

Die toksisiteit van *Gladiolus dalenii* van Geel

S. van Dyk*, L.M. Gerritsma-Van der Vijver en D.G. van der Nest

Departement Farmaseutiese Chemie en Proefdiersentrum, Potchefstroomse Universiteit vir CHO, Potchefstroom, 2520

Ontvang 8 Julie 1994, aanvaar 2 September 1994

UITTREKSEL

Die biologiese aktiwiteit van *Gladiolus dalenii* van Geel (Iridaceae) knolle (etnomedies gebruik) en blare is in 'n aantal sisteme geëvalueer. 'n Profiel van die akute toksisiteit in rotte is saamgestel en bevindings is dat sowel knolle as blare sitotoksiese verbindings wat mitoties aktiewe weefsel aantast, bevat. Akute sterftes is die gevolg van kongestiewe hartversaking. 'n Fraksie (gekodeer as GD1) geïsoleer uit knolle toon kwalitatief dieselfde toksisiteit as knolle en blare. Die beraamde gebied vir minimum letale dosisse (MLD), uitgedruk as mg/kg-liggaamsmassa, wissel van 10-31 intraperitoneaal (i.p.) en 3 160-5 620 oraal (p.o.) vir knolle, 100-316 (i.p.) en >1 780 (p.o.) vir blare en 1-3 (i.p.) en >1 000 (p.o.) vir fraksie GD1. Heel plantmateriaal het geen aktiwiteit teen 'n reeks mikro-organismes getoon nie. Fraksie GD1 was aktief teen *Candida albicans*. Fototoksisiteit kon nie aangetoon word nie.

ABSTRACT

The toxicity of Gladiolus dalenii van Geel

The biological activity of *Gladiolus dalenii* van Geel (Iridaceae) corms (used in ethnomedicine) and leaves were evaluated in a few systems. A profile of acute toxicity in rats was compiled and it was found that both corms and leaves contained cytotoxic substances affecting mitotic active tissue. Acute deaths resulted from congestive heart failure. The toxicity of a fraction (coded as GD1) isolated from corms was qualitatively similar to that of corms and leaves. Estimated minimum lethal doses, given in mg/kg body weight, lie in the range 10-31 (i.p.) and 3 160 - 5 620 (p.o.) for corms, 100-316 (i.p.) and >1 780 (p.o.) for leaves and 1-3 (i.p.) and >1 000 (p.o.) for fraction GD1. Intact plant material showed no activity against a series of microbes. Fraction GD1 was active against *Candida albicans*. Phototoxicity was not detected.

INLEIDING

Gladiolus dalenii van Geel (Iridaceae) is ondersoek as deel van die evaluering van die flora van Suid-Afrika met betrekking tot biologiese aktiwiteit en samestelling van sekondêre metaboliete. Baie inheemse plante word etnomedies aangewend, hoewel sommige toksiese reaksies en selfs die dood kan veroorsaak.^{1,2} Wetenskaplike inligting in die verband is egter baie beperk en gevalle waar *G. dalenii* by dood geïmpliseer word, kon nie opgespoor word nie.

G. dalenii is 'n inheemse bolplant wat voorkom in die Transvaal, Oranje-Vrystaat, Swaziland, Natal, Lesotho, en die Oos-Kaap.³ Sinonieme vir die plant is *G. cooperi* Bak, *G. dracocephalus* Hook. f., *G. natalensis* (Eckl.) Hook. f., *G. pageae* L. Bol. en *G. psittacinus* Hook.⁴ *G. dalenii* staan in die volksmond bekend as "Natal lily", papegaaielie, of swaardlelie,⁵ en as khahla-ee-kholo in Sotho.⁶ *G. dalenii* groei ongeveer 90 cm hoog met 5-12, meesal gladde, liniêre blare met verdikte are. Blomme, tot 50 mm lank, in kleurkombinasies van groen, bruin, oranje, geel en rooi of eenkleurig oranje, geel of rooi word voortgebring aan 'n aar vanaf September tot April. Die vrugte is silindriese kapsules en die sade is ovaal tot rond en gevlerk. Ondergronds het die plant 'n gerokte knol bedek met sagte bruin vesels.^{3,6}

