione. Le piante sono state sempre asportate in toto, ripulite accuratamente, separate nelle loro varie parti, ognuna delle quali è stata sottoposta all'analisi. Le analisi sono state quindi effettuate sempre su materiale fresco. Le dimensioni delle piante erano pressocchè costanti per tutte le località; il peso medio dei bulbi si aggirava sui 10-15 g, le foglie presentavano una grandezza variabile da 3×16 cm a 5×25 cm. Soltanto i campioni provenienti dalla località 3 (Carso triestino) erano nettamente più grandi, sia come dimensione delle foglie (6-7×30 cm), sia come peso del bulbo (30-100 g).

Estrazione. Di ogni campionamento sono stati utilizzati 10 esemplari, in modo che i dati analitici potessero essere riferiti ad un campione medio e non fossero espressione di caratteristiche individuali. Delle varie parti da analizzare sono stati prelevati 3 g per bulbi, foglie, tubi corollini e cassule e 1.5 g di semi e lembi fiorali. Su campioni a parte è stato determinato il peso secco a 110°C, al quale sono state riferite le determinazioni quantitative.

Il materiale vegetale omogeneizzato è stato estratto con una miscela idroalcolica nel rapporto 1:10 (W/V) (100 ml metanolo + 20 ml acqua + 1 ml acido acetico) per 4 ore sotto continua agitazione a 4°C e al buio. Dopo centrifugazione (15 min a 0°C con 10.000 giri/min) il sedimento è stato riestratto con le medesime modalità per altre 3 volte. I supernatanti riuniti quantitativamente sono stati trattati goccia a goccia con NH₄OH concentrato. Il precipitato raccolto per centrifugazione, lavato con NH₄OH all'1% è stato disciolto con metanolo assoluto e portato a 10 ml (Harborne, 1973). Il procedimento utilizzato consentiva un'estrazione totale degli alcaloidi presenti.

La separazione dei vari costituenti estratti è stata effettuata con cromatografia preparativa su strato sottile di silica gel (GF 254, spessore 2.5 mm) con la miscela eluente metanolo: NH₄OH conc. = 100:1.5 v/v) per 30 min a 21°C, applicando, sotto forma di striscia continua, 20-40 μ l di ogni estratto e 10 μ l di una soluzione metanolica allo 0.1% di colchicina pura.

La colchicina presentava un'unica banda con Rf identico a quello del campione puro (Rf = 0.75) e veniva evidenziata con il reattivo molidato ammonico + acido solforico.

La colchicina separata su strato sottile ed evidenziata in luce UV ($\lambda = 254$ nm) è stata quantitativamente asportata in un tubo da centrifuga, trattata con 4 ml di acqua bidistillata, agitata energicamente per 5 min, centrifugata a 10.000 giri/min per 15 min a 0°C. Il supernatante è stato sottoposto all'analisi spettrofotometrica, rispetto ad un bianco. Dal valore dell'assorbimento si è risaliti, mediante le rette di regressione teoriche (interpolate col metodo dei minimi quadrati), alla quantità di colchicina presente nell'estratto di ogni campione. I dati di ogni analisi si riferiscono ad una media di 5 determinazioni. Le rette di regressione (passanti per lo zero, con coefficiente angolare $\lg \epsilon = 5.086$) sono state ottenute per un intervallo di concentrazione 1.25×10^{-3} mg/l ÷ 6.50×10^{-3} mg/l a $\lambda = 245$ nm in acqua bidistillata.

Discussione dei risultati

Il contenuto di colchicina è stato determinato in tutte le parti delle piante raccolte nelle diverse fasi del ciclo biologico alle diverse altitudini.

Le fasi del ciclo biologico considerate sono state l'emissione fogliare (marzo-aprile), la fruttificazione (maggio-luglio) e la fioritura (settembre). I semi e le cassule, private dei semi, sono stati esaminati durante tutto il periodo della loro maturazione con frequenza quindicinale, nei campioni relativi alla stazione 3 (Carso triestino).

