

IZOLAREA SUBSTANȚELOR ACTIVE CU CARACTER ANTIFUNGIC DIN *PAEONIA SUFFRUTICOS* RESPECTIV *HEDERA HELIX*

A.F. CĂRĂBET

U.S.A.M.V.B. Timișoara

e-mail: nacatim@hotmail.com

The presence of antifungal active compounds in Paeonia suffruticosa and Hedera helix extracts was detected with TLC bio tests (HOMANS A.L. & FUCHS A., 1970 modified) and HPLC. So 25 µl of acetone extract (20 g FW in 100ml acetone 50%) from both plant species was applied on TLC aluminium plates (silica gel 60 F₂₅₄; thickness 0,2 mm; Merck, Darmstadt) and processed with an solvent mixture cu tertiary butylmethylester (TBME) isooctane (7:3, v/v). After solvent evaporation (cca. 3 h), the plates were covered with malt- agar medium 1% and than an inoculation with Cladosporium cucumerinum spores was done. The TLC plates was incubated for 4-5 days in wheat chamber at 25°C, the inhibition areas was visible due the black mycelia of Cladosporium cucumerinum.

Keywords: plant extracts, active compounds, TLC, HPLC.

Acțiunea antifungică a extractelor din *Paeonia suffruticosa* și *Hedera helix* este cunoscută de ceva timp [1,2,6]. În cercetări diverse a fost demonstrată reducerea intensității atacului patogenului *Phytophthora infestans* cu 100% la aplicarea celor două extracte în concentrație de 20% [3,5]. Acțiunea protectivă a celor două extracte este influențată de condițiile climatice în special umiditatea sub formă de precipitații, putând dura chiar timp de 2 săptămâni. Plecând de la acest fapt, în vederea izolării substanțelor active prezente în cele 2 extracte ar trebui stabilit un procedeu prin care să poată fi separate principiile active dar și cele secundare prezente în extracte. Astfel extractele brute au fost fracționate în vederea colectării principiilor active prezente [4]. Mai departe, printr-o extracție ulterioară cu acetat de etil, substanțele active au fost transferate în solvent, pentru ca mai apoi acestea să fie prelucrate și separate fiecare componentă prezentă în parte.

MATERIAL ȘI METODĂ

În vederea determinării și separării substanțelor active existente în cele două extracte din plante s-a utilizat supernatantul rezultat în urma extracțiilor realizate atât la cald cât și la rece (temperatura camerei).

Extracția la cald: 100 mg de material vegetal uscat și fin măcinat au fost omogenizate în 4 ml etanol 50% respectiv metanol, apoi timp de 90 minute incubat la 80°C. Extractul a fost centrifugat 10 minute la 10000 rpm, pentru înlăturarea particulelor nedizolvabile. Supernatantul a fost preluat și introdus în alt recipient și păstrat la 4°C până la utilizare.

Extracția la rece: 100 mg de material vegetal uscat și fin măcinat au fost omogenizate, în 4 ml etanol 50% respectiv metanol, pe perioada nopții pe un agitator la 250 rpm. Extractul a fost centrifugat apoi la 10000 rpm iar supernatantul a fost introdus în alt recipient și depozitat la 4°C până la utilizare.

Deoarece extracția la rece cu etanol a prezentat cele mai puternice semnale „peak” la HPLC preparativ, pentru îmbogățirea preparativă a fracțiunilor ,au fost utilizate extractele etanolice obținute la rece.

Măsurarea și fracționarea extractelor din *Paeonia suffruticosa* și *Hedera helix*:

În vederea separării fracțiunilor în care se regăsesc cele mai mari cantități de substanță activă în cele două extracte a fost utilizat un program elaborat și adaptat special și anume cel descris în cele ce urmează:

- Software : Galaxi Chromatography Data System, Version 1.7.4.5.

- Metodă: Alin Kaemph fracțiuni singulare. METH / Alin Hedera extract.METH.

- Detector UV-lungime dublă de undă (λ_1 : 225 nm, λ_2 : 254 nm)

- Eluent: soluție tampon apoasă NaH_2PO_4 (1mM, pH 3,0) (eluent A); Acetonitril (Eluent B)

- Coloană de extracție: Phenomenex Synergi 10 μ Hydro-RP, 250 x 15 mm, inclusiv precoloană.

