

Revista de Medicină și Farmacie

Vol. 53
2007

Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș



Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem

Revista de Medicină și Farmacie

Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle

Publicație a
Universității de Medicină și Farmacie
din Târgu Mureș
University Press

ISSN 1221-2229

Adresa
Gheorghe Marinescu nr. 38, 540139 Târgu Mureș
Tel. (+40)-265-215551. Fax (+40)-265-210407

CONSILIUL ȘTIINȚIFIC

Prof. dr. Constantin Copotoiu
Rector

Prof. dr. Örs Nagy
Prof. dr. Klara Brânzeanu
Prorectori

Prof. dr. Ioan Nicolaescu
Căpitan

Conf. dr. Virgil Gliga
Prof. dr. Sorin Popșor
Prof. dr. Maria Dogaru
Decani

Prof. dr. Gyöngyi Duduț
Prof. dr. Galațion Oltean
Prof. dr. Dezső Kovács
Secretari științifici

COLEGIUL DE REDACȚIE

Prof. dr. Marius Sabău
Redactor șef

Sef lucr. dr. Carmen Căldăraru
Secretar de redacție

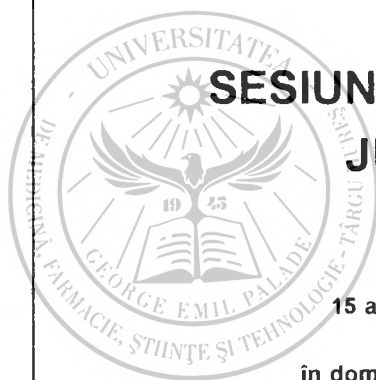
Prof. dr. Francisc Schneider
Prof. dr. Toru Shimizu
Prof. dr. Nicole Berger
Prof. dr. György Benedek
Prof. dr. Miklós Kásler
Prof. dr. Zoltan Szentimay
Prof. dr. Dan Teodor Simionescu

Prof. dr. Angela Borda
Prof. dr. Carol Csödö
Prof. dr. Radu Deac
Conf. dr. Dan Dobrenu
Conf. dr. Grigore Dogaru
Prof. dr. Imre Egyed
Prof. dr. Stefan Hobai
Sef. lucr. dr. Silvia Imre
Conf. dr. Monica Monea Pop
Prof. dr. Ioan Muntean
Prof. dr. Monica Sabău
Prof. dr. Béla Szabo
Conf. dr. Tibor Szilágyi
Conf. dr. Camil E. Vari
Redactori

Tehnoredactare Deák Vasile
Coperta MasterDruck Târgu Mureș

2007, vol. 53, Supliment 4

Academia Română
Academia de Științe Medicale
Universitatea de Medicină și Farmacie
Târgu-Mureș



SESIUNEA ȘTIINȚIFICĂ JUBILIARĂ

15 ani de cercetare comună

în domeniul plantelor medicinale

între Academia Română și Ungară

Târgu-Mureș, România

23-24. Apr. 2007

SPONSOR PRINCIPAL:

GEDEON RICHTER ROMANIA S.A.



SPONSOR:

FARMACIA VIVA

ROMANIAN ACADEMY
ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
TÂRGU-MUREȘ

ANNIVERSARY SCIENTIFIC SESSION

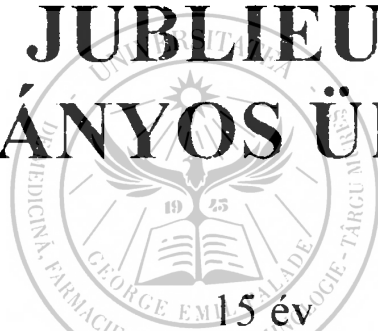


15 years
of Common Research on Medicinal Plants of the
Romanian and Hungarian Academies

Târgu-Mureș, Romania
23-24 april 2007

ROMÁN AKADÉMIA
ROMÁN ORVOSTUDOMÁNYI AKADÉMIA
Orvostudományi és Gyógyszerészeti Egyetem
Marosvásárhely

JUBLIEUMI TUDOMÁNYOS ÜLÉSSZAK



15 év
közös kutatása a ROMÁN és a MAGYAR
AKADÉMIA között a gyógynövények szakterületén

Marosvásárhely, Románia
2007 április 23-24

Bine ați venit !

Este un prilej de bucurie pentru Comisia de Organizare, să avem onoarea de a aniversa împreună 15 ani de colaborare dintre Academia Română, Academia de Științe Medicale din România și Academia de Științe Ungară.

În cadrul cercetării științifice este un fapt cunoscut, că munca în echipă este mult mai fructuoasă, decât activitatea individuală.

Tema de cercetare (Chemotaxonomia fam. Lamiaceae), rezultat al colaborării dintre cele două Academii a fost propusă (1991) de Domnul Profesor Dr. Máthé Imre, de la Institutul de Ecologie și Botanică al Academiei de Științe Ungare din Vácrátót. Din partea Academiei Române propunerea a fost acceptată și aprobată de Prof. Dr. Nicolae CAJAL, vicepreședintele Academiei Române, care, adresându-se universităților din Târgu-Mureș și Cluj-Napoca anunța: "...se deschide cooperarea dintre Universitatea dumneavoastră, Universitatea de Medicină și Farmacie din Cluj Napoca cu Academia de Științe Ungară începând cu 1 iunie 1992".

La nivelul Universității de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș, Domnul Rector Prof. Dr. Ion Pascu s-a declarat de acord cu colaborările în tema susamintită, numind ca responsabil al temei de cercetare pe Dl. Prof. Dr. Cséző Carol (nr. 1312/30.03.1992).

Ca responsabil al temei de cercetare din partea Universității de Medicină și Farmacie din Cluj-Napoca a fost numit Domnul Profesor Dr. Honorius Popescu, iar mai târziu Domnul Profesor Dr. Mircea Tămaș.

De la început programele de cercetare elaborate pe baza temei principale (Chemotaxonomia fam. Lamiaceae) au fost discutate și realizate de echipa comună (ROHU). Pentru realizări deosebite, senatul UMF Tg Mureș, prin Domnul Rector, Profesor Dr. Marius Sabău a conferit titlul de Doctor honoris causa Domnului Profesor Dr. Szendrei Kálmán.

În prezent, d-l Prof. Dr. Constantin Copotiu, rectorul Universității de Medicină și Farmacie Târgu – Mureș, susține cu consecvență dezvoltarea medicinei alternative și studiul plantelor medicinale. Cu sprijinul său și al conducerii universității a fost posibilă organizarea și desfășurarea acestei întruniri științifice jubiliare.

Munca de cercetare din cadrul programelor anuale poate fi caracterizată prin seriozitate și profesionalism. Trebuie amintite și Conferințele de perfecționare organizate la Cluj-Napoca, Târgu-Mureș și Miercurea-Ciuc. În munca de cercetare și la cursurile de perfecționare s-au luat în considerare prevederile OMS și UE în domeniul alimentar și al plantelor medicinale.

În 1994/1995, echipa de cercetare a fost lărgită cu reprezentanți ai Academiei Bulgare și Sârbe, la care au aderat specialiști din Slovacia, Germania și Marea Britanie.

Pentru a dovedi locul plantelor medicinale din Bazinul Carpatic în terapie, Domnul Profesor Dr. Szendrei Kálmán a inițiat un ciclu de conferințe și publicații pentru selectarea speciilor medicinale cu acțiune certă.

În viitor, colaborarea între cele 7 Academii trebuie să continue pe baza proiectării și gândirii comune, cu scopul de a rezolva problemele ivite prin integrarea în Comunitatea Europeană.

Welcome note

It is a real pleasure for us, the Coordinating Board, to celebrate 15 years of the collaboration between The Romanian Academy, The Romanian Medical Academy and the The Hungarian Scientific Academy.

It is a well-known fact that the team work is more effective than the individual work

The research theme, the Chemotaxonomy of the Lamiaceae family, as a result of the collaboration between the two Academies was proposed (1991) by Prof. Dr. Máthé Imre, member of The Institute of Ecology and Botany, part of the Academy of Hungarian Sciences. Prof. Dr. Nicolae CAJAL, vice president of the Romanian Academy, accepted this proposal and regarding The University of Medicine and Pharmacy from Târgu-Mureş and Cluj-Napoca, he said: "...starting from the 1st of July 1992 the cooperation between your University and The University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca with The Hungarian Scientific Academy will begin."

Professor Doctor Ion Pascu, the rector of our university agreed with this collaboration concerning the above mentioned theme and appointed Prof. Dr. Csödö Carol as responsible for the research theme (nr. 1312/30.03.1992).

At The University of Medicine and Pharmacy from Cluj-Napoca, the same responsibility was given to Prof. Dr. Honorius Popescu and later on to Prof. Dr. Mircea Tămas.

From the very beginning, the research programmes worked out on the basis of the main theme (the Chemotaxonomy of the Lamiaceae family) were being discussed and elaborated by ROHU team. For his special achievements, Prof. Dr. Marius Sabău, the rector of The University of Medicine and Pharmacy from Târgu-Mureş, rewarded Prof. Dr. Szendrei Kálman with the title of Doctor Honoris Causa.

At present, Prof. Dr. Constantin Copotiu, rector of our university, supports with the same consistency the development of alternative medicine and the study of medical plants. Thanks to his help and to the university leading board's support, we were able to organize and deploy this scientific jubilee meeting.

The yearly programmes' research work may be defined by commitment and professionalism.

We should also mention the training conferences organized at Cluj-Napoca, Târgu-Mureş and Miercurea-Ciuc. The research work and the training courses were organized according to WHO and UE requirements in the food and medical plants industry.

In 1994/1995 the research team extended comprising representatives of the Serbian and Bulgarian Academies, later also professionals from Slovakia, Germany and the UK.

In order to prove the place of the medical plants from the Carpathian basin in therapy, Prof. Dr. Szendrei Kálman initiated a series of conferences and publications for the selection of the medical species with proved effects.

The collaboration between the seven Academies shall go on for the future, on the basis of common design and way of thinking, its aim being to meet any challenge that may occur following our integration in the European Community.

the 18th of April 2007

Coordinating Board

Köszöntjük Vendégeinket!

Nagy öröm számunkra, a szervező bizottság számára, hogy a Román Akadémia, a Román Orvostudományi Akadémia és a Magyar Tudományos Akadémia együttműködésének 15-ik. jubiláris ülésszakán köszönhetjük a résztvevőket, hogy ünnepi rendezvényünket jelenlétükkel megtisztelték.

A tudományos kutatásban régi felismerés az, hogy a csapatmunka eredményesebb mint az egyéni törekvések.

Ezt az együttműködést 1991-ben Máthé Imre professzor kezdeményezte, aki akkor a Magyar Tudományos Akadémia Vácrátot-i Ökológia és Botanikai Intézetének egyik vezetője volt.

A javasolt közös kutatási témát (A LAMIACEAE CSALÁD CHEMOTAXONOMIÁJA) a Román Akadémia jóváhagyta. Prof. dr. Nicolae Cajal, az Akadémia alelnöke az kutatási téma elfogadását a marosvásárhelyi és kolozsvári Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetemek felé továbbítva bejelentette, hogy "Megkezdődik az együttműködés a marosvásárhelyi, kolozsvári Orvosi és Gyógyszerészeti egyetemek, valamint a Magyar Tudományos Akadémia között, 1992 június elsejétől".

Prof. dr. Ion Pascu, az egyetemünk rektora egyetértett a közös kutatási témával és Prof. dr. Csedő Károlyt nevezte ki a kutatási téma felelősének. A kolozsvári munkaegyüttest Prof. Dr. Honorius Popescu vezette, az utóbbi időben pedig Prof. Dr. Mircea Tămas az évi programok felelőse.

Kezdetől az évi kutatási programokat a főtéma (A LAMIACEAE CSALÁD CHEMOTAXONOMIÁJA) alapján, a kutatócsapat (ROHU) állította össze. Prof. Dr. Szendrei Kálmánt évtizedekre kiterjedő, eredményes munkájáért az egyetem Szenátusa, Prof. Dr. Marius Sabău rektor által, Doctor Honoris Causa címmel tüntette ki.

Prof. Dr. Constantin Copotioiu rektor elkötelezett híve az alternatív medicinának, a gyógynövényekkel történő gyógyításnak. Személyes támogatásával, valamint az egyetem vezetőségének nagylelkű segítségével sikerült megszervezni és lebonyolítani ezt a jubiláris rendezvényt és a dolgozatok kötetének kiadását.

Az évenkénti kutatási programokat, a továbbképzési előadásokat a munkaegyüttes tagjai a legnagyobb komolysággal és hozzáértéssel valósították meg. Úgy a kutató, mint a továbbképző munkában mindig a figyelem középpontjában álltak az WHO és az EU élelmiszerekkel és gyógynövényekkel kapcsolatos javaslatai.

1994/1995-ben a kutatócsoport kibővült a Bolgár és a Szerb Akadémiák képviselőivel, később csatlakoztak a Szlovákia-, Németország- és az Egyesült Királyságbeli (UK) szakemberek.

Az utóbbi 7 évben, Szendrei professzor javaslatára beindult a "Növényi gyógyszerek helye a Kárpát-medence gyógyszerkincsében" című előadás és közlési sorozat. Ennek fő célja, hogy szorgalmazza (tudományos bizonyítékok alapján) a gyógynövények felhasználását és értékesítését.

Az újabb együttműködési megállapodásokban is helyet kell kapjanak a szakmai állásfoglalások az indokolatlanul szaporodó, elterjedt, csak kereskedelmi hasznot jelentő gyógyszerkészítményekkel szemben.

Együttműködésünket a jövőben is a közös gondolkodás, a közös EU köteleességek felmérése és azok teljesítése kell jellemezze, amely újabb eredmények elérésére fogja készíteni a 7 Akadémiát képviselő kutatók munkáját

COMITETUL DE ORGANIZARE

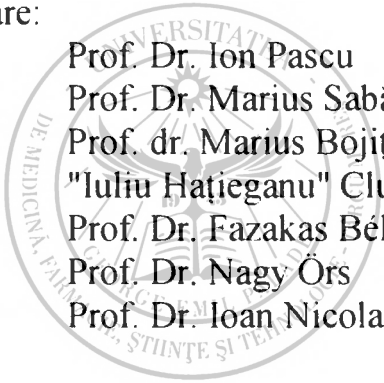
Președinte: Prof. Dr. Constantin Copotoiu
Rectorul universității

Co-Președinți: Prof. Dr. Ionel Haiduc
Prof. Dr. Laurențiu Popescu

Vice-președinți: Prof. Dr. Klara Brînzaniuc
Prof. Dr. Csedő Károly

Secretari: Conf. Dr. Sigrid Eșianu
Asist. Univ. Drd. Laczkó-Zöld Eszter

Membrii de onoare:



Prof. Dr. Ion Pascu
Prof. Dr. Marius Sabău
Prof. dr. Marius Bojiță - Rectorul Universității
"Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca
Prof. Dr. Fazakas Béla
Prof. Dr. Nagy Örs
Prof. Dr. Ioan Nicolaescu

Membrii: Prof. Dr. Monica Sabău
Prof. Dr. Sorin Leucuță
Prof. Dr. Mircea Tămaș
Dr. Kelemen Ladislau
Prof. Dr. Oroian Silvia

Limbile oficiale ale Sesiunii jubiliare:
-română, engleză, maghiară

La solicitarea celor prezenți, se asigură traducerea (Istrate Melania)

Intrarea liberă pentru studenți la sesiunile științifice

Comitetul științific

Prof. Dr. Ionel Haiduc	Președintele Academiei Române
Prof. Dr. Laurențiu Popescu	Președintele Academiei de Științe Medicale
Prof. Dr. Gheorghe Benga	Vicepreședintele Academiei de Științe Medicale
Prof. Dr. Nicolae Boșcaiu	Membru al Academiei Române, Secția Biologie
Prof. Dr. Constantin Copotoiu	Rectorul U.M.F. din Târgu-Mureș
Prof. Dr. Marius Bojiță	Rectorul U.M.F. "Iuliu Hațieganu" din Cluj Napoca
Prof. Dr. Máthé Imre	Directorul Institutului de Farmacognozie, Universitatea Szeged, Ungaria
Prof. Dr. Marius Sabău	Șef de catedră, U.M.F. Tg.Mureș
Prof. Dr. Hohmann Judit	Șef de catedră, Universitatea din Szeged, Ungaria
Prof. Dr. Ursula Stănescu	Prorector U.M.F. "Gr. T. Popa" Iași
Prof. Dr. Ioan Nicolaescu	Cancelar U.M.F. din Târgu-Mureș
Prof. Dr. Sorin Leucuță	Șef de catedră U.M.F. "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca
Prof. Dr. Viorica Istudor	Catedra de Farmacognozie București
Prof. Dr. Csedő Carol	U.M.F. Târgu-Mureș
Prof. Dr. Manfred Anke	Friedrich Schiller Universităt Jena, Germany
Conf. Dr. Sigrid Eșianu	Șef de Disciplină, U.M.F. Târgu- Mureș
Prof. Dr. Falkay György	Directorul Institutului de Farmacologie, Universitatea Szeged, Ungaria
Prof. Dr. Kéry Ágnes	Universitatea "Semmelweis" Budapesta, Ungaria
Prof. Dr. Tyihák Ernő	Academia de Științe Ungară, Budapesta

Prof. Dr. Vida Gábor

Academia de Științe Ungară,
Budapesta

Prof. Dr. Janicsák Gábor

Academia de Științe Vácrátót, Ungaria

Prof. Dr. Sylvia Cziegle

Institutul de Farmacognozie
Bratislava, Slovakia

Șef lucr. Dr. Antal Diana-
Simona

Șef de Disciplină, U.M.F. "Victor-
Babeș" Timișoara

Conf. Dr. Muntean Dana
Lucia

Șef de Disciplină, U.M.F. din Târgu-
Mureș

Dr. Kelemen László

Fabrica de Medicamente "Gedeon
Richter" România

Prof. Dr. Jung János

Prodecan al Facultății de Medicină,
Director al Școlii Doctorale U.M.F.
Târgu-Mureș



