

Laboratorul de virologie (cond.: prof. Vincze Vendég), Catedra de histologie (cond.: prof. Mihály Gündösch, doctor în științe medicale) și Catedra de botanică (cond.: șef de lucrări Gábor Rácz, candidat în științe farmaceutice) ale I.M.F. din Tg.-Mureș

PREZENȚA UNOR SUBSTANȚE NOI, CU EFECT FLORIZINIC ÎN PAR (PYRUS COMMUNIS L.)

Vladimir *Blazsek*, György *Kemény*, Gábor *Rácz*

Intr-o comunicare anterioară (8) ne-am ocupat de efectul pe care îl au extractele din frunza și scoarța de păr. (*Pyrus communis*), de a provoca glicozurie. Efectul biologic al extractului ne-a îndreptățit să presupunem prezența unor substanțe florizininiforme, pe lângă substanțele de natură fenolică ce se cunosc pînă acum. Scopul cercetărilor noastre efectuate în continuare a fost acela

de a studia caracterul chimic al principiului activ. Lucrarea de față prezintă rezultatele obținute în cadrul acestor cercetări.

Descrierea experiențelor

Prepararea extractului. Principiile active le-am extras cu acetat etilic aplicând procedeul obișnuit (3), din probe vegetale fărâmișate. Am utilizat rezidul uscat al soluției de acetat etilic. Pentru separarea florizinei și a amestecurilor înrudite, cu ea, am găsit că dintre toți solvenții cunoscuți în literatură cel mai indicat e acidul acetic 2%. Am ridicat însă concentrația acidului acetic pînă la 15%, deoarece prin aceasta valorile R_f au devenit mai mari.

Reactivul. Am considerat că reactivii descriși în literatură nu sînt corespunzători, deoarece aceștia fiind reactivi fenolici generali (ca de ex.: acidul sulfamilic diazotat, intraminul diazotat) nu dau o reacție specifică cu tritenolii simetrici. Am găsit că e cu mult mai avantajos reactivul vanilină-acid clorhidric descris în literatura sovietică, deoarece cu tritenolii simetrici dă o colorație caracteristică (10, 14, 16). În continuare am constatat că în afară de vanilină, tot o colorație caracteristică dă și furfurulul, ba mai mult, acesta s-a dovedit a fi mai avantajos, întrucît nuanțele închise ce s-au format au făcut posibilă o citire mai precisă, iar colorația ce a apărut a fost durabilă.

Devoloparea cromatogramelor am executat-o în felul următor: Cromatograma uscată s-a umbrat într-o soluție de vanilină 1% sau de furfurul 2% cu alcool. După uscare, cromatograma s-a pus în atmosferă saturată cu acid clorhidric. Aici, peiele derivaților de floroglucină s-au colorat caracteristic. Rezultatele obținute sînt cuprinse în tabelul Nr. 1.

Tabelul Nr. 1.

	Vanilină		Furfurul	
	Culoarea	Sensibil. în g	Culoarea	Sensibil. în g
Florizină	roșu	5	albastru	3
Floretină	roșu	5	verde apoi albastru	7
Floroglucină	roșu	2	galben verzui, apoi albastru	3

Avantajul ce-l prezintă reactivii a constat nu numai în sensibilitatea lor pronunțată, ci și în faptul că am obținut indicații în legătură cu prezența legăturii glicozidice. Aldehidele nu reacționează cu grupele fenolice decît după ce legătura glicozidică s-a descompus sub acțiunea acidului clorhidric. Ca urmare a acestui fapt, substanțele care conțin legătura glicozidică dau o reacție de culoare tardivă. În cazurile noastre am observat acest fenomen cu ocazia dezvoltării florizinei, care a reacționat numai după cca 10 minute.

Pentru punerea în evidență a floroglucinei am utilizat și proprietatea acesteia de a da sub efectul NH₃ o fluorescență albastră la lumina U. V.