G. dalenii en ander *Gladiolus* spesies inheems aan Suid-Afrika word oraal en as enemas deur die Sotho's en Zoeloes toegedien teen kwale soos buikloop, verkoue en dismenoree.^{7,8}

Hierdie ondersoek behels die vergelyking van ver-

skillende plantdele van 'n spesie met betrekking tot primêre biologiese aktiwiteit. 'n Aantal toetsstelsels is gebruik in die aanvanklike biologiese toetse. In gevalle waar merkbare aktiwiteit voorgekom het, is 'n ondersoek na die metabolietsamestelling ook gedoen om 'n korrelasie te vind tussen biologiese aktiwiteit en 'n spesifieke chemiese verbinding. *G. dalenii* knolle en blare is ondersoek vir antimikrobiese aktiwiteit, fototoksisiteit en akute toksisiteit in rotte. Die profiel van akute toksisiteit sluit in die beraming van 'n minimum letale dosis (MLD), voorkoms van sterftes, notering van tekens van akute toksisiteit en die makroskopiese en histologiese beskrywing van nadoodse letsels.

Versameling van plantmateriaal

Knolle en blare versamel na die blomseisoen, is gevries met vloeibare stikstof (-187 °C) en in 'n vrieskas (-25 °C) bewaar tot met gebruik.

Akute toksisiteit

Die metode van Malone & Robichaud⁹ is gebruik vir die evaluering en notering van tekens van akute toksisiteit in rotte. Veranderinge aan die metode was die insluiting van orale doserings, die gebruik van meer rotte per dosis en histologiese ondersoeke op toets- en kontrolediere. Die resultate van die eksperiment is nie gebruik om 'n voorspelling van moontlike farmakologiese aktiwiteit te maak nie. Manlike Sprague Dawley-rotte (spesifiek patogeen vry) 5-6 weke oud van 100-150 g is gebruik. Groepe van ses rotte is in standaardhokke gehuisves.

* Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

Teling van die rotte en eksperimente is in dieselfde gekontroleerde omgewing uitgevoer om die invloed van uitwendige faktore op toetsresultate te minimaliseer. Makroskopiese en histologiese nadoodse ondersoek is op alle diere wat gedurende die toetsperiode (7 dae) gesterf het, uitgevoer. Oorlewende diere is met 'n barbituraat oordoseer en is ook ondersoek. Gehomogeniseerde plantmateriaal is as suspensies in 0,25% agar toegedien, met 'n maksimum dosisvolume van 1 ml/rot. Ses rotte per dosis vir elk van die volgende dosisse is gebruik: Knolle; intraperitoneaal - 10, 31 en 56 mg/kg; oraal - 3 160 en 5 620 mg/kg en blare; intraperitoneaal - 100, 316 en 560 mg/kg; oraal - 1 000 en 1 780 mg/kg. Die veselagtige aard van die blare het die maksimum dosis tot 1 780 mg/kg beperk. 'n Fraksie gekodeer as GD1 geïsoleer uit *G. dalenii* knolle is ook toegedien. Fraksie GD1 is wateroplosbaar en is as 'n oplossing toegedien as dosisse van 1,0; 3,1 en 5,6 mg/kg intraperitoneaal en 1 000 mg/kg oraal. In hierdie geval is 8 rotte per dosis gebruik.

Antimikrobiële aktiwiteit

Die direkte agarplaatmetode¹⁰ is gebruik. Gram (+) bakterieë (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* en *Micrococcus luteus*), Gram (-) bakterieë (*Escherichia coli* en *Enterobacter cloacae*), swamme (*Penicillium sp.* en *Aspergillus sp.*) en 'n gis (*Candida albicans*) is gebruik.