PROGRAM

23 aprilie 2007

Sala Senatului

- 17⁰⁰ Cuvântul de deschidere al rectorului Universității de Medicină și Farmacie Tg. Mureș,
Welcome address of the Rector of the University of Medicine and Pharmacy Tg. Mureș
Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem rektorának ünnepi köszöntője
Prof. Dr. Constantin Copotiu
- 17¹⁵ Salutul oaspeților invitați
Greetings of the invited guests
Üdvözlés a meghívott vendégek részéről
- 18⁰⁰ Rezultatele cercetărilor comune și perspectivele lor.
Results of common research and their perspectives
Közös kutatási eredmények és azok perspektívái
Dr. Máthé Imre și Prof. Dr. Csedő Carol
- 18⁴⁰ Conferirea titlului "Doctor Honoris Causa" a Universității de Medicină și Farmacie Tg. Mureș domnului *Prof. Dr. Máthé Imre*, directorul Institutului de Farmacognozie, Universitatea Szeged și consultant științific la Institutul de Cercetări Ecologice și Botanice Vácrátót, din cadrul Academiei de Științe Ungare
Conferment of the degree "Doctor Honoris Causa" of the University of Medicine and Pharmacy Tg. Mureș to Prof. Dr. Máthé Imre, head of the Institute of Pharmacognosy, University of Szeged and scientific adviser at the Research Institute of Ecology and Botany of the Hungarian Academy of Sciences, Vácrátót
A Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem „Doctor Honoris Causa” címmel tünteti ki *Prof. Dr. Máthé Imre*t a Szegedi Tudományegyetem Farmakognózia Intézetének igazgatóját valamint a Magyar Tudományos Akadémia Ökológiai és Botanikai Kutatóintézetének tudományos tanácsadóját
- 19²⁰ Conferirea diplomei "Professor Emeritus" domnului *Prof. Dr. Manfred Anke* de la Universitatea Friedrich-Schiller din Jena
Conferment of the diploma "Professor Emeritus" to Prof. Dr. Manfred Anke from the Friedrich-Schiller-University Jena
A Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem „Professor Emeritus” diplomájának átadása *Prof. Dr. Manfred Anke*nak a *jénai* Friedrich-Schiller-Egyetemről
- 20⁰⁰ Recepția Rectorului
Rector's reception
Rektori fogadás

24 aprilie 2007

Sala Senatului

9⁰⁰ Conferințe - Plenary lectures - Konferenciák

1. MANFRED ANKE: *Iodine in the food chain of human beings essentiality and toxicity*
2. HOHMANN JUDIT, CSUPOR DEZSŐ, BORCSA B., FORGÓ PÉTER, MOLNÁR A., CSEDŐ KÁROLY, MÁTHÉ IMRE: *Biológiaiilag aktív diterpénalkaloidok izolálása Kárpát-medencében előforduló Aconitum fajokból (Isolation of biologically active diterpene alkaloids from Aconitum species nativ to the Carpathian Basin)*
3. TYIHÁK ERNŐ, KIRÁLY-VÉGHELY ZSUZSA, KÁTAY G., M. MÓRICZ ÁGNES, OTT P.G.: *BioArena as biodetection system in the study of plant ingredients*
4. BÁTHORI MÁRIA, MÁTHÉ IMRE: *A kromatográfia szerepe az anabolikus hatású ekdiszteroidokat tartalmazó növényfajok felfedezésében (The Role of Chromatography on the Discovery of the Anabolic Ecdysteroids Containing Species)*

10⁴⁵ Pauză de cafea – Coffee break – Kávészünet

11⁰⁰ Comunicări științifice - Short lectures - Előadások bemutatása

5. SZENDREI KÁLMÁN: *Gyógynövények tradicionális növényi gyógyszerekben és étrend-kiegészítőkben: Haladás, vagy visszalépés? (Is it a matter of evolution or involution using medicinal plants in traditional products and nutritional supplements ?)*
6. ALBERTI Á., VUKICS V., HEVESI TÓTH B., CSEDŐ K., SZÖKE ÉVA, KÉRY ÁGNES: *Áfonya fajok fenoloidjainak összehasonlító vizsgálata (Phenolic compounds of Vaccinium species)*
7. VORICA ISTUDOR, MARIA LIDIA POPESCU, CERASELA ELENA GÎRD, LIGIA ELENA DUȚU, MARIANA PAVEL, LUCIA PÎRVU, GH. ȚARĂLUNGĂ, C. Ionescu-Târgoviște: *Proces tehnologic pilot de obținere a unui extract standardizat din Juglandis folium (semifabricat) și stabilirea metodologiei de control al calității (Pilot technological process to obtain a standardized extract from Juglandis folium (semimanufactured) and establishment of the quality control methodology)*
8. TÖKÉS BÉLA, FERENCZ LÁSZLÓ., SILVIA DUȘA, GABRIELLA DONÁTH-NAGY, J. SZÁVA, JÚLIA BALAN, ERZSÉBET BODÓ, KATALIN TÓTH, J. SZAKÁCS, ALINA VINTILA: *A soft-hard felfogás kiterjesztési lehetőségei a fitobiológiában (Possibilities of extension of the soft-hard concept on phytobiology)*
9. OROIAN SILVIA: *Plante medicinale din flora spontană a județului Mureș (Medicinal plants from the flora of Mureș County)*

13⁰⁰ Pauză de masă - Lunch break - Ebéd

**14⁰⁰ Vizitarea Grădinii Botanice și a Grădinii de Plante Medicinale
Visitation of the Botanical Garden and the Medicinal Plants Garden
A Botanikuskert és a Gyógynövénykert meglátogatása**

15⁰⁰ Comunicări științifice - Short lectures - Előadások bemutatása

10. GÁVA A., SIMÁNDI B, SZARKA SZ, KURSINSZKI L, CSEDŐ K, PLANDER SZ, SZÖKE É, KÉRY Á : Betulin és betulinsav előfordulásának vizsgálata *Alnus glutinosa*, *Betula pendula* és *Platanus hybrida* fajokban (*Analysis of Betulin and betulinic acid in Alnus glutinosa, Betula pendula and Platanus hybrids*)
11. NEREȘ SIMONA, REBEGEA OANA, CODREANU MARILENA-VIORICA, DINU MIHAELA: Cercetări farmacologice privind acțiunea antiinflamatoare a uleiului gras de *Echium vulgare* L. (*Pharmacologic studies on the anti-inflammatory action of the fatty oil from the seeds of Echium vulgare L.*)
12. PAVEL MARIANA, VOICU MARIA: Studii botanice și fitochimice asupra speciei *Aesculus x carnea* Hayne (Hippocastanaceae) (*Botanical and phytochemical studies on Aesculus x carnea – Hippocastanaceae*)
13. POPESCU MARIA LIDIA, DINU MIHAELA, TUDOR IOANA: Studiul farmacognostic comparativ al produselor vegetale *Filipendulae hexapetalae* flores și *Filipendulae hexapetalae folium* (*Comparative pharmacognostical study regarding Filipendulae hexapetalae flores and filipendulae hexapetalae folium*)
14. GÂLEA CARMEN, VERES KATALIN, MÁTHÉ IMRE, CSEDŐ CAROL: Analiza gazcromatografică a uleiurilor volatile de *Pelargonium roseum* (*Gas-chromatographic analysis of volatile oils from Pelargonium roseum*)
15. GÂLEA CARMEN, CSEDŐ CAROL, VLASE L.: Conținutul în polifenoli al frunzelor și tuplinilor de *Pelargonium roseum* Willd. recoltate din Grădina de plante medicinale a U.M.F. Târgu Mureș (*Polyphenol content of leaves and stems of Pelargonium roseum Willd. harvested from the Medicinal Plants Garden of UMF Tg. Mureș*)
16. ECHIM ILIE., KLARA BRÂNZANIUC, CSEDŐ CAROL: Contribuții la cunoașterea etnomedicinii din partea sud-vestică a Munților Călimanului (*Contributions to the knowledge of the ethnobotany from the south-western part of the Călimanului mountains*)
17. OLARIU MĂRIOARA, OȘAN ALEXANDRINA, POP IOANA: Studiul privind compoziția și distribuția elementelor metalice în planta *Taraxacum officinale*, fam. Compositae (*Study regarding composition and distribution of metals in Taraxacum officinale, Compositae*)

17⁰⁰ Sesiune de poster - Poster session - Poszterek bemutatása

**18⁰⁰ Concluzii și proiecte noi
Conclusions and new projects
Következtetések és új projektek**

19⁰⁰ Ceremonia de închidere - Closing Ceremony - Záróülés

20⁰⁰ Cina - Dinner - Ünnepi vacsora

Sesiune de poster - Poster session - Poszterek bemutatása

1. ALBERTI Á., VUKICS V., HEVESI TÓTH B., CSEDŐ K., SZŐKE É., KÉRY Á.: Áfonya fajok fenoloidjainak összehasonlító vizsgálata (*Comparative study of phenolic compounds from Vaccinium species*)
2. DEHELEAN CRISTINA, PEEV CAMELIA, SIMONA CÎNTĂ-PÎNZARU, ȘOICA CODRUȚA, TATU C.A. ANTAL DIANA: Studii in vitro pe celule stem mezenchimale și celule leucemice a unui extract uscat de scoarță de mesteacăn (*In vitro studies on mesenchymal stem cells and leukaemia cells of dry birch tree bark extract*)
3. DUȚU LIGIA ELENA, GÎRD CERASELA ELENA: Farmacopeea europeană și Farmacopeea română – referințe de calitate pentru controlul produselor vegetale. Nota I. Evaluarea conținutului de principii active prin metode gravimetrice și titrimetrice (*European pharmacopoeia and Romanian pharmacopoeia – references for the quality testing for herbal drugs Note I. The content of active principles determination by using gravimetric and titrimetric methods*)
4. GÎRD CERASELA ELENA, PAVEL MARIANA, DUȚU LIGIA ELENA: Studiul chimic calitativ și cantitativ al gemoderivatului de muguri de coacăz negru și a materiei prime aferente (*Qualitative and quantitative chemical study for black-currant gemoderivative and for its raw material*)
5. HAJDÚ ZSUZSANNA, CSUPOR-LÖFFLER BOGLÁRKA, HOHMANN JUDIT, RÉTHY BORBÁLA, ZUPKÓ ISTVÁN, FALKAY GYÖRGY, MÁTHÉ IMRE: Magyarországon előforduló Asteraceae fajok in vitro antiproliferatív hatásának szűrővizsgálata (*Screening of „in vitro” antiproliferative activity of plants from the Asteraceae family growing in Hungary*)
6. HUNYADI ATTILA., TÓTH NOÉMI, TÓTH G., SIMON A., POLGÁR L., BÁTHORI MÁRIA: Ecdysteroid isolation using rotation planar chromatography
7. JANICSÁK GÁBOR, VERES KATALIN, KAKASY ANDRÁS ZOLTÁN, MÁTHÉ IMRE: Az oleánol- és az ursolsav előfordulása a Lamiaceae családban (*Oleanolic and ursolic acid in Lamiaceae family*)
8. LIKTOR-BUSA ERIKA, SIMON A., TÓTH G., Máthé Imre, Mária Báthori: Új dimenziók az ecdiszteroidok izolálásában (*New dimensions in isolation of ecdysteroids*)
9. NEMETH SEBASTIAN, NEMETH TIBOR, VLASE L., POPESCU H.: Analiza calitativă și cantitativă a unor compuși sterolici din *Salvia officinalis* L. (*Qualitative and quantitative analysis of sterols from Salvia officinalis* L.)
10. PEEV CAMELIA, ANTAL DIANA, DEHELEAN CRISTINA, KAYCSA ADRIANA: Analiza conținutului de apă în mugurii foliari (*The analysis of the water content in foliar buds*)
11. RUSU MONICA, MARKUS MARIANNA, CSEDŐ CAROL: Analiza comparativă a compoziției în acizi grași a diferitelor sortimente de ulei de ricin (*Ricini oleum*) pentru uz extern (*Comparative analysis of the fatty acids content of different sorts of castor oil (ricini oleum) for external use*)
12. SABÁU MONICA, TARCEA MONICA, GOLEA CRISTINA, POPA RODICA, ILCUȘ ROXANA: Circulația virusurilor hepatice și gradul de afectare al populației județului Mureș prin infecții hepatice
13. SÜLYÖK EDVÁRD, RÉDEI DÓRA, HOHMANN JUDIT, MÁTHÉ IMRE: Isolation and structure elucidation of new diterpenoids from *Euphorbia pannonica* Host.
14. SZŐKE ÉVA, BÁLVÁNYOS ISTVÁN, KRAJEWSKA ANNA, KURSINSZKI LÁSZLÓ, MÁTHÉ ÁKOS: The Alkaloids and Polyacetylenes in Hairy Root Cultures of *Lobelia inflata* L.
15. TÁMAȘ MIRCEA, VLASE L., POP CRISTINA: Analiza flavonoidelor din frunzele de afin (*Myrtilli folium*) (*The analysis of flavonoids from bilberry leaves (Myrtilli folium)*)

16. TÓTH NÓÉMI, SIMON A, TÓTH G, MIKLÓSSY VÁRY VILMOS, MÁTHÉ IMRE, BATHORY MÁRIA: Új 26-hidroxi Ekdisztteroidok izolálása a *Silene viridiflora*-ból (*Isolation of new 26-hydroxy – ecdysteroids from Silene viridiflora*)
17. VANCEA SZENDE, SZABÓ JUDIT, VARGA ERZSÉBET, DONÁTH-NAGY GABRIELLA: Fenolos típusú hatóanyagok vizsgálata Myrtilli- és Vitis-idaeeae foliumból. A talaj pH-jának hatása a fenolos anyagok mennyiségére. (*Study of phenolic compounds from Myrtilli folium and Vitis-idaeeae folium. The influence of soil-pH on the content of phenolic compounds*)
18. VÁNYOLÓS ATTILA, CSEDŐ KÁROLY, BÁTHORI MÁRIA, MÁTHÉ IMRE: A *Telekia speciosa* fitokémiai vizsgálata (*Phytochemical analysis of Telekia speciosa*)



25. _____ _____

SUBJECT: [REDACTED]

SECRET

The **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry** is a leading journal in the field of child and adolescent psychiatry. It publishes original research, clinical reports, and reviews. The journal is published by the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry (AACAP).

4. 41784 (Mammals) [redacted]
 16. 41785 (Mammals) [redacted]
 17. 41786 (Mammals) [redacted]
 18. 41787 (Mammals) [redacted]
 19. 41788 (Mammals) [redacted]
 20. 41789 (Mammals) [redacted]

[illegible]

1. **Location:** [REDACTED]
 2. **Date:** [REDACTED]
 3. **Time:** [REDACTED]
 4. **Subject:** [REDACTED]
 5. **Witnesses:** [REDACTED]
 6. **Remarks:** [REDACTED]

1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678, 26

For more information, contact the author at john@johnmccall.com.

[illegible]

Chemical differences and similarities in the Family Lamiaceae

I. Máthé^{1,2}, K. Csödő³

¹Institute of Pharmacognosy, University of Szeged, H-6720 Szeged, Eötvös Str.6

²Institute of ecology and Botany of the Hungarian Academy of Sciences, H-2367 Vácraót, Alkotmány Str. 10.

³ Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Tg. Mures. Rumania

A gyógy – és aromás növényekben gazdag, Lamiaceae családot pollenmorfológiai alapon Erdtman két alcsaládra, a Nepetoideae és Lamioideae alcsaládokra osztotta. A családra jellemző kémiai tulajdonságok, a magas illóolajtartalomú növények, az illóolajösszetétel, iridoidok jelenléte és hiánya, diterpének típusa (abietan, labdán vázas vegyületek) és az egyszerű triterpénkarbonsavak (oleanolsav, urzolsav), fenolos vegyületek, azaz a rozmarinsav és kávésav felhalmozódási jellegzetességei és a feniletanolidok előfordulása kerül megvitatásra. A két alcsaládban a vegyületcsoportok felhalmozódási különbségei az elemzés alapján inkább mennyiségi és kevésbé kizárólagos jellegűeknek mutatkoznak. A bemutatásra kerülő megállapításokat magyarországi, elsősorban szegedi vizsgálatokra támaszkodva igazolják a szerzők. A kutatócsoport által izolált új vegyületek, kémiai markerek felsorolása, utalás új rutin módszerek kidolgozására egészíti ki a kemotaxonómiai megállapításokat.

Keywords: Family Lamiaceae, chemotaxonomy, essential oils, iridoids, diterpenes, rosmarinic acid, caffeic acid, phenylethanoids, *Salvia*, *Stachys*, *Ballota*

In recent years herbal medicines have their renaissance. They have a rapidly developing economic significance which provides outstanding annual increase in income for many companies in both in Europe and in the USA. Just to mention one example, in the USA a dramatic increase can be observed in the herbs' market: between 1994 to 1996 the retail value of herbs has almost doubled, from \$1.6 billion to \$3.4 billion, more than half of it based upon 10 top herbs.[5] Though, Lamiaceae species are not among the most fashionable plants, their role as medicinal and aromatic plants, ingredients of herbal products is without any doubt of great value. Lamiaceae belongs to the plant families of the Carpathian basin, it is one of the richest families in medicinal and aromatic plants. This circumstance explains, beside some other practical reasons, why the representatives of this family have become the target of our investigations. The family has some 452 species (41 genera) in Europe [18] from among them, 90 species (32 genera) in Hungary [64] and 152 species (41 genera) in the Rumanian Flora [60]. Several representatives of the largest genera *Salvia* and *Stachys* are native in the Mediterranean. Some of them, cultivated in Hungary, are at or beyond the border of natural area. This point gives additional interest to their investigation, as, plants at the border of their area, under for them stranger environmental conditions may behave differently than under the natural conditions, in the centre of their area. We started our comparative chemotaxonomic studies on the family some twenty years ago. Ten years ago we summarized our contemporary results in a compilation.[38] Now, in this paper we focus on our newest results considering their taxonomic value in the Erdtman's systems of the family. Our researches in this field are too broad to cover all aspects, therefore, we have chosen the two, in species richest genera, *Salvia* [3,4] and *Stachys* and a small one *Ballota* as the basis of our discussion. Genera *Stachys* and *Ballota* belong to the subfam. Lamioideae and the *Salvia* to the subfam. Nepetoideae in Erdtman's two subfamilial classification. [10]

Although some of the Lamiaceae species like sage, thyme, lemon balm, mint, etc. have been used for several hundreds years and intensively studied for decades, we

cannot claim that they have been fully discovered, all their chemical ingredients would be known or all aspects of their efficacy could be explained and correlated with the known chemical profile of the plants. These circumstances unequivocally reason further investigations of any species also in the family Lamiaceae.