- Rata de curgere a fazei mobile : 6 ml/min

- Durata măsurării: 37 min

La fiecare procesare a fost injectat câte 1 ml din extract. Pentru determinarea timpului de colectare toate fracțiunile unui extract primar au fost colectate singular, iar structura compușilor prezenți în acestea au fost analizate cu ajutorul HPLC/DAD și HPLC/MS.

Cu ajutorul „Frac Collector”(colectorul de fracțiuni) au fost colectate cantități mari de fracțiuni de asemenea și compușii conținuți de acestea, care au fost, apoi extrase și îmbogățite cu Etylacetat.

Probele astfel obținute au fost analizate la Merck/Waters HPLC, pentru a obține informații asupra compoziției existente.

Extracția fracțiunilor purificate

Fracțiunile au fost extrase după următorul procedeu:

- Fiecare fracțiune a fost purificată și diluată cu apă distilată până la un gradient al acetonitrilului de 5-6%.

- Se adaugă o spatulă de NaCl (cca. 20 g/l).

- Faza hidrofilă a fost de două ori omogenizată cu Etylacetat (etil acetat aprox 1/3 din volumul total).

- Faza organică a fost filtrată și purificată prin Sulfat de natriu.

- Fazele astfel obținute au fost concentrate la vaporizatorul rotativ la 40°C, până a mai rămas în recipient cca 2-3 ml (Etylacetatul fierbe la 40°C și la presiune de 150-170 mbar).

- Proba a fost introdusă cu pipeta Pasteur în recipiente de sticlă cu vârful ascuțit, restul de etylacetat a fost îndepărtat total cu azot.

- Concentratul a fost dizolvat cu un eluent ce putea fi acetonă sau etylacetat apoi depozitate la 40°C. la substanțe definite concentratul a stat la baza obținerii de soluții standard prin dizolvarea cu ACN.

- Măsurarea fracțiunilor astfel obținute s-a făcut cu Photodiode Array Detector 991.

Efectele acestor fracțiuni asupra dezvoltării miceliene a ciupercii *Pythophthora infestans* au fost determinate prin testul de difuzie în mediu agar.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Fracționarea extractului din *Paeonia suffruticosa* a dus la obținerea a șapte fracțiuni după cum urmează:

- Timp de retenție 22,54-24,00 min. În această fracțiune au fost identificate substanțele active *paeoniflorin* și cantități mici de *kaempherolglykosid*. Pe lângă substanțele menționate, în această fracțiune mai sunt prezente și alte substanțe active care însă nu au fost identificate.

- Timp de retenție 25,00-25,38 min. Componenta principală a acestei fracțiuni este *kaempherolglokoside*, dar au mai fost separate încă trei substanțe dar în cantități mai mici care nu au fost identificate. Printr-o altă fracționare a acestei fracțiuni cu ajutorul HPLC-preparativ, s-a reușit separarea *kaempherolglykoside* de celelalte substanțe obținându-se într-o formă pură. **Kaempherolglykoside nu a fost identificat până acum în extractele din *Paeonia suffruticosa*.**

- Timp de retenție 26,00-27,12 min. Fracțiune compusă din 3 substanțe, din care o substanță este cu mare probabilitate un izomer al *Kaempherolglykosidului*. Celelalte trei substanțe nu au fost identificate.

- Timp de retenție 27,36-28,12 min. Fracțiune în a cărei componență se regăsesc numai 2 substanțe ce nu au fost identificate.

- Timp de retenție 28,42-29,00 min. Și în această fracțiune a fost semnalată prezența a 2 substanțe ce nu au fost identificate.

- Timp de retenție 29,38-30,10 min. Compusă din 2 substanțe neidentificate.

- Timp de retenție 31,00-31,48 min. Fracțiune compusă din trei substanțe ce nu au fost analizate.

Substanțele prezente în fracțiunile 3-7 prezintă spectre de absorbție foarte asemănătoare, astfel se poate spune ca este vorba de aceeași substanță activă, care, de altfel este substituită sau izomerizată diferit.

Cu ajutorul DAD (diode array detector) și a spectrometrului de masă (MS) extractul, obținut din *Paeonia suffruticosa*, atât la 80°C cât și la temperatura camerei, a fost analizat în vederea detectării compușilor prezenți.

Astfel, în proba cu extractul obținut la temperatura camerei, au fost identificați doi compuși și anume *paeoniflorin* și *kaempherolglycoside* cu masă moleculară 481,7 respectiv 449,00, figura 1.