Fototoksiteit

Candida albicans is as toetsorganisme gebruik.¹¹

Hemolitiese aktiwiteit

Die metode van die European Pharmacopoeia¹² is gebruik met **Saponinum purum album** (E. Merck Darmstadt) as standaard. Minimum hemolitiese konsentrasies (mg/ml) is genoteer.

Primêre chemiese toetse

Kleurtoetse vir triterpene/steroïede, saponiene, hartglikosiede, hidrosikinone en flavonoïede¹³ tanniene, alkalioïede, aminosure, sianogene verbindings, saggariëde en kalsiumoksalaatkristalle¹⁴ en antosianiene¹⁵ is uitgevoer op knolle, blare en fraksie GD1.

Isolering van fraksie GD1

937 g *G. dalenii* knolle is gehomogeniseer met 5 l etanol en vir 24 uur by kamertemperatuur gemassereer. 'n Helder geel etanolekstrak is verkry nadat die plantmateriaal afgesigter is. Die ekstrak is onder vakuum drooggedamp met 'n roteerverdamper om 'n produk met massa 104,65 g te lewer. Hierdie sterk geel gekleurde droë ekstrak is verpoeier, met 1 l aseton gewas en opgelos in 1 l metanol-watmengsel (4:1). 'n Wit amorfe presipitaat gekodeer GD1 met 'n massa van 2,74 g is verkry deur konsentrasie van die metanol-watroplossing onder vakuum met 'n roteerverdamper.

Dunlaagchromatografie

Stasionêre fase: silikajel; mobiele fase: butanol-asynsuur-water (4:1:5) bo-laag; sproeiareagens: anysaldied-swaelsuur.¹⁶

RESULTATE EN BESPREKING

Akute toksiteit

G. dalenii knol- en blaarsuspensies en fraksie GD1 oraal toegedien as 'n enkeldosis veroorsaak relatief min simptome van toksiteit. Indien intraperitoneaal toegedien, verhoog die toksiteit drasties (tabel 1). Die MLD-gebied vir intraperitoneale toedienings van knolle lê tussen 10 en 31 mg/kg wat daarop dui dat dit meer toksies is as die blare met 'n MLD-gebied tussen 100 en 316 mg/kg (tabel 1). Sterftes het dosisafhanklik voorgekom met 'n verlaging in dosis geassosieer met

TABEL 1 Sterftes en sterftye van proefdiere na verskillende doserings van <i>Gladiolus dalenii</i> materiaal				
Plantdeel	Toedieningsroete	Dosis mg/kg	*Getal sterftes	#Sterftyd (uur)
knolle	i.p.	10	geen	—
		31	2	24
56		3	24	
	p.o.	3 160	geen	—
		5 620	2	48-72
blare	i.p.	100	geen	—
		316	3	48-144
		560	5	7-24
	p.o.	1 000	geen	—
1 780		geen	—	
Fraksie GD1	i.p.	1,0	geen	—
		3,1	6	24
		5,6	6	24
	p.o.	1 000	5	24-96

* Getal rotte wat sterf uit 'n toetsgroep van 6 per dosis vir knolle en blare en 8 vir fraksie GD1.

Die waarnemingsinterval vanaf die eerste tot die laaste genoteerde sterfte van die groep oor die toetstydperk (7 dae).

langer oorlewingstye (tabel 1). Kwalitatief toon knolle en blare dieselfde toksisiteit. 'n Onderzoek na die metabolietsamestelling van die knolle het gelei tot die isolering van fraksie GD1 met 'n toksisiteitsprofiel kwalitatief dieselfde as die van die knolle en blare, maar reeds letaal in 'n dosisgebied so laag as 1-3 mg/kg liggaamsmassa (i.p.).