The family is divided by Bentham into 8 tribes, Briquet reformed it and arranged the genera into 8 subfamilies. Erdtman partly returned to Bentham's concepts, though he amalgamated Bentham's tribes into 2 subfamilies. In 1992 Cantino, Harley and Wagstaff created a new classification. Their 8 subfamilies are more or less equivalent with Bentham's 8 tribes and Erdtman' 2 subfamilies. [10,11]

Table 1. Central European Lamiaceae genera, classified by Cantino, Harley, Wagstaff (1992) in Erdtman's two subfamilial system

Subfam. Lamioideae	Subfam. Nepetoideae
Family Verbenaceae Teucrium L.	Tribe Lavanduleae Lavandula L.
Subfam. Ajugoideae Ajuga L.	Tribe Nepetae Agastache Gronov. Dracocephalum L. Nepeta L.
Subfam. Scutellarioideae Scutellaria L.	Tribe Ocimeae Ocimum L.
	Tribe Prunelleae Prunella L.
Subfam. Lamioideae Ballota L. Galeopsis L. (Galeopdolon Huds.) Lamium L. Leonurus L. Marrubium L. Molucella L. Phlomis L. Physostegia Benth. Sideritis L. Stachys L.	Tribe Mentheae (Acinos Mill.) Calamintha Mill. (Clinopodium L.) Glechoma L. Elsholtzia Wild. Hyssopus L. Melissa L. Mentha L. Monarda L. Origanum L. Perilla L. Rosmarinus L. Salvia L. Satureja L. Thymus L.

The main classifiers used pollen morphology as the basis of differentiation [59]. Erdtman's two subfamilial system is a well-accepted classification and simple enough to correlate the morphological characters of the taxa easily with their chemical features. Table 1 shows the places of genera native in Hungary in Erdtman's system. It has turned out that the species in the subfam. Lamioideae are rich in iridoids [10,31,73] but lack in rosmarinic acid [10,22,36]. The high essential oil containing species (according to Hegnauer [17] >0.5 % dry wt) are in the subfam. Nepetoideae [34,35,40-42] and the

species of which contain rosmarinic acid [10,13,31,73]. This special distribution of the mentioned and also the newly found ingredients could be regarded as rules which can orient both taxonomists and phytochemists and, in an indirect way, pharmacologists in their works with Lamiaceae species or with the drugs from these species. Some ten years ago we had found as a result of our studies that the chemical differences between the two subfamilies are rather quantitative than qualitative, with other words, the quantitative differences may be more characteristic of the subfamilies than the 'presence or absence' phenomenon [38,39]. In our present approach we reinvestigate the differences that were found by Contino and Sanders in order to confirm the earlier results and new chemical traits. In some cases we have tried to evaluate chemotaxonomically some plants that have never been investigated for those ingredients. Firstly, volatile monoterpenes and sesquiterpenes (essential oils), iridoids, then di-, triterpenes, some aromatic compounds, like caffeic-, rosmarinic acids, phenylethanoids and finally some other constituents will be discussed.

MATERIALS AND METHODS

Target plants were cultivated at Vácrátót, in the experimental field of the Institute of Ecology and Botany of the Hungarian Academy of Sciences, 30 km North of Budapest. Plants were grown mainly from seeds obtained via botanical garden seed exchange program, among others from Rumania. Sampling of plants was done at different times, very often regarding the organs separately. The volatile oils from freshly harvested or air-dried plants were obtained predominantly by steam distillation using a Clevenger-type apparatus, specified by Ph.Hg.VII. If the volatile oil was present in a small concentration in the plant, heptane or octane was used as an absorbing agent. GC/MS (Finnigan GCQ with MS detector and inbuilt database) and HP 8950 series II with FID detector were used, Kovats indices were calculated and several authentic samples helped the identification of constituents. [12, 29, 56]

Routine analyses of non volatile compounds i.e. iridoids [24,26], ursolic/oleanolic acids [15,16], caffeic and rosmarinic acids [22,25,16] were predominantly carried out by TLC/densitometry. Ursolic and oleanolic acids were also measured separately, after their silylation (derivatization), with gas chromatograph (HP 8950 series II. instrument). [27,28] The non-volatile components were isolated and their structure elucidation was carried out with NMR and MS techniques as it has been described in the particular papers referred to.

RESULTS

Essential oils

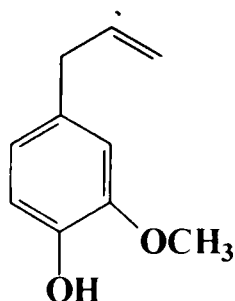
Lamiaceae essential oils contain predominantly mono- sesquiterpenes and partly phenylpropanoids. We have studied species from both subfamilies; from Lamioideae, like *Stachys* and from the Nepetoideae, as *Salvia*. The yield and composition of oils obviously depended to a large extent on the method that is used for preparing and thereafter analysing the samples. E.g., if the most modern extraction method the supercritical fluid extraction is used, more 'oil' fractions, often with remarkably different chemical composition can be obtained unlike in the classic water steam distillation [58]. More components could be identified, if GC/MS instruments with capillary columns were used than other methods, like e.g. TLC were used. In our conclusions we refer only to comparable data, obtained with similar methods.

Our earlier studies [38,40,41] were confirmed by newer data on *Stachys* species [56] namely that even if we can not obtain oil in measurable quantity, the volatile components though in very small concentration will be present in the steam distillates. The so called

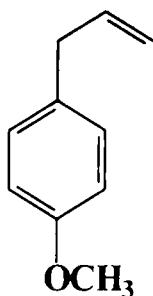
non volatile oil containing *Salvia* species, like *S. pratensis*, *S. transylvanica*, *S. verticillata*, *S. nemorosa* etc provided well measurable oils with linalool, nerol, geraniol etc. monoterpenes and β -caryophyllene, cubeben, etc. content. 132 out of 196 samples of 20 *Salvia* species we have investigated only 21 samples of 4 species were regarded essential oil rich species. The others, contain only in traces oil, and only in three samples we could not measure essential oils at all. [41] As far as *Stachys* species are concerned in all 11 taxa, each of them, had low volatile oil content were compared. *St. officinalis* yielded 38, *St. grandiflora* 24, *St. byzantina* 30, *St. germanica* 29, *St. sylvatica* 43 components. In each sample o-cymene, β -caryophyllene, δ -cadinene, α -cadinol etc. were present. The sesquiterpene fractions were higher content and consisted of more compounds than the monoterpene ones. Their oil components do not differ characteristically from the composition of the essential oil rich species. There exist low oil containing species like *Salvia nemorosa*, *S. pratensis*, *S. transylvanica*, etc. also in the genus *Salvia* which belongs to the high oil containing Nepetoideae subfamily. On the other hand among *Stachys* species of the subfam. Lamiodeae there exist species with volatile oils, some times in high [65] and in medium high concentration [65]. We have, studying some 11 species, identified some more than one hundred compounds in the low oil containing species. The difference between the high and low essential-oil containing taxa was that in the former the more volatile components e.g. monoterpenes dominated the oils while in the case of oil poor taxa the proportion of sesquiterpenes was higher. This seemingly holds true independently of the subfamilies.

As far as the composition of oils is concerned, the same monoterpenes, like linalool, limonene, camphor, α -pinen, β -pinene, etc. were found in the oils represented by the two subfamilies. Some oil constituents, however, concentrate to some smaller groups of taxa, e.g.: thujone can be found in significant concentration in *Salvia officinalis* in the subfam. Nepetoideae. This seems to be a phenomenon less dependent on the subfamily, as even in the closely related *Salvia* species of section *Salvia* of the *Salvia* genus like *S. tomentosa*, *S. ringens*, *S. lavandulifolia* its concentration is significantly lower than in *S. officinalis*, and what is more it lacks in *S. lavandulifolia* [12,39,41]. The sesquiterpene fractions are also different but in quantity. The high oil containing species produce more sesquiterpenes, but their relative content in comparison with the monoterpenes is less than in the case of the low volatile oil containing samples.

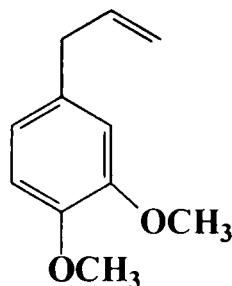
Two interesting findings should also be mentioned, regarding the oil composition: firstly, the aromatic oil components produced by the terpenoid biosynthetic pathway, like p-cymol, thymol, carvacrol and γ -terpinene are present in higher concentration in the genera *Thymus*, *Origanum*, *Monarda*, *Satureja*, *Hyptis*, *Thymbra*, *Schizonepeta*, *Zabaria* [35]. They all belong to the subfam. Nepetoideae and in its Mentheae tribe of Cantino-Harley-Wagstaff's system. The other interesting finding is that phenylpropanoids like eugenol (1), methyl chavicol (2), methyl eugenol (3), myristicin (4), elemicin (5) (Figure 1) accumulate in the genera *Agastache*, *Orthodon*, *Ocimum*, *Mosla*, *Perilla* [35]. In view of the literature, we dare not state that these compounds may not be present in other genera too, but their limited distribution is worth further consideration.



Eugenol (1)



Methyl cavicol (2)



Methyl eugenol (3)

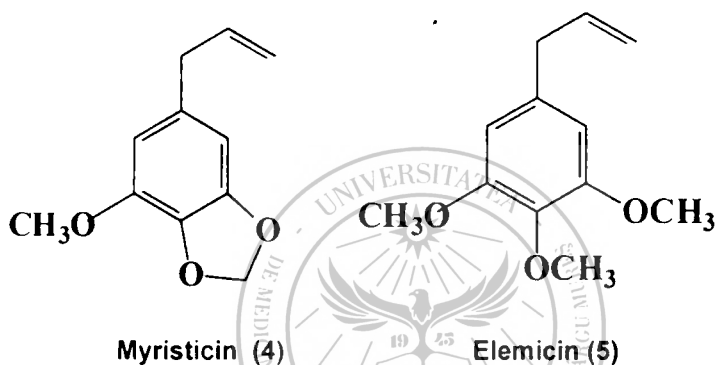
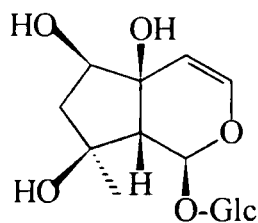


Figure 1. Phenylpropane derivatives

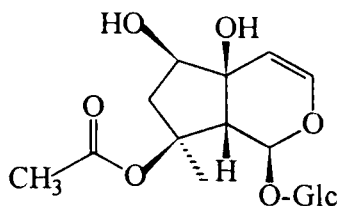
Iridoids

Iridoids are also characteristic compounds of Lamiaceae family but only of its Lamioideae subfamily. [8,10,14,15,31,37,73] They occur in many genera of this subfamily but not in the subfam. Nepeptideae, except the genus *Nepeta*, in which the nepetalactones are closely related to the iridoids [17]. Beside nepetalactones, 1,5,1,9-epideoxyloganin, 6'-O-methyl-, 4'-O-methyl-, 2'-O methyl-, 6'-O-methyl-1,5,9-epideoxyloganic acid from *Nepeta grandiflora* [47] and 1,5,9-epideoxyloganic acid, in *N. nuda*: 1,5,9-epi-7-deoxyloganic acid, 1,5,7,9-epi-loganin were isolated by Kocsis et al [29,30]. These findings are rather strong ones so that the *Nepeta* genus should be grouped somewhat separately from the other Nepetoideae species. Its ranking rests with botanists.

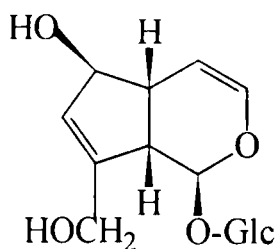
The occurrence of iridoids in the Lamioideae subfamily is not ubiquitous, either. no iridoids have been obtained either from *Ballota nigra* or *Marrubium vulgare*, in contrast with some data in the special literature. In the case of *Stachys* species, like *St. grandiflora*, *St. byzantina*, the iridoids harpagide (6), acetyl harpagide (7), aucubin (8), harpagoside (9) (Figure 2) were isolated. No iridoids were found in *St. annua*. [60, 64]



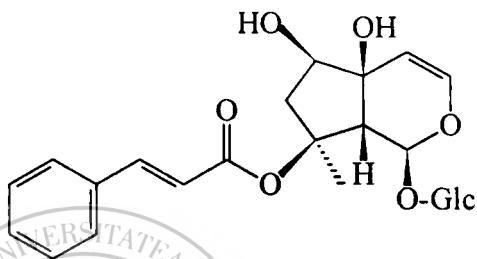
Harpagide (6)



Acetylharpagide (7)



Aucubin (8)



Harpagoside (9)

Figure 2. Iridoids from *Stachys* species

Physostegia virginiana is a typical species of the subfam. Lamioideae. From it 7-hydroxy-myoporozid, 8-O-acetyl-myoporozid, 8-O-acetylharpagid, prokumbid, 5 β -hydroxy-myoporosid, 5 β -hydroxy-8-O-acetyl-myoprosid, 10-deoxy-paulownioside were isolated [48,49]. Consequently, may the iridoids be dominant in the Lamioideae subfamily, not in all species they can be found. In the subfam. Nepetoideae we have not found iridoids at all.

Diterpenes

A great number of diterpenes have been isolated from both subfamilies of the family Lamiaceae. From the roots of 6 *Salvia* species tanshinone I, tanshinone 2A, from *S. aerea*, *S. constanea*, *S. trijuga*, and from *S. yunnanensis* were isolated, additionally from the first two species cryptotanshinone, dihydrotanshinone. Przewaquinone A and B were isolated from *S. constanea*. *S. argentea* provided ferruginol, aethiopinine, 1-keto-aethiopinine, salvipisone and 2,3-dehydrosalvipisone [69]. In *S. nutans* root 12-deoxyroyleanons: 13-deoxy-6,7-dehydroroyleanone, 12-deoxy-7,7-dimethoxy-6-ketoroyleanone, 12-deoxy-6-hydroxy-6,7-dehydroroyleanone as new compounds were identified beside the known 4 compounds.[46]

S. officinalis was also the target of our diterpene studies. In the above-ground parts of the plant methyl carnosate, rosmanol methylether, sageone were identified. [20] From *S. glutinosa* 15 compounds were obtained; 2 of them i.e. 12-deoxydanshenxinkun B and dihydroisotanshinone II proved to be new compounds. *S. austriaca*, *S. tomentosa*, *S. verticillata* yielded 7 α -acetoxyroyleane and 7 α -hydroxyroyleane. In addition to them the known 6,7-dehydroxyroyleanone and royleanone were isolated. [44,45]

Salvia candelabrum yielded 5 new compounds: candelalvoquinone (10), candelabroquinone (11), 12-O-methylcandesalvone (12), candelalvone B methyl ester (13) and candelabrone (14). [19,23]. All the isolated compounds have abietane skeleton (Figure 3)

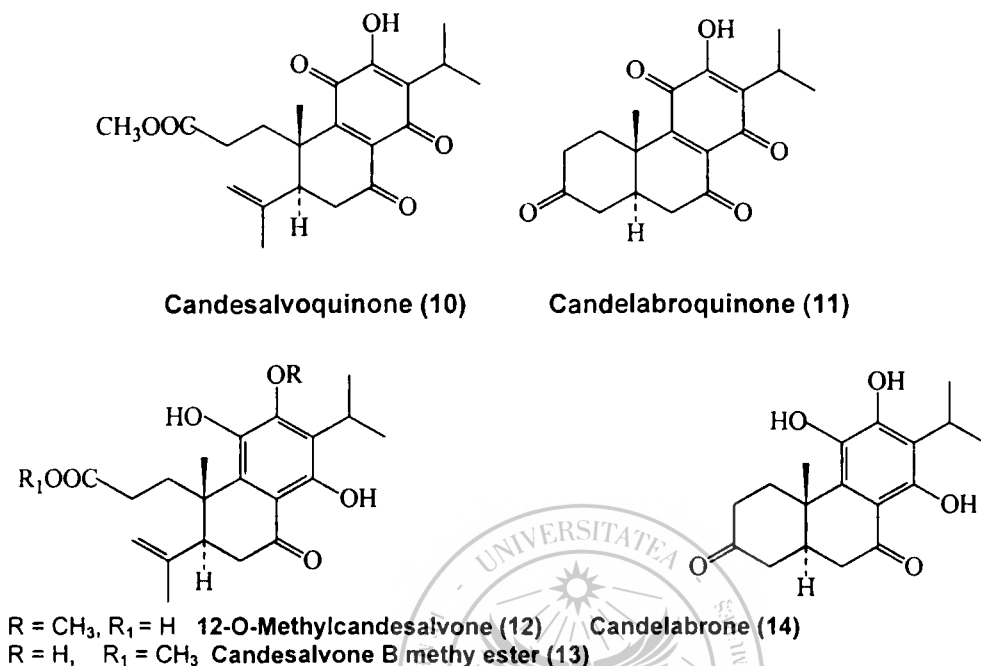


Figure 3. Diterpenes from *Salvia candelabrum*

On *Ballota nigra* 18-hydroxyballonigrine [7] and on *Stachys* species *St. plumose*, 6-deoxyandalusol, 13-epijabugodiol were reported. [52] These genera, like *Marrubium* belong to the subfam. Lamiioideae and contain mainly diterpenes of labdane unlikely to Nepetoideae plants where the compounds of abietane type seem to be dominant. In the subfam. Lamiioideae labdane derivatives, like marrubiin in *Marrubium vulgare* and *Ballota nigra* are the main diterpenes. [63] Recently, however, we have isolated a diterpene which no doubt is of royleanone skeleton (royleanone is a subgroup of abietans) from *Ballota nigra*. A compilation on the chemistry of *Ballota* genus has revealed that only 23 diterpenes, all furanolabdans, like marrubiin and their derivatives had been isolated from the *Ballota* genus containing 33 species. [63]

Consequently our royleanone type compound is the first such abietane diterpene, isolated from the *Ballota* genus. If there were such type of compounds present in other species of subfam. Lamiioideae, their distribution is no doubt much more limited than their occurrence in the subfam. Nepetoideae. In the subfam. Nepetoideae among others in its largest genus, in *Salvia*, compounds with labdane structure occur (e.g. sclareol in *Salvia sclarea*). [57,61]

Triterpenes

Triterpenes are rather common compounds in the plant kingdom including Lamiaceae family. They occur both in the form of saponines and free form, as aglycones. Oleanane and ursane type of triterpenes are abundant in the Lamiaceae family.