Dalle analisi eseguite è risultato che:

- il contenuto di colchicina nei bulbi varia nelle diverse fasi del ciclo biologico in funzione dell'altitudine: durante la fioritura è massimo a 600 m e minimo a 1000-1200 m; nel periodo dell'emissione fogliare è minimo a 600 m e massimo a 1200 m. Durante la fruttificazione il contenuto di colchicina è praticamente costante alle varie altitudini. Alle basse quote la variazione del contenuto di colchicina alle varie fasi del ciclo biologico è molto meno accentuata (fig. 1).
Con l'aumentare dell'altitudine si osserva quindi uno spostamento del tempo balsamico dal periodo dell'antesi al periodo dell'emissione fogliare.
- il contenuto in principio attivo nelle foglie non sembra influenzato dal fattore altitudinale. In relazione al ciclo biologico è invece più alto nel primo periodo dell'emissione fogliare (fig. 2). Questo risultato è confortato da analoghe osservazioni riportate da Cromwell B.T. (1955).
- nei lembi fiorali il tenore di colchicina non dipende dall'altitudine sino alla quota di 1000 m; a quote superiori subisce una netta diminuzione. Nei tubi corollini il contenuto è sempre più basso che nei lembi fiorali sino all'altitudine di 1000 m, oltre alla quale è più alto (fig. 3).
- in semi e in cassule il contenuto di alcaloide varia durante il corso della

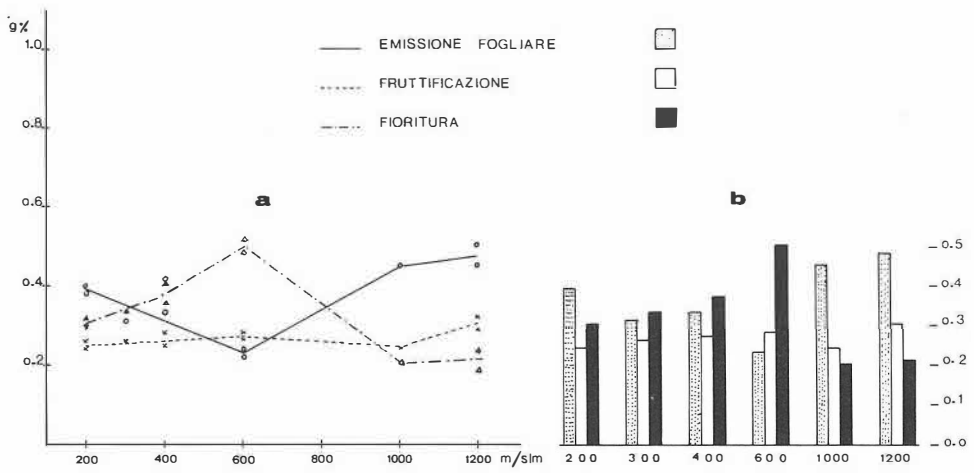


fig. 1 — Variazione del contenuto di colchicina (g% rispetto al peso secco) in bulbi di *C. autumnale* L. in funzione dell'altitudine e di alcune fasi del ciclo biologico (emissione fogliare, fruttificazione, fioritura).

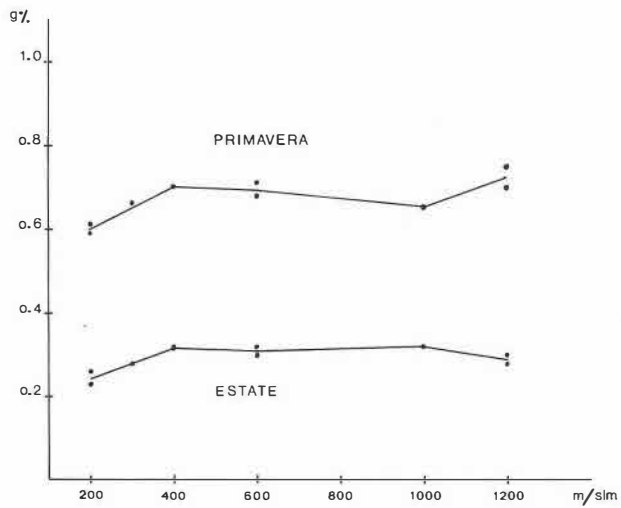


fig. 2 — Variazioni del contenuto di colchicina (g% rispetto al peso secco) in foglie di *C. autumnale* L. in funzione dell'altitudine e in due momenti del loro sviluppo.

maturazione (fig. 4), ed era massimo in uno stadio di maturazione molto precoce; col procedere della maturazione tale contenuto diminuisce molto sensibilmente sino a raggiungere dopo un mese un valore pari alla metà. Nei quindici giorni successivi il contenuto aumenta leggermente e resta quindi costante sino al momento della deiscenza della cassula. Nelle cassule il contenuto è di circa metà di quello dei semi e la sua variazione con la maturazione ha un andamento del tutto analogo a quello dei semi. I valori da noi riscontrati per i semi sono i più alti sia rispetto alle altre parti della pianta sia rispetto ai dati riportati in letteratura (Šantavý, Talaš, 1954a; Šantavý, 1949; Gašič et al., 1976), in cui si ha già qualche notizia del variare del contenuto di colchicina nei semi in funzione dello stadio di maturazione (Buchničěk J., 1950).