Hirtie. Cromatogramele le-am preparat pe hirtie de filtru rotundă Schleicher-Schüll Nr. 5893 cu diametrul de 18,5 cm.

Date fiind avantajele pe care le prezintă și pe care le-am relatat într-o comunicare anterioară (12), am aplicat procedeul segmentelor.

Examenul activității biologice

Am observat că sub acțiunea extractului din frunză sau din scoarță de păr fosfatata alcalină e inhibată nu numai in vivo ci și in vitro. Întrucît a trebuit să examinăm acțiunea biologică a unor extracte obținute într-o cantitate extrem de mică prin procedeul cromatografiei pe hirtie, secțiunile din rinichi au fost puse în contact cu aceste extracte in vitro. Secțiunile rinichilor de șoareci deparafinate și lipite pe o lamelă le-am introdus într-un vas umed pipetind pe ele soluția de incubare. Compoziția soluției de bază pe care am preparat-o s-a deosebit de cea a soluției utilizate în procedeul Gomori (5) prin faptul că a conținut cu 20% mai puțină apă. La utilizare am adăugat în câteva cazuri pentru controlul secțiunilor 20% apă distilată sau ser fiziologic, iar pe celelalte secțiuni am pipetat o soluție în care am amestecat o cantitate tot 20% din

extractul examinat. Procedind într-un mod atât de economic, am reușit să întrebuițăm la incubarea unui preparat numai $\frac{1}{2}$ ml din soluția care a conținut 0,2—1% substanță de extract. Preparatele au fost incubate timp de 10 minute la 20°C, deoarece am constatat că acestea sînt condițiile în care se pot pune mai bine în evidență diferențele ivite în activitatea enzimatică.

Rezultate.

Extractul purificat a inhibat fosfataza alcalină, prin urmare a conținut substanțele căutate. Substanțele reziduale care nu s-au colorat cu reactivul vanilinic nu au paralizat nici enzima. Din aceasta putem să deducem că inhibarea activității enzimatice se leagă în adevăr de prezența derivaților floroglucinei. În cursul cercetărilor noastre, pe cromatograme am pus în evidență în extractul din frunză un spot (X_1), iar în cel din scoarța două spoturi (XK_1 și XK_2). Comparîndu-se valorile R_f ale substanțelor marcate X_1 și XK_1 , s-au dovedit a fi identice, avînd de asemenea același efect biologic. Această observație face probabilă identitatea celor două substanțe. (În cele ce urmează vom desemna ambele substanțe prin X_1 în loc de X_1 și XK_1 .) Valoarea R_f a lui X_1 a diferit de cea a florizinei irigată pe aceeași cromatogramă (tabelul Nr. 2 și fig. Nr. 3).

Tabelul Nr. 2.

Substanța	R_f 15% acid acetic	R_f	R_f 50% acid acetic	R_f
X_1	0,53		0,61	
XK_1	0,53		0,61	
XK_2	0,61	0,01	0,61	0,15
Florizina	0,60		0,76	
Floretină	0,26		0,77	
Floroglucina	0,80		0,73	

Valoarea R_f a componentului XK_2 nu diferă decît în mică măsură de cea a florizinei ($D R_f=0,01$). Dar următoarele trei observații demonstrează că e vorba de două substanțe diferite:

1. Spotul de XK_2 se colorează cu reactivii în câteva secunde, în timp ce florizina dă colorație numai după aprox. 10 minute; 2. dacă irigația se efectuează cu acid acetic 50%, atunci valoarea $D R_f$ considerabilă dintre R_f -ul florizinei și al substanței XK_2 exclude identitatea celor două substanțe (tabelul Nr. 2, Fig. Nr. 4); 3. florizina dă cu o soluție alcalinizată de H_2O_2 o reacție de culoare specifică (7), care nu a apărut în cazul nici unei substanțe extrase. Această reacție de culoare a apărut numai în prezența amoniacului. Aceasta arată de asemenea că nici una din substanțele extrase din frunza de păr nu e identică cu florizina și că ele sînt alți derivați ai floroglucinei. Cele două substanțe pot fi un produs de descompunere a florizinei. Comparînd valorile R_f ale substanțelor extrase cu cele ale floretinei și floroglucinei, diferența dintre aceste valori dovedește că e vorba de două substanțe felurite (tabelul Nr. 2, Fig. Nr. 3 și 4).