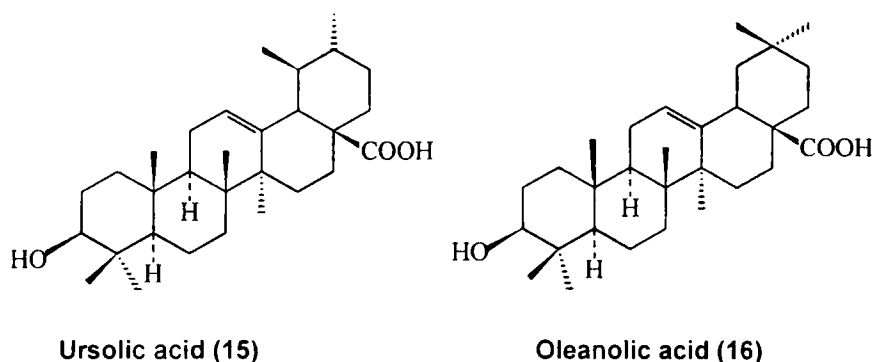
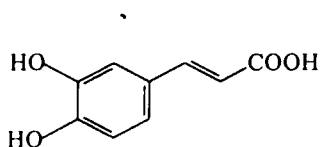


Figure 4. Triterpene acids from the Family Lamiaceae

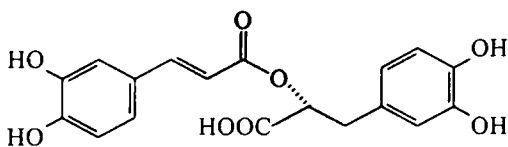
Ursolic (15) and oleanolic (16) acids (Figure 4) were isolated a long time ago predominantly from the representatives of subfamily Nepetoideae. We recognised [39] that in the quantity of these compounds significant differences can be found. As the chromatographic (TLC) separation of these compounds (ursolic and oleanolic acids) is rather difficult, if great number of samples of plants wanted to be studied, a simple and quick method had to be elaborated [24,26]. We have succeeded in elaborating a TLC densitometric method which could be used for measuring the two compounds together. On the basis of a large number of samples we could establish that the ursolic+oleanolic compounds are in much higher concentrations in the Nepetoideae species than in the Lamioideae. [41] In recent years Janicsák [28] elaborated a GC method, based upon silylation of the purified compounds for making them available for GC separation. It has turned out that in almost all cases ursolic acid dominated the mixtures of the two compounds. Oleanolic acid was present in a lower concentration [27]. Both compounds were more frequently in the subfamily Nepetoideae. These experiments not only have confirmed our earlier observations but helped us in getting more information about the distribution of individual compounds. Now we know that both compounds are present in higher concentration in the Nepetoideae species. The differences are predominantly quantitative in their character.

Caffeic (17) and rosmarinic (18) acids

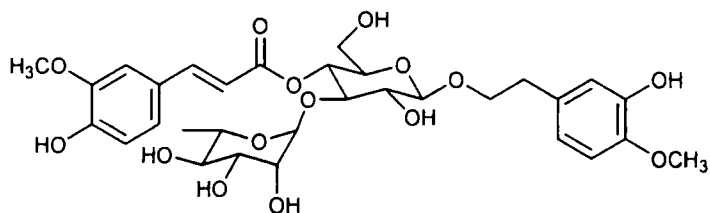
Caffeic, rosmarinic and chlorogenic acids have been known in the Lamiaceae family for a long time. Rosmarinic acid is abundant in the Nepetoideae subfamily but has not been described from the Lamioideae. Caffeic and chlorogenic acids occur in both subfamilies. [25,36,43,73] We carried out a wide range of investigations on the distribution of rosmarinic and caffeic acids. As a result of some hundred analyses we have confirmed their typical distribution pattern: namely, caffeic acid occurs in both subfamilies. Its concentration has proved very low, almost an order of magnitude less than the concentration of rosmarinic acid. Rosmarinic acid has been detected only in the Nepetoideae subfamily. [10,22,41,26] We have not found rosmarinic acid in the genera of Lamioideae subfamily, if we used only TLC/densitometric measurement. More sophisticated methods can however prove its presence in more species, like it was found in *Stachys macrantha*. [70] It seems to us that the segregation of rosmarinic acid may not be so strict as it has been stated by the scientific literature.



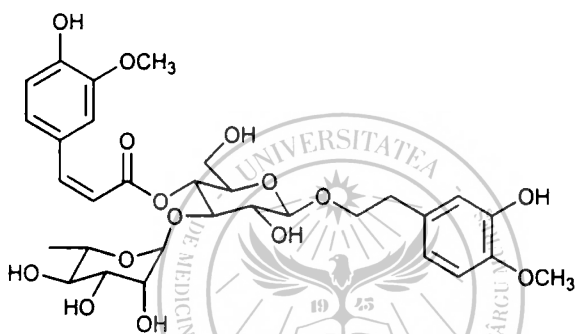
Caffeic acid (17)



Rosmarinic acid (18)



E-martinozid (19)



Z-martinozid (20)

Figure 5. Caffeic acid and its derivatives

Miscellaneous compounds

Phenylethanoid glycosides are of significance in the antioxidant effects of several drugs. They are present in plenty of Lamiaceae species. On the basis of scientific literature they occur in the representatives of subfamily Lamioideae, like *Stachys* [8], *Ballota*, [63], etc. species. In *Ballota nigra*, e.g.: forsythoside, verbascoside, arenaroside, ballotetraoside, alyssonoside, lavandulifolioside and angoroside were isolated. [63]. In the subfam. Lamioideae plenty of papers have been published about their occurrence but not in the species of subfam. Nepetoideae. We have isolated martynoside (19,30), though in a very low concentration, from *Salvia officinalis* [20]. No publication has been found about the presence of phenylethanoid glycosides in the species of subfam. Nepetoideae.

We have already published our results on the betaines and β -ecdysone tests. Among the betaines, prolinbetaine, 4-hydroxyprolinbetaines, glycinbetaine, trigonelline only choline was found in all species. Stachydrine and hydroxystachydrine were found only in the species of subfam. Lamioideae. [6] In a series of preliminary investigation β -ecdysone has not been found in either Lamioideae or Nepetoideae subfamilies.[41] *Ajuga* species were studied for ecdysteroids [71]. *Ajuga*, however, has been recently transferred from

subfam Lamioideae to subfam. Ajugoideae according to Cantino, Harley, Wagstaff's classification [9]

DISCUSSION

The morphological differences of pollens of Lamiaceae species [1] provide the bases of classification of Lamiaceae family. Bentham (1876) introduced a system of 8 Tribes than Briquet revised (1895-1897) it and divided it into 8 subfamilies which in part follows Bentham's system. Erdtman (1984) created a two subfamilial system, which is more or less adequate with the Bentham's classification. We follow the Erdtman's system which is the 'simplest' and corresponds to the newest Cantino, Harley, Wagstaff's classification. At least in its main features, it is in accordance with both Bentham's and Erdtman's ones. Several authors have summarized their analytical results according to the taxonomic position of plants. The particular data have been gathered and summarized in Cantino-Sander's frequently cited paper.[10] It has turned out that - in brief - the plants with tricolpate pollen belonging to Erdtman's Laminoideae subfamily, have iridoid content, comprise no high essential oil containing species, no rosmarinic acid occurs, while the plants with hexacolpate pollens (subfamily Nepetoideae) provide the high volatile oil, and rosmarinic acid containing genera. In this subfamily no iridoids have been found. Our broad studies on Lamiaceae species have proved that the free triterpene acids, characteristic of the family [16,17] have also taxonomic value. We can draw the conclusion that the chemical differences between Erdtman's two subfamilies really exist but they are not exclusive but rather quantitative in their character. It holds true, as our present paper suggests, of the volatile oil content, the iridoids, diterpenes, triterpenes, phenylethanoids, etc. As little work was carried out at our institute on flavonoids and other phenolic compounds we have not dealt with them, though we are aware of their biological importance. Recent years the comparative chemical works are completed with biological assays and more and more adequate information on the chemical ingredients of plants and their biological effects is available. The discussion of this very important aspect is, however, beyond our present compilation.

Besides the ingredients we have concentrated to, a lot of works on flavonoids [51,55,66,68], and other cinnamic acid derivatives [32,33], polyphenolics [70], predominantly as antioxydants [13,62,73] or as sources of biologically active ingredients [50,71] have been published and often they are discussed as chemotaxonomic markers. [2,54,68]

As far as the application of these plants concerned, the picture is rather divers. E.g. *Salvia officinalis* and its close relatives enjoy reputation for being panacea. Sage is recommended for more than 100 indications [1]. Experimental works need to confirm the rightness of these indications. Antibacterial, fungistatic, virustatic, astringent, secretion-promoting and perspiration-inhibiting effects are proved. It is used for gargle, rinses and other topical application, in the case of inflammations of the mucous membranes, dyspeptic symptoms is recommended. [2, 61] Its antioxydant effect is used, among others, for food preservation. This effect belongs to the most intensively studied phenomenon in the case of Lamiaceae species. [13,21,23]

ACKNOWLEDGEMENT

We express our deepest thanks for the botanical identifications and collection of plants to the late Dr. Miklóssy Vári Vilmos. We are also thankful to the OTKA Hungarian National Grant (OTKA T43148) for its financial support.

REFERENCES

1. ABU-ASAB MS, CANTINO PD - *Pollen Morphology in Subfamily Lamioideae (Labiatae) and its Phylogenetic Implications*. In: Harley RM, Reynolds (eds): *Advances in Labiate Science*, The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK., Whitstable Litho LTD., Whitstable, Kent U.K. 1992, 97-112.
2. ADZET T, CANIGUERAL S, IGLESIAS J - *A Chromatographic Survey of Polyphenols from Salvia Species*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 1983, 16:29-32
3. ALIZAR G - *Catalogue Synonymique des Salvia du Monde. (Lamiaceae) VI.*, *Biocosme Méditerranéen*, Nice, 1993, 10(3-4):33-117.
4. ALIZAR G - *Catalogue Synonymique des Salvia du Monde. (Lamiaceae) V.*, *Biocosme Méditerranéen*, Nice, 1992, 9:413-497.
5. BLUMENTHAL M - *The Complete guide to Commission E Monographs, Therapeutic guide to herbal medicines*, American Botanical Council, Austin, Texas, 1999.
6. BLUNDEN G, PATEL A, YUAN ZH et al - *Betaine distribution in the Labiatae*, *Proceedings of the 3rd International Conference on Role of formaldehyde in biological systems*, (Sopron, 18-22 May, 1992) 1992, 188-193.
7. BRUNO M, BONDI ML, PIOZZI F et al - *Occurrence of 18-hydroxyballonigrine in Ballota saxatilis ssp. Saxatilis from Lebanon*. *Biochemical systematics and ecology* 2001, 29:429-431
8. CALIS I, BASARAN AA, SARACOGU I et al - *Iridoid and phenylpropanoid glycosides from Stachys macrantha*, *Phytochemistry*, 1992, 31:167-169
9. CANTINO PD, HARLEY RM, WAGSTAFF SJ - *Genera of Labiatae: Status and Classification*, In: Harley R.M., Reynolds T. (eds): *Advances in Labiate Science*, The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK., Whitstable Litho LTD., Whitstable, Kent U.K., 1992, 511-522.
10. CANTINO PD, SANDERS RW - *Subfamilial Classification of Labiatae*, *Systematic Botany*, 1986, 11(1):168-185.
11. CANTINO PD - *Toward a Phylogenetic Classification of the Labiatae*, In: Harley R.M., Reynolds T. (eds): *Advances in Labiate Science*, The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK., Whitstable Litho LTD., Whitstable, Kent U.K., 1992, 27-37.
12. DOBOS Á, NAGY G, GENOVA EM et al - *Comparative Analysis of Salvia officinalis and Salvia tomentosa Essential Oils*, in Franz Ch, Máthé Á, Buchbauer G (eds): *Essential Oils: Basic and Applied Research. Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils*. Allured Publishing Corp. Vienna, 1997, 241-243.
13. HÁZNAGY-RADNAI E, CZIGLE SZ, ZUPKO I et al - *Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six Stachys species*, *Fitoterapia*, 2006, 77:521-524.
14. HÁZNAGY-RADNAI E, LÉBER P, TÓTH E et al - *Determination of Stachys palustris iridoids by combined chromatographic methods*, *Proceedings of the Int. Symp. On Planar Separations* (Visegrád, 2004, 23-25 May) 2004, 369-378.
15. HÁZNAGY-RADNAI R, CZIGLE SZ, JANICSÁK G et al - *Iridoids of Stachys species growing in Hungary*, *J. Planar Chromatography* 2006, 19:187-190.
16. HEGNAUER R - *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, 1989, 8:579-631.
17. HEGNAUER R, - *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, 1966, 4:290-346.
18. HEYWOOD VH, RICHARDSON I BK (eds) - *Labiatae in Flora Europea*, Cambridge Univ. Press, 1972, 3:126-192.
19. HOHMANN J, JANICSÁK G, FORGÓ P et al - *New Diterpenoids from the Aerial Parts of Salvia candelabrum*, *Planta Med.* 2003, 69:254-257.

20. HOHMANN J, RÉDEI D, MÁTHÉ I et al - *Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from Salvia officinalis*, Biochemical Systematics and Ecology, 2003, 31:427-429.
21. HOHMANN J, ZUPKÓ I, RÉDEI D et al - *Effects of the Aerial Parts of Salvia officinalis, Melissa officinalis, and Lavandula angustifolia and their Constituents against Enzyme-Dependent and Enzym-Independent Lipid Peroxidation*, Planta Med. 1999, 65:576-578.
22. JANICSÁK G, MÁTHÉ I - *Parallel determination of Rosmarinic and Caffeic Acids by TLC-Densitometry*, Chromatographia, 1997, 46:322-324.
23. JANICSÁK G, HOHMANN J, ZUPKÓ I et al - *Diterpenes from the Aerial Parts of Salvia candelabrum and their Protective Effects against Lipid Peroxidation*, Planta Med. 2003, 69:1156-1159.
24. JANICSÁK G, MÁTHÉ I - *Denzitometria alkalmazása néhány vegyület mennyiségi értékelésére*, „Gyógynövények Kutatása és Felhasználása '95" 9. Magyar Gyógynövény, 4. Magyar Fitoterápiás Konferencia, Szeged, 1995. okt. 18-20. P-53 p.50.
25. JANICSÁK G, MÁTHÉ I, MIKLÓSSY-VARI V et al - *Comparative Studies of rosmarinic and caffeic acid content of Lamiaceae species*, Biochemical Systematics and Ecology, 1999, 27:733-738.
26. JANICSÁK G, MIKLÓSSY VV, MÁTHÉ I - *Hazai Salvia fajok összehasonlító denzitometriás vizsgálata*, Gyógyszerészet. 1996, 40:329.
27. JANICSÁK G, VERES K, KAKASY AZ - *Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae*, Biochemical Systematics and Ecology, 2006, 34:392-396.
28. JANICSÁK G, VERES K, KÁLLAI M et al - *Gas chromatographic method for routine determination of oleanolic and ursolic acids in medicinal plants*, Chromatographia, 2003, 58:295-299.
29. KOCIS Á, NAGY T, MORVAI M et al - *Új iridoidok izolálása a Lamiaceae családból*. Gyógyszerészet. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus X. (Budapest, 196. máj 15-17) Előadásösszefoglalók 1996, 32.
30. KOCIS Á, SZABÓ L, PODÁNYI B et al - *Újabb iridoid glikozidok izolálása a Lamiaceae családból*, Magyar Kémikusok Egyesülete Vegyészkonferencia. Előadásösszefoglalók (Kaposvár, 1993 július 5-7.), 1993, 30.
31. KOOLMAN P. - *The Occurrence of Iridoid Glycosides in the Labiatae*. Acta Bot. Neerl., 1972, 21(4):417-427.
32. LAMAISSON JL, PETITJEAN C, DUKE JA et al - *Hydroxycinnamic Derivative Levels and Antioxidant Activity in North American Lamiaceae*, Plantes médicinales et phytothérapie 1993, 26:143-148.
33. LAMAISSON JL, PETITJEAN-FREYET C, CARNAT A - *Lamiacées médicinales á antioxydantes, sources potentielles d'acide rosmarinique*, Pharm. Acta Helv, 1991, 66:185-188.
34. LANGER R, MECHTLER CH, JURENITSCH J - *Composition of the Essential Oils of Commercial Samples of Salvia officinalis L., and S. fruticosa Miller: A Comparison of Oils Obtained by Extraction and Steam Distillation*, Biotechnical Analysis, 1996, 7:289-293.
35. LAWRENCE BM - *Chemical Components of Labiatae Oils and Their exploitation*, In: Harley R.M., Reynolds T. (eds): Advances in Labiate Science, The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK., Whitstable Litho LTD., Whitstable, Kent UK 1992, 399-436.
36. LITVINENKO VI, POPOVA TP, SIMONJAN AV et al - *„Gerbstoffe“ und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiatae*, Planta Med, 1975, 27:372-380.