Tekens van akute toksisiteit wat by letale dosisse waargeneem is, was hoofsaaklik geassosieer met skok en algemene ongesteldheid (verlaging in spontane motoriese aktiwiteit, verlaging in respirasietempo, verlaging in rektale temperatuur en pilomotoriese ereksie). Hierdie simptome verskyn ongeveer 1-4 ure na dosering.

Histologiese nadoodse ondersoeke toon letsels wat veroorsaak word deur sitotoksiese verbindings aan. Die effek van hierdie verbindings is veral in mitoties aktiewe weefsel soos die lewer, limfoïede weefsel, dermkanaal en testis (tabel 2). Hierdie letsels word by letale en subletale dosisse gevind vir i.p. en p.o. toedienings. Die letsels word mikroskopies en makroskopies aangetoon by rotte wat reeds binne 6 uur na toediening sterf, die wat later sterf en ook by die wat met subletale dosisse gedoseer is en genadedood ontvang het. Indien die aard van die letsels in ag geneem word, kan dit verwag word dat die beenmurg ook aangetas sal wees. Kongestiewe hartversaking is waarskynlik die hooforsaak van dood. Dit mag sekondêr tot die miokardiale degenerasie en nekrose wees en/of kan die resultaat van hiperkalemie as gevolg van die vrystelling van groot hoeveelhede kalium uit nekrotiese areas wees. Letsels geassosieer met hartversaking soos pulmonêre edeem en kongestie, hidrotoraks, hidroperitoneum, kongestie van die durale sinusse, subkutane kongestie en palmare, plantare en skrotale sianose het voorgekom. Die voorkoms van midsonale nekrose as lewerletsel (tabel 2) is baie laag en in kombinasie met letsels in die limfoïede weefsel kan dit gebruik word om vergiftiging met *G. dalenii* te karakteriseer.

Antimikrobiële aktiwiteit en fototoksisiteit

Onverwerkte knolle en blare het geen antimikrobiële aktiwiteit of fototoksisiteit getoon nie. Fraksie GD1 is aktief teen *Candida albicans*.

Metabolietsamestelling

Primêre chemiese ondersoeke toon aan dat die knolle en blare van *G. dalenii* triterpene/steroïede, saponiene, fenole, flavonoïede, aminosure, saggariëde en kalsium-oksalaatkristalle bevat met stysel wat slegs in knolle voorkom. Knolle en blare stem kwalitatief ooreen, met hemolitiese saponiene as hoofkomponente. Fraksie GD1 gee ook die karakteristieke reaksies vir saponiene. Minimum konsentrasies wat hemolise veroorsaak vir knolle was 0,68 mg/ml, vir blare 4,08 mg/ml en vir fraksie GD1 0,04 mg/ml. Dunlaag-chromatografie van fraksie GD1 toon drie verbindings wat ook in knolle aanwesig is aan. Slegs een van die verbindings is in blare aanwesig wat kan verklaar waarom knolle relatief meer toksies as blare is.

GEVOLGTREKKING

Hierdie ondersoek het waardevolle inligting oor *G. dalenii* toksisiteit in soogdiere opgelewer. Saponiene is waarskynlik verantwoordelik vir die toksisiteit van hierdie plant. Sommige saponiene is toksies vir aktief verdelende selle soos neoplasmas^{17,18} en 'n aantal veroorsaak hemolise soos wat met die *in vitro*-metode aangetoon is. Daar was egter geen indikasie dat hemolise *in vivo* plaasgevind het nie aangesien letsels geassosieer met hemolise nie teenwoordig was nie.

Toksisiteitsdata wat met laboratoriumdiere verkry is, kan nie direk na die mens geëkstrapoleer word nie. 'n Enkele orale dosering van knolle of blare van *Gladiolus dalenii* hou waarskynlik nie 'n akute gesondheidsrisiko vir die mens in nie (hoë MLD-waardes, tabel 1). Die toksiese verbindings (saponiene?) word moontlik swak geabsorbeer uit die spysverteringskanaal en gehidroliseer. Ons is egter van mening dat dit in die lig van die eksperimentele resultate gerade is om hierdie plantspesie met omsigtigheid in etnomedisyn te gebruik.