Celelalte două produse de descompunere posibile (acidul floretinic și florina) nu pot fi luate în considerare, deoarece acidul floretinic nu a reacționat cu reactivii utilizați, iar floretina din cauza legăturii glicozidice pe care o conține, dă reacția de culoare mult mai firziu.

Intrucît extrasele conțin și alte substanțe, a trebuit ca izolarea celor doi componenți să se facă pe cît posibil într-o formă omogenă. Această izolare am obținut-o prin procedeul cromatografiei pe hîrtie preparative. Produsele astfel obținute s-au dovedit a fi omogene, iar acțiunea lor biologică și proprietățile chimice au fost perfect concordante cu cele ale extractelor anterioare.

Examinarea biologică a substanțelor izolate din alte părți ale cromatogramelor a dat rezultate negative.

Pînă acum în frunza de păr au fost găsite numeroase substanțe de natură fenolică (1, 2, 4, 9, 11, 13, 15), dar acestea nu cauzează glicozurie. Eventuala înrudire chimică a substanțelor extrase din frunza de păr cu leucoantocianinele va fi lămurită numai în cursul cercetărilor noastre viitoare.

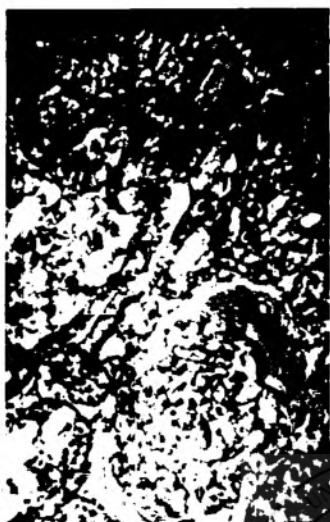


Fig. nr. 1.

Rinichi de control. Corespunzător părții principale a nefronului, activitatea fosfatazei alcaline pusă în evidență prin procedeul Gomori e semnalată de un precipitat negru. Ob. 10x. Oc. 5x.



Fig. nr. 2.

Dacă soluția de incubare ce servește la prănerea în evidență a fosfatazei alcaline conține un extract din frunză de păr purificat pînă la 0,5 miimi (X_1) enzima e complet inhibată. Ob. 40x. Oc. 5x, contrast de fază.



Fig. nr. 3.

Cromatograma derivaților floroglucinei. Solvent: acid acetic 15%. 1. Extract purificat din scoarță de rădăcină. 2. Extract purificat din frunză. 3. Extract din frunză. 4. Floretină. 5. Floroglucină. 7. Florizină. 8. Extract din scoarță de rădăcină.



Fig. nr. 4.

Cromatograma derivaților floroglucinei. Solvent: acid acetic 30%. 1. Floretină. 2. Florizină. 3. Extract din scoarță de rădăcină din păr. 6. Extract din scoarță de rădăcină de măr. 7. Extract din frunză de măr. 8. Floroglucină.

Discutarea rezultatelor

În cursul cercetărilor noastre am stabilit că în frunza de păr se poate pune în evidență o substanță, iar în scoarța rădăcinii de păr două substanțe care conțin probabil derivați ai floroglucinei. Una din aceste două substanțe (X_1) se găsește atât în frunză cât și în scoarța rădăcinii, în timp ce cea marcată XK_2 se găsește mai ales în scoarța rădăcinii. Analizând la același exemplar scoarța pedunculului și a tulpinii am găsit aceleași substanțe. Analizând o cantitate mai mare de extract, am putut pune în evidență și în frunză componentul XK_2 , dar într-o cantitate mult mai mică decât aceea de X_1 .