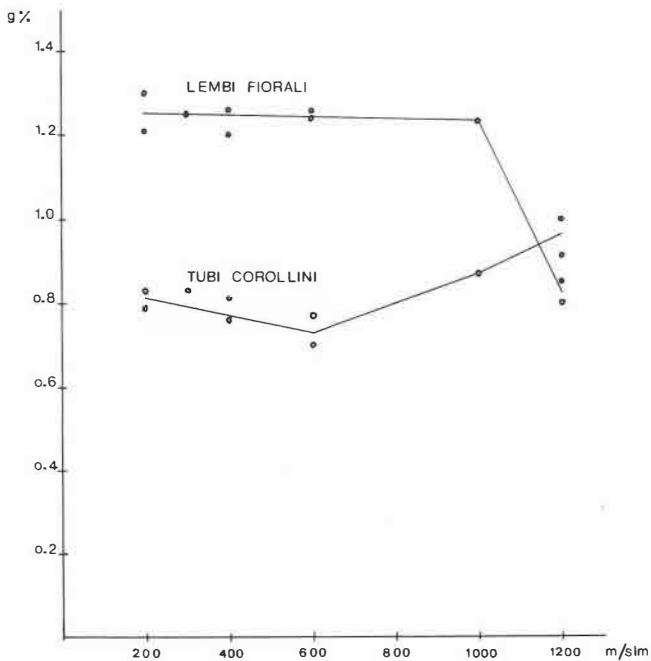


fig. 3 -- Variazioni del contenuto di colchicina (g% rispetto al peso secco) in lembi fiorali e tubi corollini di *C. autumnale* L. in funzione dell'altitudine.

Dall'insieme dei risultati ottenuti si è potuto notare come per tutti i campioni esaminati, indipendentemente dall'altitudine, la colchicina si distribuisce nei vari organi della pianta secondo un gradiente di concentrazione, che cresce a partire dai bulbi, nelle foglie, nel tubo corollino, nel lembo florale e nei semi (fig. 5).

Le analisi effettuate hanno inoltre messo in risalto che i campioni della stazione 3 (Dolina nel Carso triestino), pur trovandosi ad un'altitudine modesta (circa 300

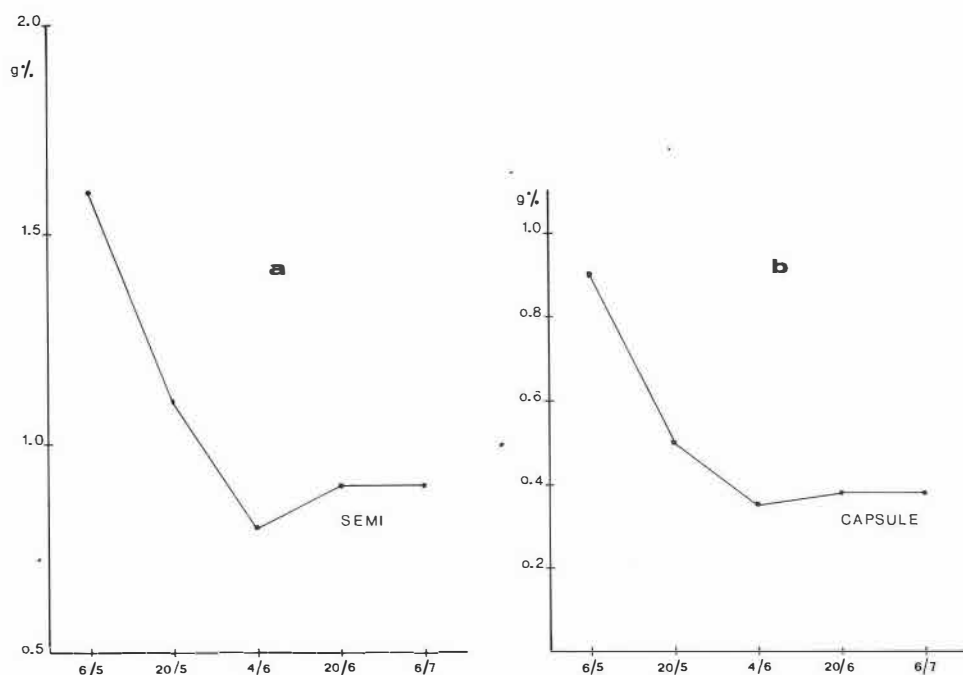


fig. 4 - Variazione del contenuto di colchicina (g% rispetto al peso secco) in semi e cassule di *C. autumnale* L. in funzione della maturazione.