BEDANKINGS

Die outeurs bedank mnr. B. Ubbink, Kurator van die Botaniese Tuin van die Potchefstroomse Universiteit vir CHO, vir die verskaffing van die plantmateriaal en prof

TABEL 2 Nadoodse orgaanletsels gevind by alle rotte wat met <i>Gladiolus dalenii</i> materiaal en fraksie GD1 gedoseer is		
Orgaan	Makroskopiese letsels	Histologiese letsels
lewer	verkleurde areas van nekrose aksentuering van lobules	midsonale koagulatiewe nekrose hoofsaaklik in mitotiese areas
limfoïede weefsel	petegieë in timus	nekrose en atrofie
maagdermkanaal	gasgevol	nekrose van epiteel en lamina propria
testis	geen ooglopende letsels	staking van spermatogenese
hart	petegieë	akute fokale miokardiale degenerasie en nekrose
longe	edeem en kongestie	edeem en kongestie
niere	subkapsulêre petegieë	vervetting en beperkte tubulêre nekrose
brein	kongestie van durale sinusse	minimale verhoging van nekrotiese neurone

N.P.J. Kriek, veteriniere patoloog aan die Mediese Universiteit van Suid-Afrika (MEDUNSA), vir die histologiese evaluering.

SUMMARY

Gladiolus dalenii van Geel is a species of Iridaceae better known as Natal lily, "swaardlelie" or "papegaai-lelie", and has the Sotho name *khahla-ea-kholo*. Botanical synonyms for *G. dalenii* are *G. cooperi* Bak, *G. dracocephalus* Hook. f., *G. natalensis* (Eckl.) Hook. f., *G. pagae* L. Bol. and *G. psittacinus* Hook. This plant is indigenous to South Africa and can be found in many gardens owing to the beauty of its flowers. Ethnomedical uses include oral dosing with corms to combat dysentery.

In this study leaves and corms of *G. dalenii* were investigated to determine the biological activity in a few test systems and also the metabolite composition of the different plant parts. In order to compile a profile of acute toxicity that included the determination of minimum lethal dose (MLD), abnormal behaviour (Hippocratic evaluation) and post-mortem organ lesions (macroscopic and microscopic) were noted as signs of toxicity in rats after intraperitoneal (i.p.) and oral (p.o.) administration of plant suspensions. A primary test to determine bactericidal and fungicidal activity was performed with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* and *Candida albicans* as test organisms. Determination of phototoxicity was done using *Candida albicans* as a test organism. The presence of metabolites belonging to four major classes (polycyclic terpenoids, phenolic substances, substances containing nitrogen and carbohydrates) was determined by using primary chemical tests, thin-layer chromatography and microscopy.

It was established that leaves and corms of *G. dalenii* contain metabolites that cause toxic responses in rats. The corms seem to be the more toxic part of the plant. Estimated MLD's given in mg/kg of body weight lie in the range 10-31 (i.p.) and 3 160-5 620 (p.o.) for corms and 100-316 (i.p.) and >1 780 (p.o.) for leaves. Signs of acute toxicity observed in rats were mainly associated with shock and general malaise. Post-mortem evaluation showed lesions associated with cytotoxic substances. The lesions were most prominent in the liver (midsonal coagulative necrosis), lymphoid tissue (necrosis and atrophy), the alimentary canal (necrosis of epithelium and lamina propria) and the testis (cessation of spermatogenesis). Congestive heart failure was probably the main cause of death. Lesions noted that can be associated with cardiac failure were pulmonary oedema and congestion, hydrothorax, hydroperitoneum, congestion of dural sinuses, subcutanic congestion and palmar, plantar and scrotal cyanosis. This however may be secondary to myocardial degeneration and necrosis and/or the result of hyperkalemia owing to potassium release from necrotic tissue. Intoxication by *G. dalenii* can be characterised by lesions in the liver (midsonal