37. MASS HI - *Labiatae*, in Mansfelds R. (eds): Kulturpflanzen Verzeichis. Akademie-Verlag, Berlin, 1986, 1127-1178.
38. MÁTHÉ I – *Some aspects of recent researches on Lamiaceae species in Hungary*, Archiv za Farmaciju, 1997, 47:395-404.
39. MÁTHÉ I, HÁZNAGYNE-RADNAI E, GENOVA E et al - *A Salvia officinalis és a S. tomentosa illóolajának stabilitásvizsgálata különös tekintettel a tujontartalomra*, Elvásztástudományi Vándorgyűlés, (Hévíz, 2004. szept. 22-24.) Végleges program Előadás – és poszterkivonatok, 2004, P-33.
40. MÁTHÉ I, NAGY G, DOBOS Á et al - *Comparative Studies of the Essential Oils of some Species of Sect. Salvia*, in. Franz Ch, Máthé Á, Buchbauer G. (eds): Essential Oils: Basic and Applied Research. Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils. Allured Publishing Corp. Vienna, 1997, 244-247.
41. MÁTHÉ IJR, MIKLÓSI VV, MÁTHÉ Á et al - *Essential Oil Content as chemotaxonomic marker for the genus Salvia with reference to its variation in Salvia officinalis L*, Acta Horticulturae 1993, 330:123-131.
42. MÁTHÉ IJR, OLÁH L, MÁTHÉ Á et al - *Changes in the Essential Oil Production of Salvia officinalis under Climatic Conditions of the Temperate Belt*, Planta Med, Supplement, 1992, 58: A 680.
43. MOLGAARD P, RAVN H - *Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons*, Phytochemistry, 1988, 27:2411-2421.
44. NAGY G, DOBOS Á, GÜNTHER G et al – *Abietane diterpenoids from the roots of Salvia pratensis*, Planta Med, 1998, 64:288-289.
45. NAGY G, GÜNTHER G, MÁTHÉ I - *Diterpenoids from Salvia glutinosa, S. austriaca, S. tomentosa and S. verticillata roots*, Phytochemistry, 1999, 52:1105-1109.
46. NAGY G, GÜNTHER G, MÁTHÉ I et al – *12-Deoxy-6,7-dehydroroleanone, 12-deoxy—hydroxy-6,7-dehydroroleanone and 12-deoxy-7,7-dimethoxy-6-ketoroleanone from Salvia nutans roots*, Phytochemistry, 1999, 51:809-812.
47. NAGY T, KOCSIS Á, MORVAI et al – *New 2', 4'- and 6'-o substituted 1,5,9-epideoxyloganic acids from Nepeta grandiflora*, Phytochemistry, 1998, 47:1067-1072.
48. NAGY T, KOCSIS Á, MORVAI M et al – *A Physostegia virginiana L. iridoidjainak izolálása és szerkezetvizsgálata*, Magyar Kémikusok Egyesülete Vegyészkonferencia Előadásösszefoglalók (Debrecen, 1995, aug. 29-31) 1995, 126
49. NAGY T, KOCSIS Á, MORVAI M et al - *Új 9 szénatomos iridoidglikozidok izolálása és szerkezetvizsgálata*, Magyar Kémikusok Egyesülete Vegyészkonferencia Előadásösszefoglalók (Siófok, 1997, szept. 1-3) 1997, 112.
50. NAHRSTEDT A, ALBRECHT M, WRAY V et al - *Structures of Compounds with Antigonadotropic Activity Obtained by in vitro Oxidation of Caffeic Acid*, Planta Med. 1990, 56:395-398.
51. NIKOLOVA M, JANICSÁK G, GENOVA E et al - *Comparative Analysis of External Flavonoids of Bulgarian and Hungaria Samples of Salvia Species*, Acta Botanica Hungarica, 2006, 48:361-367
52. PATERNOSTRO MP, MAGGIO AM, PIOZZI F et al – *Labdane diterpenes from Stachys plumosa*, J. Nat. Prod, 2000, 63:1166-1167.
53. PATUDIN A, ROMANOWA A, SOKOLOV et al - *Das Vorkommen von Phenantrenchinonen in Arten der Gattung Salvia*, Planta Med, 1974, 26:201-207.
54. PEDERSEN J - *Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy*, Biochemical systematics and ecolgy, 2000, 28:229-253.
55. PIETTA PG, - *Flavonoids as antioxidants*, J.Nat.Prod, 2000, 63:1035-1042.

56. RADNAI E, DOBOS Á, VERES K et al - *Essential oils in some Stachys species growing in Hungary*, Acta Horticulturae 597:37-141.
57. RODRIGEZ-HAHN L, ESQUIVEL B, CÁRDENAS J - *The distribution of Diterpenes in Salvia*, In Harley R.M., Reynolds T. (eds): Advances in Labiate Science, The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surres, UK., Whitstable Litho LTD., Whitstable, Kent UK, 1992, 335-347.
58. RÓNYAI E, SIMÁNDI B, THEN M et al – *Supercritical fluid extraction of clary sage and study of sclareol and element content in parts of plant*, in. Franz Ch, Máthé Á, Buchbauer G. (eds): Essential Oils: Basic and Applied Research. Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils. Allured Publishing Corp. Vienna, 1997, 152-156.
59. RYDING O. - *The distribution and Evolution of Myxocarp in Lamiaceae*, In Harley R.M., Reynolds T. (eds): Advances in Labiate Science, The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surres, UK, Whitstable Litho LTD, Whitstable, Kent UK, 1992, 85-96
60. SÁVULESCU T, NYÁRÁDY EI (eds.) - *Flora Republicii Populare Romîne*, Editura Academiei Republicii Populare Romîne, 1952-1972, 8:87-394.
61. SCHILCHER H, KAMMERER S - *Leitfaden Phytotherapie*, Urban und Fischer, München-Jena, 2000, 966.
62. SCHWARZ K, TERNES W, SCHMAUDERER E - *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis*, Z. Lebensm. Forsch. 1992, 195:104-107.
63. SEIDEL V, BAILLEU F, TILLEQUIN F – *Terpenoids and phenolics in the genus Ballota L. (Lamiaceae)*, Recent Res. Devel. Phytochem, 1999, 3:27-39.
64. SIMON T – *A magyarországi edényes flóra határozója*, Tankönyvkiadó, Budapest, 1992, 343-369.
65. SKALTSA HD, DEMETZOS C, LAZARI C et al - *Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece*, Phytochemistry, 2003, 64:743-752.
66. TOMÁS-BARBERÁN FA - *The Flavonoid Compounds from Labiateae*, Fitoterapia, 1986, 57:67-95
67. TOMÁS-BARBERÁN FA, GIL MI - *Chemistry and Natural Distribution of Flavonoids in the Labiate*, In Harley R.M., Reynolds T. (eds.) Advances in Labiate Science, The Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surres, UK, Whitstable Litho LTD, Whitstable, Kent UK, 1992, 299-305.
68. TOMÁS-BARBERÁN FA, GRAYER-BARKMEIJER RJ, GIL MI et al - *Distribution of 6-Hydroxy-, 6-Methoxy- and 8-Hydroxyflavonon Glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and Related Families*, Phytochemistry, 1988, 27:2631-2645.
69. YANG MH, BUNDEN G, XU YX et al - *Diterpenoids from Salvia Species*, Pharmaceutical Sciences 1996, 2:69-71.
70. YINRONG L, YEAP F - *Polyphenolics of Salvia*, Phytochemistry, 2002, 59:117-140.
71. YINRONG L, YEAP FL - *Rosmarinic acid derivatives from Salvia officinalis*, Phytochemistry, 1999, 51:91-94.
72. ZOZ IH, LITVINENKO VI - *On the Division of the Family Lamiaceae Juss. Into Natural Groups*, Framachestisevski J, 1979, 64:989-997.
73. ZUPKÓ I, HOHMANN J, RÉDEI D et al - *Antioxydant Activity of Leaves of Salvia Species in Enzym-Dependent and Enzyme-Independent Systems of Lipid Peroxidation and their Phenolic Constituents*, Planta Med, 2001, 67:366-368.

Lithium and rubidium in the food chain, intake by man, essentiality and toxicity

Manfred Anke, Ljubomir Angelow, Winfried Arnhold, Ralf Müller¹⁾, Ulrich Schäfer

Institute of Nutrition and Environment, Faculty of Biology and Pharmacy, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Str. 24, D-07743 Jena, Germany; ¹⁾ Society of Ecology and Environmental Chemistry, Zittauer Str. 27, D-99091 Erfurt, Germany

The importance of lithium (Li) and rubidium (Rb) as a psychopharmaca where examined in the seventies of the last century. Up to now, the role of lithium in the psychopathology and industry is well known, but there is no application of rubidium in medicine and industry. The reasons for this development are unfamiliar. Presence and responsibility of both alkali elements in the food chain, their essentiality, biological, nutritional and toxicological importance were compared and depicted.

On average, the Earth's 16 km thick crust contains about 60 mg lithium and 310 mg rubidium/kg. Thus, lithium ranks 27th and rubidium 17th in the frequency list of elements. Rubidium consists of one stable (72.2%) and one radioactive isotope (27.8%). The geological origin of the soil is reflected by its lithium and rubidium contents of the flora. The vegetation of slate, Keuper and gneiss weathering soils is rich in lithium, whereas the vegetation growing on gneiss, granite and Rotliegende weathering soils is rich in rubidium. Moor, peat, boulder clay and alluvial riverside soils transfer only half as much lithium to plants, compared to slate, Keuper and gneiss. Extremely poor in rubidium is the vegetation on Triassic weathering soils (Bunter, Muschelkalk, Keuper weathering soils, diluvial sands).

According to present knowledge, lithium and rubidium are not essential for plants. The lithium and rubidium contents of the vegetation are species-specific, and influenced by the lithium offer of the biotope. The lithium content in feed and foodstuffs varies between < 1 mg/kg dry matter (DM) in oats, bread and bananas, 7 mg/kg DM in tomatoes and 17 mg/kg DM in lettuce. The rubidium amount in food fluctuates between 1 mg/kg DM in bread and wheat flour, 5 to 20 mg/kg DM in potatoes, lettuce, cabbage and cucumber and 70 mg/kg DM in asparagus. The lithium and rubidium contents of the drinking water in Germany are extremely influenced by the geological origin of the source, varying between 4 and 60 µg Li/L and 3 and 18 µg Rb/L. The lithium and rubidium contents of beverages are subject to the most considerable variations (beer 100 – 150 µg Li/L, red wine 120 µg Li/L and 650 µg Rb/L, coffee 440 µg Rb/L).

Vertebral animals represented by mice, voles and shrews incorporate 6 to 7 mg Li/kg body DM and 9 mg Rb/kg body DM, whereas predatory carnivorous shrew species accumulate less rubidium (4 – 5 mg/kg body DM) in their bodies. The lithium status of animals is best reflected by their blood serum, hair and milk, whereas cerebrum, milk and ovary are good indicators of the rubidium status.

Both elements are essential for animals (and man), although their biochemical function in vital components of the body is not known. Lithium- and rubidium-poor nutrition lowers the feed intake of goats by about > 10%, decreases the intrauterine and postnatal growth by about > 10 % and disturbs the reproductive performance. Lithium deficiency lowers the conception rate, increases the abortion rate by 14% and changes the sex ratio of the kids in favour of females. A rubidium-poor nutrition increases the abortion rate by 80%, decreases the progesterone level of the blood plasma by 7% of the normal amount and lowers the estradiol concentration of the blood plasma. It seems that the pregnancy-preserving properties of progesterone are dependent upon a normal rubidium status.

The lithium and rubidium contents of animal foodstuffs vary between 1.2 mg Li/kg DM and 15 to 22 mg Rb/kg DM in broiler meat, 3.4 mg Li/kg DM and 6.8 mg Rb/kg DM in beef, 9.0 mg Li/kg DM and 6.0 mg Rb/kg DM in eggs, and 10 mg Li/kg DM and 9.1 mg Rb/kg DM in cow's milk. The lithium intake by women and men with mixed diet in Germany amounted to 700 and 1000 µg/day, and that of rubidium to 1350 and 1500 µg/day, respectively, on the average of a week. People who get their drinking water from granite and gneiss areas consume 2000 µg Rb/day.

The postulated normative lithium and rubidium requirements amount to 2.5 mg Li/kg DM in animals and < 200 µg Li/day in man and to > 300 to 400 µg Rb/kg feed DM in animals and < 100 µg Rb/day in man. The

lithium content of foodstuffs and beverages meets the assumed requirement of the European fauna as well as of European humans.

Broiler, hens pigs and fattening bulls with a supplementation of 100 mg Li/kg ratio DM gained significantly less weight, hens laid 14% fewer eggs, pigs supplemented with 500 mg/kg Li feed DM had an enormous water consumption and fattening bulls significantly decreased in aggressiveness and sexual activity and increased in adipose deposition. These findings are important in the context of lithium therapy for patients with manic depression insofar as they illustrate the need to minimize the lithium dose. The danger of rubidium exposure caused by geological or anthropogenic anomalies hardly exists.

Similar to lithium, the importance of rubidium as a psychopharmaca was experimentally examined and discussed in the seventies of the last century. In the beginning, only the antimanic effect of rubidium in manic depressive patient was checked. Later on, schizophrenic patients were successful treated with 0.2 to 2 g Rb/day (Dunner et al. 1974, Ribas et al. 1979, Acobetto et al. 1979, Betts et al. 1978, Jenner et al. 1983). A practical importance of rubidium is today not given, although oral intakes are, also in high amount are undangerous (Spirtes and Garey 1975). Rubidium enter quickly the brain (Messiha and Larson 1976).

The effect of rubidium was also experimentally examined in alcoholism (Messiha and Larson 1976), opiat-dependence (Carrol and Sharp 1971, Sanghvi and Gershon 1973).

Animal experimental examination demonstrated, that rubidium the movement activity and curiosity of rats decreased (Syme and Syme 1979). Rubidium throttle the aggressivity of individual hold male rats. This effect was not registered in groups of male rats (Weischer 1979).

In summary, rubidium did not prove its worth as a psychopharmaca. The reasons for this effect were in literature not discussed. In last time the biological and nutritional importance of rubidium increased. The significance of both alkali elements in the food chain of plants, animals and man were depicted, their essentiality and toxicity and their importance for healthy development demonstrated.

MATERIAL AND METHODS

All analysed samples were dried at 105°C and ashed at 450°C. Both alkali elements were estimated with atomic absorption spectroscopy (AAS) and standard addition procedure (SAP) (Angelow 1994). Accuracy of the measurement was examined with the reference materials bush twigs and leaves (GBW07602) and total diet reference material (ARC(CI) (Kumpulainen and Tahvonon 1990).

The "essentiality" of the ultra trace elements lithium and rubidium was examined in goats (Figure 1). Besides the use of synthetic feeds and intrauterine depletion over generations, the animal species selected for the study is important. The use of ruminant species (goats) has allowed researchers to substitute chemically pure urea for a significant proportion of trace element-containing proteins. Furthermore, an intrauterine depletion over three and more generations of an animal species has been shown to be highly effective in discovering the essentiality of several elements (Anke 2004b).

An essential element is one that is required to support adequate growth, reproduction and health throughout the life cycle if all other nutrients are optimal. Besides the deficiency group, every mineral deficiency experiment needs a control group with identical conditions, feed, and the element tested. In addition, the animals should live to their natural death.

The synthetic feed, when tested for the essentiality of one element, must be supplemented with all elements contained in the normal feed of the animals. The synthetic feed of the ruminants (goats), in addition to cellulose in the form of purified paper (which was used as litter and nutrient), contained all essential nutrients and all mineral elements present in the normal feed.

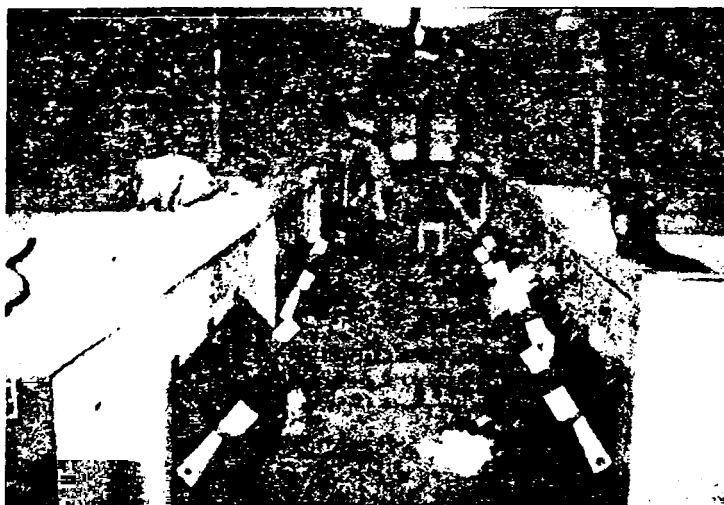


Figure 1: Goats house

The elements Ra, Fr, Ac, Po, At, Re and the rare earth metals Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dys, Ho, Er, Tm, Yb, and Cp which were delivered as impurities of the lanthanides (Anke and Groppe 1989). With the help of synthetic feeds it was possible to obtain extensive data concerning the essentiality of several metals (Cr, W, Cd, Pb, V, Li, Rb, Al, Ti) and also nonmetals (F, Br, Si, As, B) (Anke 2004b).

The influence of the geological origin of the soil on the ultra trace element contents of the vegetation was determined for wheat (*Triticum sativum*), rye (*Secale cereale*) and red clover (*Trifolium pratense sativum*) of the field and meadow varieties (*Trifolium pratense spontaneum*). The green plants were harvested when the rye was in blossom, the wheat shooting, the field red clover in bud, and the meadow red clover in blossom (Anke 2004a).

The ultra trace element intake was determined by the duplicate portions technique over seven consecutive days in a test comprising seven women and seven men aged between 20 and 69 years in 15 test populations in Germany. Table 1 inform about the materials used and analysed.