Fracționarea extractului din *Hedera helix* a dus la obținerea a 5 fracțiuni după cum urmează:

- Timp de retenție 4,30- 5,00 min. În această fracțiune a fost prezentă doar o substanță, care, datorită faptului că are un puternic caracter polar, a rămas în hidrofază, și nu a putut fi identificată.

- Timp de retenție 5,00-5,36 min. Fracțiunea 2 are culoare galbenă și conține două substanțe, care au rămas în faza hidro în momentul extracției. Nu au fost analizate în amănunt.

- Timp de retenție 19,49-20,15 min. Au fost prezente trei substanțe diferite dar cu spectre de absorbție asemănătoare. Nu au fost analizate.

– Timp de retenție 20,50-21,15 min. În această fracțiune a fost identificată o substanță care, în urma analizării cu cromatograful Merck/Waters HPLC, s-a dovedit a fi acid – *dikaffeylquinic*.

– Timp de retenție 23,24-24,24 min. A fost prezent ca și componentă principală *kaempferolglykoside*.

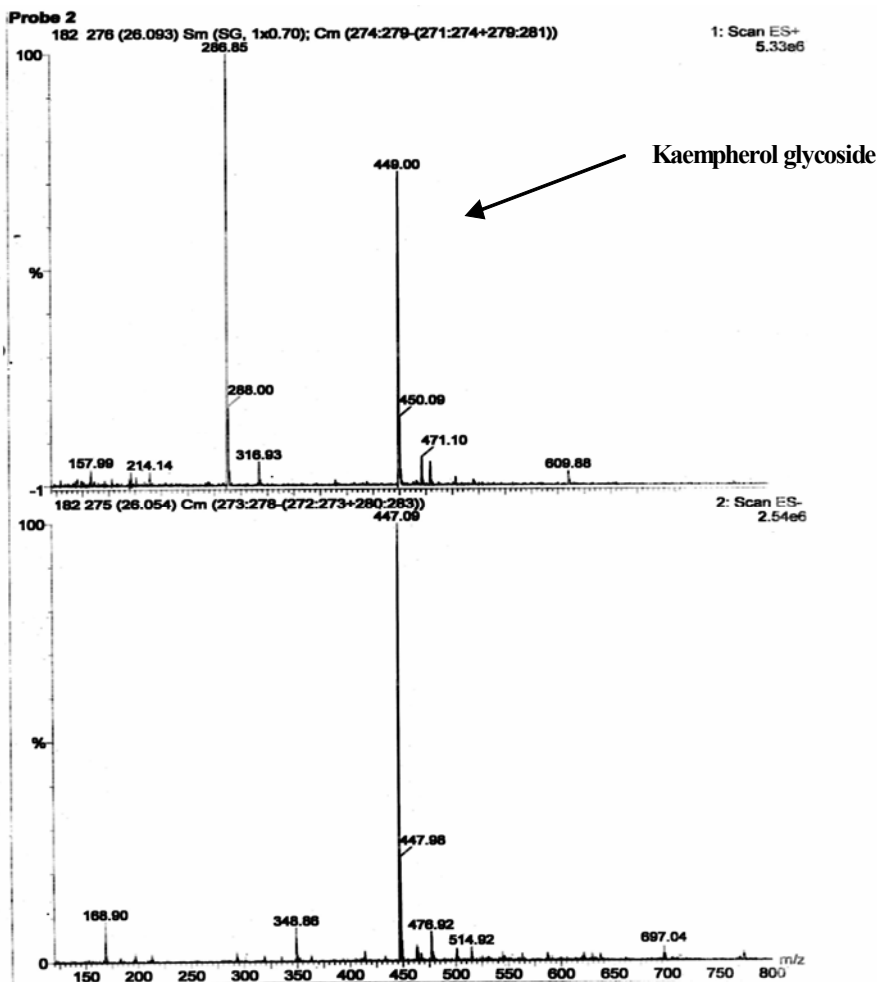


Fig.1 - Identificarea masei moleculare a *kaempferolglycoside* cu ajutorul spectrometrului de masă (MS). Extractul din *Paeonia suffruticosa*

Rezultatele obținute la testarea fracțiunilor, separate din extractul de *Paeonia suffruticosa*, la difuziunea în mediul agar sunt prezentate în figurile 2 și 3.