m), hanno un comportamento che corrisponde a quello degli esemplari provenienti da quote maggiori (600 m) (Tab. 2), costituendo pertanto un'ulteriore conferma che l'ambiente dolinare è sede di singolari inversioni climatico-vegetazionali. Nell'interpretazione dei dati sperimentali abbiamo pertanto considerato questa località come una stazione situata attorno ai 600 m.

TABELLA 2

Località	altitudine m/slm	colchicina g% in bulbi (rispetto peso secco)		
		en. fogliare	fruttificaz.	fioritura
Follina	200	0.40	0.24	0.31
Feltre	200	0.38	0.26	0.30
Buia	300	0.31	0.26	0.33
Dolina (Carso triest.)	300	0.24	0.28	0.51
Iasnigo	600	0.22	0.27	0.48
Pianezze	1000	0.45	0.24	0.20
Resinelli	1200	0.50	0.32	0.23
Fusine	1200	0.48	0.30	0.18

Tab. 2 - Raffronto tra i dati percentuali di colchicina in bulbi di *C. autumnale* L. di campioni provenienti da stazioni ad altitudini diverse.

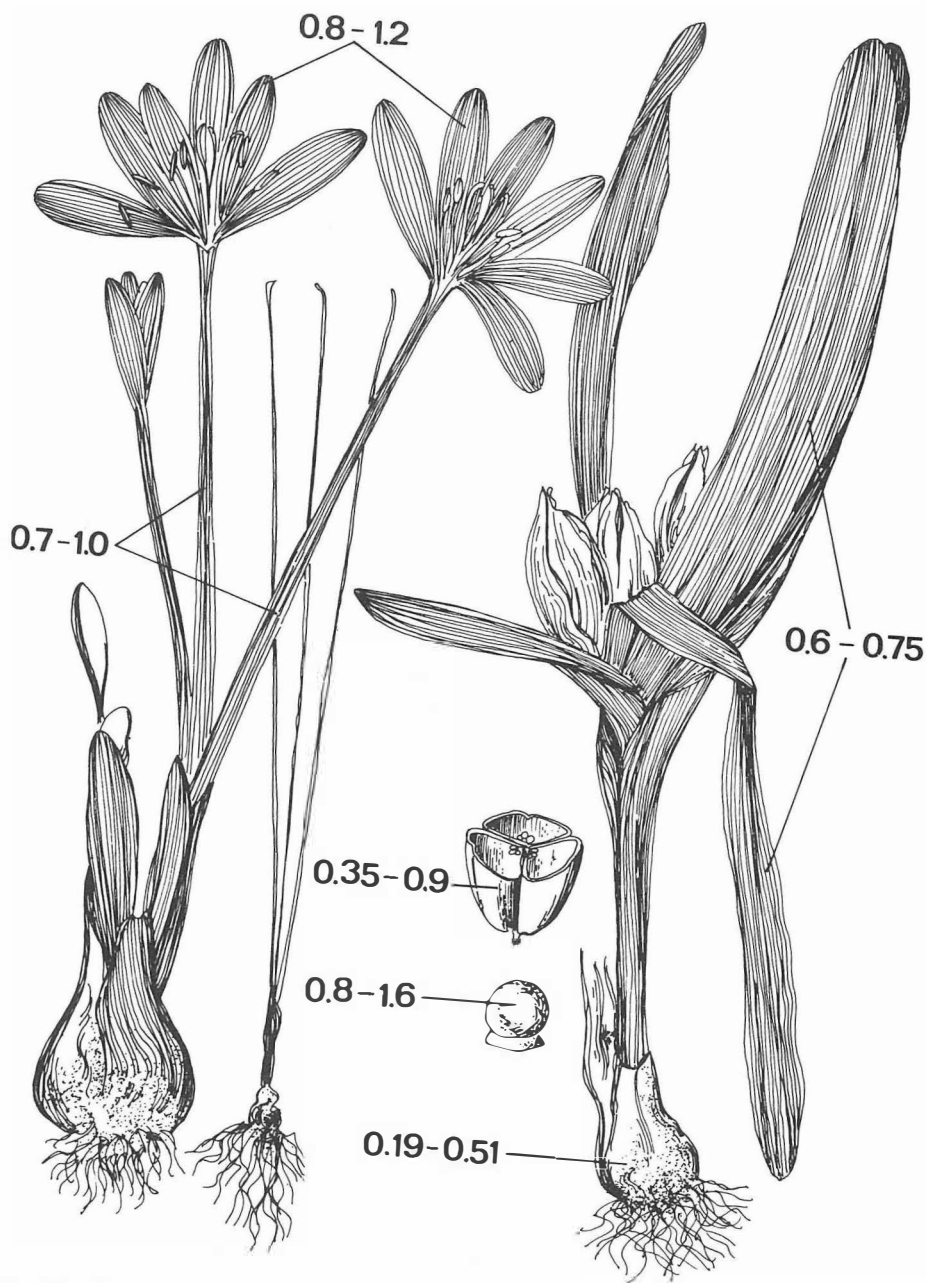


fig. 5 - Gradiente di distribuzione della colchicina nei vari organi di *C. autumnale* L. dell'Italia settentrionale. Sono indicati i valori minimo e massimo ottenuti, indipendentemente dalle località di raccolta e dalle fasi del ciclo biologico.

Conclusioni

Gli esperimenti condotti su *Colchicum autumnale* L. di numerose stazioni dell'Italia settentrionale hanno messo in rilievo che il contenuto massimo di colchicina riscontrato nei bulbi (0.51 g% rispetto al peso secco), nelle foglie (0.75 g%), in lembi fiorali (1.20 g%), nei tubi corollini (1.0 g%), nelle cassule (0.9 g%) e nei semi (1.6 g%) è tra i più alti finora riscontrati in *C. autumnale* L. di altra provenienza (Gašič, 1976; Niemann 1933; Buchniček, 1955; Chemnitius, 1952; Šantavý et al., 1954a, 1954b, 1954c; Malichová, 1979).

Il fattore altitudinale sembra avere una certa influenza sul metabolismo dell'alcaloide nei bulbi, in determinati momenti del ciclo biologico; nelle foglie invece non si notano differenze significative del contenuto di colchicina nei campioni raccolti ad altitudini diverse.