Table 1. Species, origin and numbers of the investigated samples

Kind of samples	Lithium		Rubidium	
	Table	Number	Table	Number
Indicator plants	3,4,5	3209	7	873
Plants,parts, age,species,	8,9,11	814	8,10,12	223
Animals	13,15,16	999	13,14,17	368
Vegetable foodstuffs	18 to 233	982	18 to 23	1009
Animal foodstuffs	24 to 26	432	24 to 26	432
Beverages	27	345	27	236
Li, Rb intake	32	980	32	980
Rubidium balance	-	-	36	588
Sum	-	7761	-	4709

The individual results were analysed with help of the Fox Pro database system (version 2.6 for windows, Microsoft Corporation). The statistical calculation was carried out with SPSS/PC (version 6.01 for Windows, SPSS Inc.), using the t-test, variance analysis and the smallest limit difference (SLD).

RESULTS

1. Presence, isotopes, production, uses and distribution lithium and rubidium in the environment

Lithium consists of two stable isotopes and rubidium of one radioactive isotopes and one stable isotope (Table 2).

On average the earth crust contains about 60 mg lithium and 310 mg rubidium kg. Thus, lithium ranks 27th and rubidium 17th in the frequency list of elements. Lithium consist of two stable isotopes and rubidium of one radioactive isotope and one stable isotope (Table 2).

The mined lithium amounted 25000 to 35000 t/year, the mined rubidium quantity come to 1 or 2 t/year. Rubidium is a forgotten element without major industrial, pharmaceutical and nutritional importance, whereas lithium is well used by industry and pharmaceutical sciences (Schäfer 2004, Anke and Angelow 2004, Kabata-Pendias and Pendias 2001, Schäfer 1998).

Table 2: Presence, isotopes, production and uses of lithium and rubidium

Parameter		Lithium	Rubidium
Discoverer		Arfvedson, 1817	Bunsen, Kirchhoff, 1861
Substratum		Petalite spodumene	Mineral water, Dürkheim
Presence	Earth crust	60 mg/kg	210 mg/kg
	Frequency list	27 th rank	17 th rank
	Minerals	> 25 Li-minerals	No Rb-minerals
	Rocks	scales 60, limestone 10 mg/kg	scales 150 mg/kg
	Soil	1.5 to 60 mg/kg	30 to 120 mg/kg
Isotopes		⁶ Li 75%, ⁷ Li 92.5%	85 Rb, 72.15%, 87 Rb 27.85%
Industrial uses		25000 to 35000 t/year	1-2 t/year
		Nuclear technology, ⁶ Li deuteride, H-bomb, thermo nuclear energy pharmaceuticals Aluminium alloys, aerospace, glass, ceramics, dyestuffs, batteries, cement, coolants for fusion reactors, catalyst heat exchange for cars air condition.	In industry, Rb is a forgotten element. No major industrial industrial importance, glass hardening, paper pigment.

2. Lithium and rubidium in plants and animals

2.1. Plants

2.1.1. Influence of the geological origin of the soil

The geological origin of the soil and anthropogenic emissions of lithium (and rubidium) influences the levels of the two alkali elements significantly. The lithium concentration of lucerne, field red clover, wheat and rye grown on one m² correlates with r 0.75 to r 0.90 and demonstrate the suitability of this species to indicate the lithium maintenance of the vegetation (Table 3).

Table 3: Correlation of the lithium contents of two plant species of the same location (x= first species; y= second species) (n 114)

Plant species, n	p ²	y	r ²
Lucerne: field red clover,(24,24)	<0.001	0.23±0.78x	0.75
Field red clover: wheat,(15,15)	<0.001	2.08±1.00x	0.75
Field red clover: rye,(18,18)	<0.001	3.10±1.27x	0.90

The effect of the origin of the soil on the lithium and rubidium content of the vegetation was examined with help of rye in blossom, wheat shooting, field red clover in bud and meadow red clover in blossom. The geological origin of the soil with the highest lithium or rubidium content was equated with 100 and the other soil origins were related to it (Table 4). The vegetation of the sandstone weathering soils of the Cretaceous formation, the weathering soil of the slate (Culm, Devon and Silur), Keuper and gneiss are significantly richer in lithium than those of diluvial and alluvial formations (Pleistocene sands, bog, peat boulder clay, holocene riverside soils). The weathering soils of the Trias time (200 to 240 millions year ago) (Keuper, Muschelkalk, Bunter) produce a vegetation on an average lithium level. The influence of the geological origin is very strong. It varies the lithium amount of the feed and food about the fivefold (Table 5). The lithium offer of animal and man is significantly influenced by the geological origin of the habitat.

Table 4. Influence of the geological origin of the site on the lithium content of the flora in Central Europe

Site	Relative index
Sandstone weathering soils of Cretaceous formation	100
Slate weathering soils	94
Keuper weathering soils	94
Gneiss weathering soils	92
Muschelkalk weathering soils	83
Bunter weathering soils	83
Rotliegende weathering soils	78
Diluvial sands	72
Granite weathering soils	72
Loess	71
Syenite weathering soils	68
Phyllite weathering soils	65
Moor, peat	58
Boulder clay	54
Alluvial riverside soils	51

The rubidium tender is also fixed by the geological origin of the soil. The indicator plants meadow red clover, field red clover, wheat and rye grown on soils of the same geological origin correlate, with r 0.61 to r 0.82 (Table 6) and demonstrate for rubidium the suitability of red clover, wheat and rye as indicator plants of this ultra trace elements.

Table 5: The lithium content of different feed- and foodstuff on lithium rich and lithium poor sites (mg/kg dry matter) (n 544)

Species (n)	Li-rich		Li-poor		p	%
	s	x	x	s		
Cabbage(21;11)	7.7	9.9	1.7	1.0	<0.01	17
Kohlrabi (21;8)	12	12	2.8	2.4	<0.05	23
Rye, grain(16;28)	2.5	4.1	1.0	0.4	<0.001	24
Wheat, grain(35;35)	2.8	2.9	0.7	0.4	<0.001	24
Lettuce (13;30)	8.2	17	4.5	6.1	<0.001	26
Beets (36;25)	10	14	3.6	1.4	<0.001	26
Acre red clover(11;16)	3.1	3.0	1.4	0.7	>0.05	47
Oats, grain(34;37)	0.9	1.0	0.5	0.3	<0.01	50
Tomatoes(20;7)	10	14	7.7	2.3	>0.05	55
Carrots (18;16)	7.1	10	5.8	4.7	>0.05	58
Barley, grain(40;66)	1.1	1.1	0.7	0.4	<0.01	64

Table 6: The correlations of the rubidium content of two plant species of the same geological origin (x= first species, y= second species)

Plant species (n)	p	y	r
Meadow red clover: Field red clover (13)	<0.01	$2.290+0.438x$	0.66
Meadow red clover: wheat,(13)	>0.05	$4.518+0.184x$	0.63
Meadow red clover: rye, (13)	<0.001	$2.003+0.291x$	0.79
Field red clover: wheat, (13)	<0.001	$4.286+0.332x$	0.82
Field red clover: rye,(13)	<0.01	$3.997+0.336x$	0.66
Rye: wheat, (13)	>0.05	$4.463+0.485x$	0.61

The high rubidium content of the gneiss rocks and their weathering soils induced the high rubidium levels in the vegetation of this habitat (Table 7). The weathering soils of granite, Rotliegende, phyllite, riverside and slate weathering soils deliver on average high amounts of rubidium in the food chain of animal and man, whereas the organic soils, the formation of the Pleistocene (Boulder clay, diluvial sands, loess) and especially the Trias sediments (Bunter, Muschelkalk and Keuper) produce a vegetation with extreme low rubidium levels. The rubidium concentration of the plants is especially strong influenced by the origin of the site (Anke 2004a, Kořla et al. 2001).

Table 7: Influence of the geological origin of the site on the rubidium content of the flora in Central Europe (n 873)

Geological origin of the site	Relative index
Gneiss weathering soils	100
Granite weathering soils	78
Rotliegende weathering soils	65
Phyllite weathering soils	60
Alluvial riverside soils	58
Slate weathering soils (Devonian, Silurian, Culm)	48
Moor, peat soils	37
Loess	33
Boulder clay	32
Bunter weathering soils	30
Muschelkalk weathering soils	27
Diluvial sands	26
Keuper weathering soils	21

2.1.2. Plant age, plant part, plant species and winter grazing of game

The age of the annual plant species varies the lithium and rubidium concentration of the vegetation equal (Table 8). With increasing age the level of both alkali elements decreases significantly. The uptake of both elements through the plant hurries on ahead the assimilation. The assimilated dilutes the concentration of lithium and rubidium later on.

Table 8: Influence of age on the lithium and rubidium content of several plant species (mg/kg dry matter) (n 24,24)

Species (n,n)	Lithium			Rubidium		
	End of April	Middle of June	%	End of April	Middle of June	%
Green wheat (6,6)	18	7.7	43	8.1	6.8	84
Green rye (6,6)	15	10	67	3.1	2.4	77
Fescue grass (6,6)	11	5.1	46	5.6	2.9	52
Field red cloves	10	5.8	58	15	11	73

On average, the decrease of the lithium level amounts to a half, the rubidium concentrations to a quarter. Young plants are rich in both alkali elements.

The part of the plants influences in the same manner the lithium and rubidium concentration of the consumed feed- and foodstuffs. Seeds of cereals (Rye, wheat, barley, oat) (Table 9) and fruits (Bananas, strawberries, oranges, apples) (Table 10) are in comparison to edible bulges and leaf rich plants poor in lithium and rubidium. The lithium and rubidium concentration of bulges and tubers is not significant different from leaf rich species. Generally, the rubidium concentration of the plant parts and plant species is threefold higher than their lithium content.

Table 9: Lithium content of several plant parts and species (mg/kg dry matter) (n 502)

Grains (n)	x ±	Bulges , tubers (n)	x ±	Leaf rich species (n)	x ±
Rye (16)	4.1±2.4	Turnip (36)	14±10	Meadow grass (87)	14±11
Wheat (35)	2.9±2.8	Carrot (18)	10±7,1	Maize green (32)	13±10
Barley (40)	1.1±1.1	Potato (25)	8.6±9.4	Turnip (38)	12±8.9
Oat (34)	1.0±0.9	Onion (21)	3.3±2.8	Field red clover (120)	5.9±5.2

Table 10: Rubidium content of plant parts and species (mg/kg dry matter) (n 160)

Fruits (n)	Bulges, tubers (n)	Leaf rich species (n)
Bananas (6) 16±14	Asparagus (6) 68±49	Common bistort (8) 62±23
Strawberry (15) 8.0±1.4	Kohlrabi (15) 28±17	Meadow grass (22) 29±19
Orange (6) 5.6±2.1	Carrot (15) 22±12	Raw crow foot (18) 21±11
Apple (15) 5.0±2.9	Potato (15) 4.8±1.6	White dutch clover (19) 15±5.1

The winter grazing of the game (Table 11, 12) deliver through the absolutely young rape and rye of the fields and the old wavy hair grass of the wood much lithium in the food web of the game. Heather, bark, shoots bushes and twigs are with 3.6 to 2.2 mg Li/kg DM, relatively poor in lithium.

Table 11: Lithium content of several winter grazing of game (mg/kg dry matter) (n 288)

Species (n)	Species (n)
Rape, green (10) 11	Raspberry shoots (35) 2.8
Rye, green (40) 7.8	Bilberry (29) 2.5
Hair grass (39) 5.8	Spruce twigs (28) 2.4
Heather (39) 3.6	Pine twigs (25) 2.3
Spruce bark (31) 3.0	Oak twigs (12) 2.2

The rubidium content of the winter grazing is much higher than their lithium concentration and varies in dependence of the geological origin of the habitat extremely (Table 12).

Table 12: Rubidium content in spruce twigs (*Picea abies*) and heather (*Calluna vulgaris*) (mg/kg dry matter) (n 39)

Species	Granite gneiss	Diluvial sands	Diluvial sands	Slate, Devon	Slate, Culm	S.L.D
Spruce twigs	114±51	25±16	22±3.8	16±6.1	7.8±8.0	50
Heather	59±47	25±7,8	19±0,60	19±4.6	9.5±0.5	-

The spruce twigs and heather of the gneiss-granite habitat accumulate the 15- and six-fold rubidium amounts which were found in the same species of slate weathering soils of the Culm.

2.2. Animals

The lithium and rubidium supply of animals were first tested in small animals (mice, voles and shrews, secondly in herbivores, omnivores and carnivores and thirdly in the tissues of farm animals and games (Table 13, 14, 15).

Table 13. Lithium and rubidium content of mice, voles and shrews (mg/kg dry matter) (n 60,36)

Omnivores	Li	Rb	Carnivores	Li	Rb
Wood mouse (11,10)	6.3±1.5	8.8±2.8	Pygmy shrew (7,7)	5.8±6.7	4.6±1.0
Field mouse(33,10)	7.1±1.7	9.3±2.7	Common shrew (9,9)	6.4±3.4	5.3±1.4

Omnivores accumulate insignificantly higher lithium and rubidium amounts in their body than carnivores (Table 13). The differences are very small.

The rubidium concentration of the tissues of animal and man is extremely influenced by the geological origin of the habitat or the rubidium supply (Table 14). The rubidium content of the liver and kidney of herbivores varied between 95 and 14 to 20 mg/kg DM. The high rubidium level in liver and kidneys of the red deer results from their rubidium rich grazing of the gneiss weathering soils. Cattle, sheep and fallow deer consumed a rubidium poorer feed. They accumulated lower rubidium amounts in both tissues.

Table 14: Rubidium content of liver and kidneys of herbivores, omnivores and carnivores (mg/kg dry matter) (n 140)

Tissues	Herbivores				Omnivores		Carnivores	LSD	%
	Red deer	Cattle	Sheep	Fallow deer	Pig	Man	Cat		
Liver	94±56	36±14	34±11	14±4.4	14±3.0	14±38	16±4.8	31	15
Kidney	96±51	32±13	40±24	21±8.3	14±3.9	14±3.8	17±3.1	30	15

Omnivores and carnivores stored similar rubidium amounts in liver and kidneys, which were comparable with the rubidium amounts found in the fallow deer.

The form of nutrition is not important for the lithium and rubidium incorporation in the body and tissues of the body. The amount of both alkali elements in the feed described the incorporation in the tissues.

Highest lithium amounts were accumulated in the cerebrum, kidneys and liver of several ruminant species (Table 15). Ribs and hairs incorporate much lower lithium concentrations.

The variation of the lithium level of the analysed tissues varies about 40 to 60% and shows the influences of the different lithium intake and/or species effects.

Table 15: Lithium content of several tissues from man, red deer, red deer and domestic goat (mg/kg dry matter) (n 516)

Tissues(n)	Mouflon	Roe deer	Red deer	Goat	Fp	% ¹⁾
Cerebrum(12,10,33,18)	42±22 ^{xx}	40±15	26±16	26±24 ^x	>0.05	62
Kidney(36,55,38,18)	24±16 ^x	33±21	32±20	35±25 ^{xx}	>0.05	69
Liver(43,38,40,19)	18±15 ^x	32±25 ^{xx}	23±12	23±13	<0.01	56
Ribs(43,10,19,18)	13±8.7	14±9.5 ^x	15±11	24±22 ^{xx}	>0.05	58
Hair(13,13,18,22)	3.9±4.1	4.1±3.0	1.8±1.6 ^x	4.6±2.3 ^{xx}	<0.05	39

%¹⁾ = $x = 100\%$; ^{xx} = $x\%$

The lithium status of goats with 10 mg Li/kg feed DM and 1.7 mg Li/kg feed DM demonstrated that the blood serum is one of the best indicators of the lithium status (Table 16).

Table 16 Capacity of different goat tissues to reflect the lithium status (n, 423)

Part of the body, secret	Reduction to %	p
Blood serum	19	<0.001
Hair	30	<0.001
Lungs	30	<0.01
Milk	31	<0.001
Spleen	40	<0.01
Carpal bone	40	<0.01
Rib	42	<0.05
Ovary	45	>0.05
Liver	48	<0.05
Kidneys	49	>0.05
Uterus	53	>0.05
Aorta	62	>0.05
Cerebrum	69	>0.05
Skeleton musculature	76	>0.05
Pancreas	86	>0.05
Cardiac muscle	104	>0.05

The goats with the lithium poor semi-synthetic ration reduced the lithium content to 19% of the lithium amount found in blood serum of the control goats with 10 mg Li/kg feed DM. Hair, lungs and milk indicate the lithium status, too.

The lithium content of spleen, liver, and bones informs significantly about the lithium status of the goats. The lithium concentrations of kidneys, uterus, aorta, cerebrum muscle and pancreas of the lithium poor feed goats were lowered but only insignificantly. The cardiac muscle did not change their lithium content.

The rubidium status of the goats is very good indicated by the cerebrum and ripe milk (Arnhold and Anke 1988) (Table 17). The cerebrum of intrauterine rubidium depleted kids contained significantly lower rubidium amounts than the kids of the control goats. The cerebrum of these mothers were also rubidium depleted, but the difference was insignificant. It needs further analysis.

The ripe milk of the rubidium deficiency goats deliver ~ 40% lowered rubidium to their kids. Milk is a good indicator of the rubidium status.

Table 17: Capacity of goats cerebrum and milk to reflect their rubidium status (mg/kg dry matter) (n 192)

Tissues(n,n)		Control goats		Rubidium deficiency goats		p	%
		s	x	x	s		
Cerebrum	Adults(4,7)	1.96	2.13	1.26	0.57	>0.05	59
	Kids(7,6)	1.28	3.44	1.43	0.55	<0.01	42
Percent (%)		162		113		-	
Milk	Colostrum (19,9)	0.46	1.14	1.14	0.66	>0.05	100
	Milk (91,49)	1.25	2.84	1.77	1.02	<0.001	62
Percent (%)		249		155		-	

3. Lithium and rubidium content of the human food

3.1. Vegetable foodstuffs

Usually, vegetable foodstuffs contain more rubidium than lithium. Only starch and starch rich products, sugar, cornflakes, table salt and mushrooms with a very low rubidium content, hold a little of rubidium than lithium. All farinaceous products, flours and pulses (Table 18) deliver < 1 mg Li/kg DM. Ready to serve soups and blancmange powder chocolate flavoured accumulated 1 to 2 mg Li/kg DM. Cocoa deliver the lithium in to the chocolate pudding. Vanilla pudding is with 0.150 mg Li/kg DM extremely poor in lithium.