CONCLUZII

La analiza spectrelor substanțelor active prezente în cele 7 fracțiuni separate din extractul de *Paeonia suffruticosa*, rezultă că, sunt legături chimice

diferite și anume *kaempherolglycosid*, *paeoniflorin* și o substanță neidentificată (fracțiunile 3- 7). Prezența diferitelor semnale (peacks) la analizarea extractului, cu ajutorul HPLC – preparativ, a fost facilitată de substituiri și glicozidări diferite. Această afirmație este susținută și de faptul că, semnalele sau peackurile, sunt prezente din ce în ce mai rar la extractul prelucrat la cald. Prelucrarea extractului la cald produce scindarea structurilor complexe în molecule mai mici.

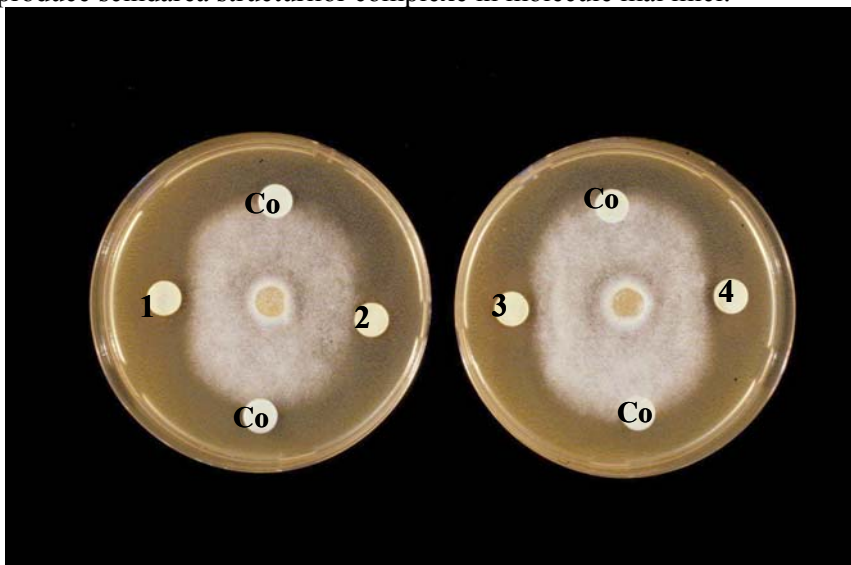


Figure 2. Frațiunile 1, 2, 3, 4, separate din extractul din *Paeonia suffruticosa*, testul de difuziune în mediu agar (*Phytophthora infestans*) (original)



Figure 3. Frațiunile 5, 6, 7, separate din extractul din *Paeonia suffruticosa*, testul de difuziune în mediu agar (*Phytophthora infestans*) (original)

La efectuare testului de difuziune în mediul agar, toate cele 7 fracțiuni au inhibat dezvoltarea miceliului patogenului *Phytophthora infestans*.

Fracțiunile separate din extractul de *Hedera helix*, la testul de difuziune în mediul agar, nu au inhibat dezvoltarea miceliană a patogenului. Se poate spune că, acțiunea protectivă a extractului din *Hedera helix* este efectul sinergic al diferitelor substanțe active prezente în extract

BIBLIOGRFIE

1. BENNER P.J., 1993. *Pesticidal compounds from Higher Plants*. *Pestic. Sci.* 39. p 95-102.
2. BLAESER P., STEINER U., DEHNE H.-W., 1998; *Fungizide Wirkstoffe aus Pflanzenextrakte*. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* 357 p 167.
3. CARABET A.F. Teza de doctorat, 2007.
4. FUKAMI H., NAKAJIMA M., 1971; *Naturally occurring pesticides* Ed. M. Jacobson&D.G. Crosby. Marcel Deckker Inc., New York.
5. LATTEN, J., 1994. *Biologische Bekämpfung pytopathogener Pilze mit Hilfe Von Pflanzextrakten*. Diss., Univ. Gießen.
6. RHOENER Evangelia, CARABET A.F., BUCHENAUER H., 2004. *Effectiveness of plant extracts of Paeonia suffruticosa and Hedera helix against diseases caused by Phytophthora infestans in tomato and Pseudoperonospora cubensis in cucumber*. *Journal of Plant diseases and Protection*, 111 (1), 83-95.