Vi è una certa attitudine della specie a sintetizzare maggiori quantità di principio attivo in bulbi in condizioni ambientali caratterizzate da terreni umiferi, meno esposti e localizzati a medie altitudini (600 m).

È risultato che la raccolta dei semi deve essere effettuata in uno stadio molto precoce di maturazione, perchè il contenuto in alcaloide diminuisce col procedere della maturazione stessa.

Benchè le parti comunemente usate come droga siano i semi e i bulbi, dai risultati da noi ottenuti appare che anche foglie e fiori possono essere utilizzati ai fini pratici, in quanto contengono quantità rilevanti di principio attivo.

Volendo sfruttare *C. autumnale* L. quale fonte di colchicina ai fini pratici, sarà bene tener presente che, subendo il principio attivo notevoli variazioni nel contenuto in funzione del ciclo biologico della pianta e talora anche dell'altitudine, sarà opportuno effettuare la raccolta delle parti maggiormente produttive nel periodo più idoneo, valutando attentamente anche le caratteristiche delle località di raccolta.

Nel caso si volesse procedere ad una coltivazione intensiva di *C. autumnale* L., risulterebbe da quanto detto che sarebbero da utilizzare terreni umiferi, concimati, profondi, a 600 m di altitudine (o in dolina), e, quali fonti estrattive, le foglie nel primo periodo di sviluppo e i semi e le cassule in un periodo di incipiente maturazione.

Riassunto

È stato determinato il contenuto di colchicina in varie parti (bulbo, fiori, foglie, semi, cassule) di piante di *Colchicum autumnale* L. raccolte in località dell'Italia settentrionale aventi caratteristiche altitudinali e climatico-vegetazionali diverse.

La colchicina è distribuita in tutti gli organi della pianta secondo un gradiente di concentrazione che è massimo nei semi e minimo nei bulbi. Nei bulbi il contenuto di colchicina varia nelle principali fasi del ciclo biologico (emissione fiorale, fruttificazione, emissione fogliare) e nei semi varia a secondo dello stato di maturazione, essendo più alto nei primi stadi.

Si suggerisce, in base ai risultati ottenuti, di considerare quali parti utili ai fini dell'estrazione dell'alcaloide anche foglie e fiori.