În organele vegetative ale varietății părului examinat (Charlotte de Royan, 1958) nu am găsit florizină nici în scoarța rădăcinii. Acest fapt concordă cu datele recente din literatură (prezența florizinei în frunza de păr e menționată într-o lucrare care a apărut acum mai bine de 100 de ani (9)).

În extractul din frunza și scoarța de rădăcină de păr preparate și examinate în condiții asemănătoare, nu am găsit florizină în cantitate mare (fig. Nr. 4). Pe baza datelor noastre considerăm probabil că ambele substanțe extrase conțin trei grupe fenolice libere cu o poziție simetrică, a căror compoziție va fi lămurită de cercetările noastre în curs de executare.

Așadar în organele vegetative ale părului am pus în evidență două substanțe care conțin probabil un nucleu de floroglucină și care nu au fost descrise încă în literatură. Aceste substanțe inhibă considerabil activitatea fosfatazei alcaline.

Sosit la redacție: 25 iunie 1959.

Bibliografie

1. BURQUELOT E., FICHTENHOLZ A.: Journ. Pharm. et Chimie II. 3. (1910);
2. BRADFIELD A. E., FLOOD A. E., HULME A. C., WILLIAMS A. H.: Nature 170. 168, (1952);
3. BRADFIELD A. E., FLOOD A. E.: Ann. Rep. E. M. Res. Station, 100 (1950);
4. CARTWRIGHT R. A., ROBERTS E. A. H., FLOOD A. E., WILLIAMS A. H.: Chem. a. Ind. 1962 (1955);
5. GOMORI G.: Microscopic histochemistry, University Chicago Press (1952);
6. HIMICESKIE REAKTIVI I PREPARATI, Moscova (1953);
7. JENNER F. A., SMYTH D. H.: J. of. Physiol 137, 72 (1957);
8. KEMENY GY., FÜZI J., KISGYÖRGY Z., RÁCZ G.: Orvosi Szemle 3—4, 228 (1958);
9. KONINK I.: Chim. Med. 259, 1835 citat Wehmer C.: Die Pflanzenstoffe, Fischer, Jena 1929—31;
10. MIHAILOV M. V.: Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R. 121, 330 (1958);
11. RÁCZ G., KISGYÖRGY Z., FÜZI J.: Acta Pharmaceutica Hungarica 28. 187 (1958);
12. RÁCZ G., BLAZSEK V.: Farmacia 6, 443 (1958);
13. RIVIERE, BAILHACHE: C. R. Acad. Sci. 139, 81 (1904) citat Wehmer c. loc. cit.;
14. VOIBEL SZ. Identifiția Organici Soedineni, Moscova (1957);
15. WILLIAMS A. H.: Nature 175, 213 (1955);
16. ZAPROMETOV M. N.: Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R. 96, 1205 (1954).

НОВЫЕ ФТОРИДЗИНОПОДОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА В ГРУШЕВОМ ДЕРЕВЕ

Блажек В., Кемень Дь., Рац Г.

Авторы в вегетативных органах грушевого дерева обнаружили два соединения которые вероятно содержат флороглюциновое ядро и имеют выраженное тормозящее действие на активность щелочной фосфатазы.

Эти данные в литературе описываются впервые.

LA PRÉSENCE DE CERTAINES SUBSTANCES NOUVELLES À EFFET DE PHLORIDZOSIDE DANS LE POIRIER

V. Blazsek, Gy. Kemény, G. Rác

Les auteurs ont mis en évidence dans les organes végétatifs du poirier deux substances qui exercent un effet inhibitif très marqué sur l'activité de la phosphatase alcaline. Ces substances qui ne figurent pas jusqu'à présent dans la littérature de spécialité, contiennent selon toute probabilité un noyau de phloroglucinol.