necrosis) in combination with lesions in lymphoid tissue. The metabolites responsible for toxicity seem to be saponins, as a highly toxic mixture (coded as GDI) of three of these compounds was isolated from an ethanolic extract of corms. The toxicity of fraction GDI is qualitatively similar to that of corms and leaves with MLD's in the range 1-3 mg/kg (i.p.) and >1 000 mg/kg (p.o.). It can further be concluded that these saponins contribute to the frothing characteristics and haemolytic properties of *G. dalenii*. Minimum concentrations causing haemolysis are 0,68 mg/ml for corms, 4,08 mg/ml for leaves and 0,04 mg/ml for fraction GDI. Phenolic substances, flavonoids, amino acids, sugars and calcium oxalate crystals were demonstrated in leaves and corms, while starch was present in corms only. The plant material showed no antibacterial, fungicidal or phototoxic activity.

Experimental data gathered with animals cannot be directly extrapolated to humans, and although a single oral dose of *G. dalenii* leaves or corms may not constitute a health risk we would like to caution people of the possible risk of using *G. dalenii* as an ethnomedicine.

LITERATUURVERWYSINGS

- Gordon, I. (1947). A case of fatal buphanine poisoning, *Clinical proceedings* (University of Cape Town) 6, 90-93.
- Gelfand, M. & Mitchell, C.S. (1952). Buphanine poisoning in man, *S.A. Tydskrif vir geneeskunde*, 26, 573-574.
- Fabian, A. & Germishuizen, G. (1982). *Transvaal wild flowers* (Macmillan, Johannesburg).
- Gibbs Russell, G.E., Reid, C., Van Rooy, J. & Smook, L. (1985). *List of species of Southern African plants 2nd ed. Memoirs of the botanical survey of South Africa no. 51* (Botanical Research Institute, Pretoria).
- Smith, C.A. (1966). *Common names for South African plants. Department of Agricultural Technical services. Botanical Research Institute, Botanical survey Memoir no. 35* (Government Printer, Pretoria).
- Fox, F.W. & Norwood Young, M.E. (1982). *Food from the veld* (Delta Books, Johannesburg).
- Watt, J.M. & Breyer-Brandwijk, M.G. (1961). *The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa* (E. & S. Livingstone, Edinburgh).
- Bryant, A.T. (1970). *Zulu medicine and medicine-men* (C. Struik, Capetown).
- Malone, M.H. & Robichaud, R.C. (1962). A hippocratic screen for pure and crude drug materials, *Lloydia*, 25, 320-332.
- Van der Vijver, L.M. & Lötter, A.P. (1971). The constituents in the roots of *Plumbago auriculata* Lam. and *Plumbago zeylanica* L. responsible for antibacterial activity, *Planta Medica*, 20, 8-13.
- Weimarck, G. & Nilsson, E. (1980). Phototoxicity in *Heracleum sphondylium*, *Planta Medica*, 38, 97-111.
- European Pharmacopoeia Vol. 2 (1971). (Maisonneuve S.A., Paris).
- Wichtl, M. (1971). *Die Pharmakognostisch-Chemische analyse* (Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt).
- Trease, G.E. & Evans, W.C. (1983). *Pharmacognosy* (Baillière Tindall, London).
- Harborne, J.B. (1984). *Phytochemical methods* (Chapman and Hall, London).
- Stahl, E. (1967). *Dünnschicht-Chromatographie* (Springer-Verlag, Berlin).
- Ravikumar, P.R., Hammesfahr, P. & Sih, C.J. (1979). Cytotoxic saponins from the chinese herbal drug Yunnan Bai Yao, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 900-903.
- Hiller, K. & Adler, C. (1982). Neue Ergebnisse über Triterpensaponine, *Die Pharmazie*, 37, 619-634.