With exception of starch, blancmange powder and wheat flour all analysed farinaceous products, and pulses are richer in rubidium than in lithium. Especially rich in rubidium are rice, oat flakes, peas and white beans. They contain 3 to 7 mg Rb/kg DM. Blancmange powder chocolate flavoured accumulate ~ 14 mg Rb/kg DM.

Table 18: Lithium and rubidium content of farinaceous products, flours and pulses (mg/kg dry matter) (n 228,255)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg DM	Rubidium mg/kg DM	%
Starch of wheat(15,15)	88.9	0.990	0.100	10
Starch of maize(15,15)	88.4	0.560	0.130	23
Blancmange flour (vanilla flavoured)(15,15)	86.4	0.684	0.150	22
Semolina (15,15)	87.1	0.433	0.650	150
Wheat flour (15,15)	85.5	0.874	0.760	87
Pasta (15,15)	87.1	0.510	1.13	222
Noodles (15,15)	89.9	0.410	1.19	290
Pearl barley (15,15)	88.2	0.990	1.55	157
Flour for dumplings (15,15)	88.1	0.728	1.96	269
Pancake wheat (15,15)	88.1	0.818	2.05	251
Ready to serve(15,15) soups	89.5	2.07	2.63	127
Rice (6,15)	87.7	0.760	3.71	488
Oat flakes (6,15)	88.5	1.46	3.88	266
Oat pulp (6,15)	87.8	0.850	3.99	469
Peas dried (15,15)	89.3	0.807	5.31	658
White beans (15,15)	88.3	0.684	6.83	999
Blancmange flour (choc. flavoured) (15,15)	86.0	1.80	14.1	783

On average farinaceous products and pulses contain the threefold amount of rubidium than lithium. Table 19 summarized sugar, sugar rich products, cocoa and cocoa rich food, coffee and black tea. Their lithium content varies from 0.2 to 2 mg/kg DM, whereas their rubidium concentration amounted from 0.1 mg/kg DM in sugar to 84 mg/kg DM in black tea. All sugar rich products are poor in both elements (0.1 to 1.2 mg/kg DM). Cocoa, coffee and

Table 19: Lithium and rubidium content of sugar, honey, jam, cocoa, coffee and black tea (mg/kg dry matter) (n 121,121)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg	Rubidium mg/kg	%
Sugar (15,15)	98.1	0.176	0.110	62
Jam (6,6)	55.5	0.380	0.700	184
Candies (15,15)	96.4	0.482	0.700	145
Synthetic honey (9,9)	72.5	0.380	1.06	279
Bee honey (15,15)	71.0	0.510	1.26	247
Chocolate sweat for bread (6,6)	95.7	1.08	5.60	519
Chocolate cream	93.4	0.576	6.03	1047
Milk chocolate (15,15)	95.1	0.346	6.94	2006
Cocoa (15,15)	92.4	1.12	31.1	2777
Coffee (15,15)	96.2	0.724	41.4	5718
Black tea (15,15)	92.3	2.07	84.1	4063

black tea contain 1 to 2 mg Li/kg DM and 30 to 85 mg Rb/kg DM. Sugar and sugar rich food deliver the twofold, cocoa the ~ 25-fold, black tea the ~ 40-fold and coffee the 60-fold amount of rubidium in the food chain than lithium. Cocoa, coffee and tea are important rubidium supplier of man.

Table 20: Lithium and rubidium content of bread, cake, and pastries (mg/kg dry matter) (n153,153)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg	Rubidium mg/kg	%
Cornflakes (6,6)	96.6	1.16	0.360	31
Biscuits (15,15)	95.7	0.754	0.850	113
Thin topping sponge cake with crumble (15,15)	84.8	0.268	0.910	340
Toasted bread (15,15)	69.7	0.632	1.11	176
Rusk (15,15)	94.0	0.582	1.15	198
White bread (6,6)	63.5	0.560	1.15	205
Rolls (15,15)	75.8	0.320	1.23	384
Wheat and rye bread (15,15)	62.4	0.476	1.39	292
Sponge cake (15,15)	72.2	0.388	1.84	474
Cake with egg topping (15,15)	34.2	0.466	1.96	421
Coarse-grained whole meal rye bread (6,6)	53.9	0.210	2.07	986
Crisp bread (15,15)	93.2	0.378	3.35	886

In accordance with relatively low lithium and rubidium content of the cereals the amounts of lithium and rubidium in bread, cake and pastries are small (Table 20). Baked goods store 0.2 to 1.2 mg Li/kg DM and 0.4 to 3.5 mg Rb/kg DM or on average ~ 0.5 mg Li/kg DM and ~ 1.5 mg Rb/kg DM. Surprisingly rich in lithium were cornflakes and rich in rubidium coarse-grained whole meal rye bread and crisp bread.

Obviously, the bran of the cereals stores much rubidium. Baked goods are poor in both alkali elements. They contain the threefold rubidium amount in comparison to lithium.

The lithium concentration of spices and herbs varies between 0.8 mg/kg DM in pepper and 6 mg in parsley, their rubidium content fluctuate between 0.05 mg/kg in table salt and 10 mg/kg DM in marjoram, 14 mg/kg in paprika, 22 mg/kg in pepper, 27 mg/kg in parsley and > 30 mg/kg DM in cinnamon (Table 21). On average spices and herbs deliver, the eightfold amount of rubidium than lithium in the food chain of man. Only parsley, chive, mustard seeds and mustard accumulate 3 to 6 mg Li/kg DM. The contribution of spices and herbs to the lithium and rubidium intake of man is very limited, since the consumed amounts of spices and herbs are extremely low.

Table 21: Lithium and rubidium content of spices and herbs (mg/kg dry matter) (n 180,180)

Kind (n;n)	Dry matter %	Lithium mg/kg	Rubidium mg/kg	%
Table salt (15,15)	100	1.75	0.05	2.9
Chive (15,15)	10.6	3.08	4.06	132
Mustard seeds (15,15)	92.9	2.96	5.88	199
Mustard (15,15)	25.3	2.93	5.92	202
Caraway(15,15)	90.9	1.04	6.16	592
Dill (15,15)	10.0	1.88	8.49	452
Marjoram (15,15)	87.1	2.31	9.87	427
Paprika, hot (15,15)	88.2	2.30	13.6	591
Paprika sweet (15,15)	87.6	2.32	14.2	612
Pepper (15,15)	90.7	0.79	22.0	2785
Parsley (15,15)	17.4	6.15	26.6	433
Cinnamon (15,15)	90.7	0.96	32.3	3365

The lithium levels of fruits are 0.4 mg/kg DM in bananas to 1.3 mg/kg DM in apples and oranges, 1.6 mg/kg in kiwi, 1.7 mg/kg in pears, 2.8 mg/kg DM in lemons and 6.7 mg/kg DM in tomatoes (Table 22).

All analysed kinds of fruits deliver more rubidium than lithium. Their rubidium content varies between 5 and 30 mg/kg DM in apples and kiwis.

Table 22: Lithium and rubidium content of fruits (mg/kg dry matter) (n 108,108)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg	Rubidium mg/kg	%
Apples (15,15)	12.1	1.26	5.02	398
Apple sauce (15,15)	14.7	0.81	5.10	630
Lemons (15,15)	10.1	2.82	5.63	200
Tomatoes (15,159)	5.8	6.71	8.45	126
Pineapples (15,159)	13.4	1.05	9.85	938
Pears (6,6)	12.2	1.73	10.5	607
Bananas (6,69)	18.4	0.380	16.1	4237
Oranges (15,15)	15.7	1.34	19.5	1455
Kiwis (6,6)	15.9	1.56	29.7	1904

Richest in lithium are tomatoes with 7 mg /kg DM. On average, fruits accumulate the twelf-fold rubidium amount of the lithium concentration.

With exception of mixed mushrooms, all vegetables (Table 23) contain more rubidium than lithium. Lowest lithium levels were found in peas (0.4 mg/kg DM), white cabbage (1.9 mg/kg DM), kohlrabi, asparagus (2.2 mg/kg DM) and potatoes (2.8 mg/kg DM), whereas lettuce (4.0 mg/kg DM), cucumber (5.0 mg/kg DM), mixed mushrooms (5.8 mg/kg DM) and field mushrooms (Champignons) (6.6 mg/kg DM), are absolutely rich in lithium. Peas (4.0 mg Rb/kg DM) and potatoes (4.8 mg/kg DM) incorporate low rubidium concentrations of the vegetables, whereas white cabbage, lettuce, cucumber, cauliflower, carrots, kohlrabi and especially asparagus store 10 to 68 mg Rb/kg DM. The analysed vegetables accumulate on average the six-fold rubidium concentration of their lithium level.

Table 23: Lithium and rubidium content of vegetables (mg/kg dry matter) (n 192,192)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg DM	Rubidium mg/kg DM	%
Mixed mushrooms (15,15)	6.0	5.79	0.57	10
Peas (15,15)	19.9	0.37	3.99	1078
Potatoes (15,15)	18.3	2.82	4.84	172
Red cabbage (15,15)	9.2	3.58	7.39	206
Green beans (15,15)	6.7	3.90	8.96	230
Champignons (6,6)	5.2	6.60	9.49	144
Sauerkraut (15,15)	8.7	3.27	9.68	296
White cabbage (15,15)	9.1	1.87	12.4	663
Lettuce (15,15)	7.3	4.00	13.5	338
Cucumber (15,15)	5.2	5.02	18.3	365
Cauliflower (6,6)	8.0	3.46	18.8	543
Carrots (15,15)	7.0	3.81	22.3	585
Kohlrabi (15,15)	10.4	2.23	28.3	953
Asparagus (15,15)	4.6	2.22	68.0	3063

In vegetable foodstuffs highest lithium amounts were found in parsley (6.2 mg/kg DM), champignons (6.6 mg/kg DM) and in tomatoes (6.7 mg/kg DM) and highest rubidium levels incorporated cocoa (31 mg/kg DM), cinnamon (32 mg/kg DM), coffee (41 mg/kg DM), asparagus (68 mg/kg DM), and black tea (84 mg/kg DM).

3.2. Animal foodstuffs

The lithium content of sausages, hen's eggs and kidneys of pig varies between 3.0 mg/kg in liver sausage and 8.5 mg/kg DM in kidneys of pigs (Table 24). Sausages, hen's eggs and kidneys store more lithium than rubidium. On average, these foodstuffs accumulate 15% more lithium than rubidium. The reason for this result is the high fat content of the sausages. Fat incorporated significant more lithium than rubidium (Table 26). Hen's eggs and kidneys can incorporate very high levels of lithium. On the other hand, meat of cattle, sheep, pig and especially broiler accumulate between 7 and 20 mg Rb/kg DM and only 2.2 and 4.6 mg Li/kg DM. On average, meat of the farm animal accumulated the three-fold amount of rubidium in comparison to its lithium concentration.

Table 24: Lithium and rubidium content of meat, offals, sausages and hen's eggs (mg/kg dry matter (n 177,177)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg DM	Rubidium mg/kg DM	%
Black pudding (15,15)	51.8	3.42	1.63	48
Liver sausage (15,15)	51.8	3.05	2.98	98
Salami (15,15)	64.1	3.80	3.18	84
Thick Frankfurter (15,15)	44.9	3.30	3.53	107
Liver loaf (6,6)	45.8	6.37	3.91	61
Mortatella (6,6)	41.2	3.87	4.20	109
Hen's egg (15,15)	25.7	6.89	5.99	87
Beef (15,15)	27.2	3.45	6.84	198
Mutton (15,15)	33.1	4.60	6.92	150
Pork kidneys	26.6	8.46	7.57	89
Cattle liver	31.3	4.75	9.37	197
Pork (15,15)	27.9	3.51	10.8	308
Chicken (15,15)	31.2	2.21	19.6	887

The lithium levels in fishes varies between 1 mg/kg DM in salted herring and 3.2 mg/kg DM in Bismarck herring, whereas their rubidium levels amounted to 0.6 mg/kg DM in Bismarck herring and 13 mg/kg DM in fresh trout (Table 25). Marine fish accumulated lower rubidium amounts than freshwater trout. Smoking of the trout's lower their rubidium and lithium content, since the trout's lost fat and with it a lot of lithium and a smaller amount of rubidium. Herring in tomatoes are supplied with the lithium and rubidium of these fruits. Fish deliver the man lithium like meat and in form of marine fish lower rubidium amounts. Trout accumulated rubidium like pork and chicken.

Table 25: Lithium and rubidium content in fish and tined fish (mg/kg dry matter) (n 96,96)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg DM	Rubidium mg/kg DM	%
Bismarck herring (6,6)	28.7	3.16	0.59	19
Fried herring (6,6)	30.1	1.71	1.13	66
Salted herring (9,9)	37.6	0.990	1.22	123
Sardines (6,6)	43.3	2.57	1.45	56
Herring fillet (15,15)	35.3	2.88	1.62	56
Mackerel fillet (15,15)	35.4	1.29	2.21	171
Rosefish fillet (6,6)	23.6	4.10	2.44	60
Herring in tomatoes	31.0	2.15	5.84	272
Trout smoked (9,9)	28.9	1.10	9.92	902
Trout fresh (9,9)	28.9	3.00	12.7	423

Milk and dairy products supply humans with abundant lithium (Table 26). Butter and margarine are with 1 mg Li/kg DM relatively rich in lithium and poor in rubidium. Highest

Table 26: Lithium and rubidium content of margarine, butter, milk, and dairy products (mg/kg dry matter) (n159,159)

Kind (n,n)	Dry matter %	Lithium mg/kg DM	Rubidium mg/kg DM	%
Margarine (15,15)	77.0	0.830	0.080	9
Butter (15,15)	61.1	1.07	0.510	48
Edam cheese (9,9)	55.0	2.80	0.680	25
Gouda cheese (9,9)	55.0	2.17	0.938	43
Tollense cheese (9,9)	55.2	1.12	0.990	88
Limburg cheese(15,15)	45.9	2.69	1.15	43
Camembert (15,15)	45.4	3.65	1.31	36
Altenburg cheese (9,9)	47.9	5.38	1.35	25
Emmental cheese (6,6)	62.6	1.08	1.37	127
Tilsit cheese (6,6)	56.8	1.19	1.70	143
Soft cheese (15,15)	40.3	2.28	2.81	123
Curd (15,15)	18.3	4.12	3.51	85
Yoghourt (6,6)	17.7	2.38	3.79	159
Milk (15,15)	12.0	7.30	6.15	84

amounts of both elements deliver milk with approximately 7 mg/kg DM. The production of cheese and curd decreased the concentration of lithium and rubidium in all kinds of cheese. Both elements are water soluble and leave partly the cheese and curd through the whey. On average, milk and dairy products deliver humans much lithium. Their rubidium concentration is ~ approximately a quarter lower than their lithium level.

3.3. Beverages

The lithium and rubidium content of the beverages varies extremely (Table 27). In the drinking water of Germany the lithium content fluctuated between 4 and 60 µg/L and the

Table 27: The lithium and rubidium content of beverages (µg/L) (n 345,236)

Kind (n,n)	Lithium µg/L	Rubidium µg/L	%
Schnapps (15,15)	116	2.0	2
Brandy(15,15)	82	5.3	6
Drinking water (153,44)	15	11	73
Lemonade (15,15)	92	12	13
Coke (15,15)	169	16	9
Vermouth (15,15)	272	112	41
Beer (30,30)	190	201	106
Tea, sweet kinds (7.2 g/L) (15,15)	15	221	1473
White wine (15,15)	184	242	132
Advocaate (15,15)	46	273	593
Sparkling wine (15,15)	167	274	164
Red wine (6,6)	206	689	334
Juice (6,6)	230	990	430
Coffee (40g/L) (15,15)	29	1656	5710

rubidium stock between 3 and 38 µg/L; on average, 15 and 11 µg/L, respectively were measured. Schnapps, brandy, lemonade and coke are, like drinking water, extremely poor in rubidium, whereas beer, black tea, wine in all forms, juice and especially coffee are rich in rubidium and relatively poor in lithium. The beverages get their lithium and rubidium through their supplies. Beside water, barley (1 mg Li/kg DM and 1 mg Rb/kg DM) and hop deliver both elements. The black tea and coffee are rich in rubidium and poor in lithium.

The rubidium of the black tea leaves is transferred to 80% into the beverages (Angelow 1994). Grapes are rich in rubidium, also fruits. The lithium concentration of fruits is much lower than their rubidium concentration. The content of both alkali elements in the beverages is proportional to the lithium and rubidium content of their raw material.

4. Essentiality of lithium and rubidium for the flora, fauna and man

4.1. Essentiality of lithium and rubidium for the flora

Although lithium is not known to be an essential plant nutrient, there is some evidence that lithium can affect plant growth and development. However, stimulating effects of several lithium salts reported by various authors have never been confirmed (Kabata-Pendias and Pendias 2001).

The essentiality of rubidium in plant has not yet been fully defined. Rubidium appears able to substitute for potassium in the germination of cereals and legumes (Del Signore et al. 1999).

4.2. Essentiality of lithium for the fauna

Whether lithium is essential for the fauna has been investigated systematically since 1976 in goats (Anke et al. 1981a, 1981b, 1983, 1991, 1995, Arnhold 1989, Schäfer 1997, Szilagyi et al. 1989), sheep (Regius et al. 1993), and rats (Pickett et al. 1983, Ono et al. 1992) in Germany, Hungary, the USA, and Japan. The influence of a lithium-poor feed on the pre- and postnatal growth of goats was tested with 14 repetitions over 15 years (Table 28). It was shown that the feed intake by the growing young goats was significantly (11%) lower in comparison to the control goats. The adult lithium-deficient goats compensated this low feed intake in the second year of life. The kids of lithium-deficient goats had a 9% lower birth weight than those of control goats.