Bibliografia

- Alho, G. 1901. Sur la signification physiologique de la colchicine dans les differentes espèces de *Colchicum* et de *Merendera*. Arch. Sci. Phys. Nat., 12, 227-236.
- Buchniček, J. 1950. Colchicin in reifenden Herbstzeitlosensamen. Pharm. Acta Helv., 25, 389-401.
- Cromwell, B.T. 1955. The alkaloids, in *Methods Modern of Plant Analysis*. Ed. K. Peach & M.V. Tracey. Springer Verlag
- D'Amato, F. 1955. Revisione citosistemica del genere *Colchicum*. I. *C. autumnale* L., *C. lusitanum* Brot. e *C. neapolitanum* Ten. Caryologia, 7, 292-349.
- D'Amato, F. 1957. Revisione citosistemica del genere *Colchicum*. II. Nuove località di *C. autumnale* L., *C. lusitanum* Brot. e *C. neapolitanum* Ten. e determinazione dell'areale delle tre specie nella Penisola italiana. Caryologia, 9, 315-339.
- D'Amato, F. 1957. Revisione citosistemica del genere *Colchicum*. III. *C. alpinum* Lam. et DC., *C. cupanii* Guss., *C. bivonae* Guss. e chiave analitica per la determinazione delle specie di *Colchicum* della Flora Italiana. Caryologia, 10, 111-151.
- Grimme, C. 1920. The alkali and oil content of the seeds of the meadow saffron. Pharm. Zentralhalle, 61, 521-524.
- Gašič, O., Potešilová, H., Šantavý, F. 1976. Substanzen von Arten der Unterfamilie *Wurmbaeoideae* und ihre Derivate. LXXXI. Alkaloide aus *Colchicum autumnale* L. (Tara), *C. latifolium* S.S. und *C. macedonicum* Koš jugoslavischen Ursprungs. Planta Medica, 30, 75-81.
- Harborne, J.B. 1973. *Phytochemical Methods*. Ed. Chapman and Hall, London.
- Klein, G. Pollauf, G. 1929. Microchemical determination of alkaloids in plants. The detection of colchicine. Oesterr. Bot. Z., 78, 251-256.
- Liptak, P. 1927. Localization of alkaloids in the seed of *Colchicum autumnale* L. Pharm. Monatsch., 8, 125-126.
- Malichová, V. Potešilová, H. Preininger, V. Šantavý, F. 1979. Alkaloids from Leaves and Flowers of *Colchicum autumnale* L. Planta Medica, 36, 119-127.
- Niemann, E. 1933. Experiments on the use of flowers of *Colchicum autumnale* L. in place of semen *Colchici*. Pharm. Acta Helv., 8, 92-107.
- Potešilová, H., Hrbek, J. jr. Šantavý, F. 1967. Substanzen der Pflanzen der Unterfamilie *Wurmbaeoideae* und ihre Derivate. LXXV. Papier -- und Dünnsichtchromatographie der Alkaloide der Unterfamilie *Wurmbaeoideae*. Coll. Czechoslov. Chem. Comm., 32, 141-157.
- Šantavý, F. Buchniček, J. 1949. Sur la variabilité de la teneur en colchicine des semences de colchique (*Colchicum autumnale* L.). Pharm. Acta Helv., 24, 20-30.
- Šantavý, F. Tales, M. 1954a. Substanzen der Herbstzeitlose und ihre Derivate XXXIII. Isolierung weiterer Substanzen aus den Samen der Herbstzeitlose. Coll. Czechoslov. Chem. Comm., 19, 141-153.
- Šantavý, F. Hosalkova, Z. Podivinsky, R. Potešilová, H. 1954b. Substanzen der Herbstzeitlose und ihre Derivate XXXVIII. Isolierung weiterer Substanzen aus den Knollen. Coll. Czech. Chem. Comm., 19, 1289-1301.
- Šantavý, F. Mačák, V. 1954c. Substanzen der Herbstzeitlose und ihre Derivate. XXXIV. Isolierung weiterer Substanzen aus den Blüten der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale* L.). Coll. Czech. Chem. Comm., 19, 805-810.
- Venturi, V.M. 1950. The colchicine content and toxicity of *Colchicum* seeds and corms collected at different heights. J. Pharm. and Pharmacol., 2, 17-19.

Accettato il 20.2.1980

Indirizzo degli Autori: Istituto
di Botanica dell'Università di
Trieste e Istituto di Scienze
Botaniche dell'Università di
Milano.