Table 28 Influence of lithium-poor nutrition on feed intake, growth, reproduction performance, milk production, mortality and serum enzyme activity of goats

Parameter			Control goats	Deficiency goats	p ²⁾	% ¹⁾
Li-content of the ration, mg/kg DM			10	< 1.7	< 0.001	<17
Feed intake	Young goats, pregnant	g/day	665	592	< 0.001	89
	Old goats, pregnant	g/day	698	778	< 0.001	111
Growth	Birth weight, < 2.5 kg	%	36	51	< 0.05	-
	Birth weight, >2.5 kg	%	64	49	< 0.05	-
	Live weight, 1st day	kg	2.86	2.60	< 0.01	91
	Live weight, 91st day	kg	17.4	14.8	< 0.001	85
	Live weight, 101-268 day	g	98	88	> 0.05	90
	Reproduction performance	Success of first insemination	%	77	51	< 0.001
	Conception rate	%	86	74	< 0.05	-
	Abortion rate	%	1	14	< 0.001	-
	Matings per gravidity		1.3	2.0	< 0.001	-
	Sex ratio (female = 1)		1.6	0.7	< 0.001	-
Milk production		ml/day	1107	881	< 0.001	80
Mortality	Kids 7th to 91th day	%	6.0	14	> 0.05	-
	She goats 1 st and 2 nd year	%	7.0	41	< 0.001	-
Serum -enzyme-activity	Isicitrate dehydrogenase	U/L	4.0	1.4	< 0.05	35
	Glutamate dehydrogenase	U/L	14	5.7	< 0.001	41
	Creatinine kinase	U/L	20	35	< 0.05	175

¹⁾ Control goats = 100 %, deficiency goats = x%, ²⁾Significance level, Student test

Moreover, lithium-poor nutrition caused reproductive disorders in goats and rats. Lithium-poor feeds of female goats did not have an effect on the intensity of estrus behavior. The first mating, however, produced a significantly worse rate of conception in these animals. Repeated

services at the following ovulations improved the conception rate of lithium-deficient goats. The difference between the groups remained significant. The increased abortion rate of lithium-deficient goats is also important. Miscarriages occurred at a rate of 14% between the third and fifth months of gravidity.

The effect of lithium deficiency on the sex ratio was most surprising. As a rule, hornless goats give birth to more male than female kids. Lithium-deficient goats, however, gave birth to significantly more female kids.

The 5-year average showed that lithium-deficient goats produced 20% less milk than the control animals.

Long-term lithium deficiency experiments with female goats allowed an analysis of the influence of lithium-poor nutrition on the life expectancy of the animals. The investigations showed that 41% of the lithium-deficient goats and 7% of the control animals died during the first year of the experiments. Skin lesions occurred in individual animals with lithium-poor feeds (Figure 2). In the meantime, it was shown that lithium was also effective in the treatment of herpes virus infections and of seborrheic dermatitis in humans (Horrobin 1991).



Figure 2: Skin lesions of a lithium deficient-she goat

Lithium deficiency did not affect the biochemical blood profile, but it changed the activity of several serum enzymes. As a rule, lithium deficiency reduced the serum enzyme activity, mainly the enzymes of the citrate cycle (ICDH, isocitric acid dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase), of glycolysis (ALD), and of nitrogen metabolism (GLDH, glutamine dehydrogenase), for which significant differences between control and lithium-deficient goats were observed. Only creatine kinase activity, a stress indicator enzyme, was significantly increased in lithium-deficient goats.

Owing to the particular role of monoamine oxidase (MAO) in manic-depressive diseases, chronic schizophrenia, and unipolar depression, this enzyme was also investigated in the liver of control and lithium-deficient goats. MAO activity in the hepatic tissue of the latter group was reduced to 28%. Abnormal behavior was observed in lithium-deficient rats, and this disappeared after lithium supplementation. This assessment is interesting in so far as the MAO hypothesis is discussed as a biochemical mechanism of a lithium therapy in humans.

In brief, the results of lifelong lithium-poor nutrition over > 15 generations of goats show that lithium may be essential to the fauna, and thus, to humans as well (Birch 1999, Schrauzer 2002).

The lithium deficiency influenced also the metabolism of other trace elements, for example the copper incorporation the organs (Arnhold et al. 1991).

4.3. Essentiality of rubidium for the fauna

The rubidium-poor nutrition of she-goats decreased the feed intake significantly, i.e. by 16% yearly (Table 29). The birth weight of kids from rubidium-deficient goats was 14%

Table 29: Influence of rubidium-poor nutrition on feed intake, growth, reproduction performance, milk production, mortality and serum content of progesterone and estradiol

Parameter			Control goats		deficiency goats		p	%
			s	x	x	s		
Rb-content of the ration, mg/kg DM			10		0.280		< 0.001	2.8
Feed intake	Barren, 84 th days	g/day	296	778	565	159	< 0.001	73
	Gravid, 140 th days	g/day	198	613	567	137	< 0.001	92
	Lactating, 84 th days	g/day	255	696	590	223	< 0.001	85
	July 1 st – June 1 st	g/day	228	682	574	176	< 0.001	84
Growth	Birth	kg	0.8	2.9	2.5	0.7	> 0.05	86
	49 th day	kg	2.5	10.5	8.0	1.3	< 0.001	76
	91 st day	kg	4.4	17.5	13.6	3.1	< 0.01	78
	Undepleted	g/day	25	95	99	23	> 0.05	104
	Depleted		25	95	41	18	< 0.01	43
Reproduction performance	Without heat	%	2		11		> 0.05	-
	Success	%	61		46		> 0.05	-
	Conception rate	%	88		68		< 0.01	-
	Service per pregnancy	%	1.8		2.2		> 0.05	-
	Abortion rate	%	2		80		< 0.001	-
	Kid carried to birth	n	1.3		1.8		< 0.001	-
	Sex ratio (female = 1)		1.4		1.4		> 0.05	-
Milk performance	Milk	ml/day	420	927	636	384	< 0.001	69
	Protein	g/day	12.7	27.6	20.5	14.0	< 0.001	74
	Fat	g/day	21.3	32.3	28.6	19.9	> 0.05	89
Mortality	Kids, 7 th – 91 th day	%	2		33		< 0.001	-

lower than that of controls. On the 91st day of life, the weight of kids from both groups differed significantly by 22%. After weaning (101st – 268th day of life), only the intrauterinely rubidium-depleted kids grew at a significantly slower rate. Bought-in kids given rubidium-poor feed developed normally; with their mothers' milk, they had received and stored sufficient rubidium for normal growth. However, after depletion of the storage during first pregnancy, these kids showed symptoms of rubidium deficiency.

The rubidium-poor nutrition influenced the number of goats without heat and the number of unsuccessful first inseminations only insignificantly, though noticeably (Table 29). The conception rate of rubidium-deficient goats was significantly lower than that of controls, but the most important point noted was the extremely high abortion rate in the rubidium-deficient animals.

Here, the fetuses were regularly aborted during the 3rd to 5th months. Kids born after day 125 of pregnancy were occasionally viable if bottle-fed with mother's milk. One-third of the viable kids died within the first 91 days of life, with a highly significant difference from the number of control kids that died (Table 29).

Analyses of 35 blood and blood plasma components showed significant changes only in creatinine, phosphorus, and progesterone metabolism. Goats that underwent abortion or miscarriage had a significantly lower plasma progesterone status. Rubidium is likely to play a role in the preservation of pregnancy, and both control and rubidium-deficient goats that were pregnant in the 3rd and 4th months had normal plasma progesterone and estradiol levels (Table 30). Rubidium-deficient goats that had either aborted or miscarried had a plasma progesterone level that was only 7% of the normal value. The plasma estradiol level in goats that aborted ranged from 37 to 280 nmol L. The pregnancy-preserving properties of progesterone are dependent upon a normal rubidium status, and in this respect rubidium is available within the food chain in sufficient amounts to prevent deficiency (Anke et al. 1993, 1997). According to Johanson et al. (1992), the placenta of humans contain particularly much rubidium.

Table 30: Plasma progesterone and estradiol levels of control and rubidium deficiency goats (3 to 4 month of pregnancy, nmol/l)

Groups of goats (n) ³	Progesterone		Estradiol	
	s ²	x ¹	x	s
Control goats, gravid (7)	3.5	17	221	40
Rb-deficient goats, gravid (3)	4.0	15	209	17
Rb-deficient goats with abortions (3)	0.7	1.2	119	140
Fp ⁴ %	<0.001 7		>0.05 54	

x¹ = Arithmetic mean; s² = Standard deviation; n³ = Numbers; Fp⁴ = Significance level in one- or multifactorial variance analysis

Rats receiving 540 µg Rb/kg DM diet showed a reduced rubidium content in all tissues when compared with rats receiving 8120 µg Rb/kg DM (Yokoi et al. 1994). Hence, rubidium was designated as an essential element (Yokoi 1997).

The amount of rubidium in the food chain is much higher than that of other well-known essential trace elements, except for iron, manganese, and zinc. Rubidium deficiency experiments in six generations of animals showed that a rubidium offer of less than 280 µg/kg semi synthetic diet resulted in decreased feed intake, lower weight gain and an increased rate of abortion, while premature births were increased by up to 80%. A rubidium offer which meets the normative requirements appears important for the normal development of fetuses. A rubidium offer below 280 µg/kg food DM was apparently insufficient to normalize the body deposits. In practice, the rubidium offer to animals and humans is much higher, and consequently rubidium-deficiency symptoms are of no major concern. Experiments with 1000 µg Rb/kg feed DM resulted in normal growth and reproductive performance. Hence, it follows that the rubidium requirement of goats might reach < 400 µg/kg feed DM (Angelow 1994, Anke and Angelow 2004, Anke et al. 1997, Anke and Angelow 1994).

5. Toxicity of lithium and rubidium for the flora, fauna and man

5.1. Toxicity of lithium and rubidium for the flora

Increased lithium concentration in soils is toxic to some plant species. Citrus trees are known to be the most susceptible to injury by an excess of lithium, which is reported to be toxic at a concentration in leaves of 140 to 220 mg/kg DM. Threshold concentrations of lithium in plants are highly variable, and moderate to severe toxic effect of 4 to 40 mg Li/kg DM in citrus leaves have been observed. In high-lithium soils damage to root tips of corn as well as necrotic spots in the intervenal leaf tissues and other nonspecific injury symptoms have been observed (Kabata-Pendias and Pendias 2001). Calcium inhibits lithium uptake by plants, therefore the addition of lime to high-lithium soils may reduce toxic effects of this alkali-element.

Symptoms of rubidium toxicity are not registered.

5.2. Toxicity of lithium and rubidium for the fauna and man

5.2.1. Lithium

The consumption of > 50 mg Li/kg feed DM induced in all tested species (Table 31) side effects in form of reduced feed intake, decreased growth, increased netto energy effort for the production of 1 kg body weight or egg-production, raising the water consumption, weakness, anorexia, muscle trembling, lacrimation, lowered body temperature, increased mortality, which appears after giving 500 to 1000 mg Li/kg feed DM. Aggressivity and sexual activity of bulls with 100 and 200 mg Li/kg feed DM decreased. The amount of fat in the surroundings of the kidneys increased significantly. Their growth rate decreased. Lithium application to rodents induced like in piglets tremor and spasms (Anke et al. 1984, Regius et al. 1993, Drebeckas et al. 1983, Sikora et al. 1994, Kořla 1988, Szilagyi et al. 1996, 1991, Anke et al. 1985, 1997).

In psychiatric diseases 140 to > 280 mg Li/day were administered. This lithium dosis corresponds to 400 to > 800 mg Li/kg food DM and exceeds the nutritional lithium intake of peoples in Germany with mixed diets five to thousand fold.

Table 31: Effects of increasing amounts of lithium in the feed of farm animals

Species	Li concentration in the feed (mg/kg dry matter)	Effects
Cattle, growing	10 to 100mg Li/kg feed dry matter (DM) 100 to 200 mg Li/kg feed DM	Insignificant lowering of the feed intake and of the growth, significant decrease of the netto energy intake, growth rate libido sexualis and aggressiveness of bulls
Sheep, lamb	50 mg Li/kg feed DM 25 mg Li/kg feed DM	Decrease of the feed in take, growth rate and feed efficiency, no influence, birth weight of the lambs and their mortality
Rabbit	5 to 25 mg Li/kg feed DM	No effect on growth, negative and positive influences on immune systems
Piglet	30 and 60mg Li/kg body weight	Decrease of growth, anorexia, trembling of the muscles, burst into tears, lowered body temperature
Pig	125 to 1000 mg Li/kg feed DM 500 to 1000 Li/kg feed DM	Significant lowering of the feed intake and growth, increase of the water consumption, exitus in 92 days
Chicken	25 mg Li/kg feed DM	No effect on feed intake and growth
Hen	50 to 150 mg Li/kg feed DM	Decrease of feed intake, increase of feed effect for the productions of one kg egg, no increase of mortality
Horse	2 to 8g Li ₂ CO ₃ about 7 days	Increase of the lithium concentration in the serum, with symptoms of lithium intoxication

In Germany, the maximal imission dosis of lithium for cattle, sheep, pig, rabbit, horse and hens are 50 mg Li/kg feed DM (Anonymous 2005). Side effects of lithium are nausea, vomiting, anorexia, diarrhea, diabetes insipidus, hand tremor, muscle weakness, drowsiness, confusion, shurred speech, stupar, coma, goiter, hyperthyroidism, myocarditis (Weiner 1991).

5.2.2. Rubidium

The main problem of rubidium intoxication is to draw boundaries between the pharmacological and toxic effect of rubidium. For example rubidium was successfully used as a potential anti-depressant agent based on its ability to potential morphine – induced motor activity, drug for depressed manic depressive, and schizophrenic patients, but the side effects of the high rubidium intake as feed consume, growth rate, reproduction performance, mortality in animals

were not determined. Threshold values for a nutritional essential intake, a beneficial and a toxic effect of rubidium are need to distinguish beneficial and toxic effect of this alkali element. Like lithium, the three faces of rubidium must be identified.

The danger of rubidium exposure caused by geological or anthropogenic anomalies hardly exists. The occurrence of the naturally radioactive ^{87}Rb isotope (27.8%) is interesting at least (Anke and Angelow 2004). Kvicala et al. (1992) registered, that rubidium is concentrated in the intracellular space of cells during pathological and functional alternations of the thyroid. The addition of 2 to 5 mM RbCl significantly inhibited the N^+ , K^+ ATPase in guinea pigs (Ku et al. 1974, Knight and Nosek 1981).

In monkeys, very "large oral" doses of rubidium did not influence wellness. They took the drug without difficulties. Possible extra cellular (metabolic) acidosis and intracellular alkalosis may be potential causes for toxicity.

Purified diet containing up to 200 mg Rb/kg food DM were nontoxic, but levels 1000 mg/kg or more depressed growth, reproductive performance, and survival time in rats (Nielsen 1986). Reported LD_{50} values in rats in two studies were 586 or 900 mg/kg, respectively, for rubidium hydroxide, and 4708 or 3800 mg/kg, respectively, for rubidium iodide (Johnson et al. 1975).

6. Lithium and rubidium intake of man

The lithium intake of adult humans with mixed diets was systematically investigated in 10 test populations of 7 women and 7 men, each from different regions of Germany and aged between 20 and 69 years.

Table 32: Lithium and rubidium intake of adult Germans with mixed diets depending on time and gender ($\mu\text{g/day}$) on the average of a week (n 980,980)

Time	Lithium				Rubidium			
	Women	Men	Fp	%	Women	Men	Fp	%
A	374	419		112	1300	1384		106
B	713	990	<0.01	139	1623	1742	<0.05	107
Fp	<0.001				<0.001			
%	191	236			125	126		

The lithium intakes of peoples with mixed diet were significantly influenced by gender and time of estimation (Table 32). Since men consume 24% more dry matter than women (Anke et al. 1997b), they take in significantly more lithium than women (Table 32). After reunification of Germany (Time B), the lithium consumption doubled in East-Germany through the worldwide trade. Regional influences of the geological origin of the side disappeared partly. The individual lithium consumption of women on the average of a week (7 successive days) varied between 128 $\mu\text{g/day}$ and 1802 $\mu\text{g/day}$ and in men 139 and 3242 $\mu\text{g/day}$ (Figures 1 and 2). Worldwide, lithium intakes were reported between 4 and 2392 $\mu\text{g/day}$ on the average of populations (Schrauzer 2002, Anke et al. 2003, Van Couwenbergh et al. 1999, Schäfer 1997).

The rubidium intake of 10 test populations increased after reunification about a quarter. This finding is in good agreement with the significantly higher rubidium content in foodstuffs. Furthermore, it was registered that men consume only ~ 6% more rubidium than women although they eat ~ 24% more dry matter, than women. The reason for this result is, women prefer a rubidium richer diet, which contained 15% more rubidium in the consumed dry matter, most likely because women apparently prefer rubidium-richer foodstuffs (Cocoa products, coffee, fruits, vegetable). Men consume more animal foodstuffs with lower rubidium levels.

Despite the availability of apparently similar foodstuffs at all supermarkets, the location affected rubidium intake because of the different rubidium contents of drinking water. Notably, people who drank rubidium-rich drinking water from rubidium-rich gneiss regions took in significantly more rubidium than those in other areas. In Belgium, people with mixed diets took in

2.2 ± 0.3 mg Rb/day (Hendrix et al. 1997), which is similar to the Rb intake by German omnivores (Anke and Angelow 1995).

On average, the rubidium intake by both sexes decreased by about 15% from age 20 to age 60 years, but body weight had no effect on rubidium intake. It was also surprisingly that both sexes took in significantly more rubidium in winter than in summer, but this may have been due to a higher consumption of chocolate and coffee in winter than in summer (Anke and Angelow 1995, Anke et al. 1997, 1997a).

The local lithium intake of women varied between 220 and 1370 µg Li/day and in men between 180 and 2400 µg/day (Table 33). The reasons for this are variableness quite different. Beside individual eating habits, the different lithium content of the foodstuffs and beverages, gender (Table 32, 33), age (Table 34), and season (Table 35) varies the rubidium consumption.

Table 33: Lithium and rubidium intake of German adults with mixed diets depending on the location (µg/day)

Location	Lithium				Rubidium			
	Women	Men	p	%	Women	Men	p	%
Langensalza A	220 ^x	182 ^x	>0.05	83	990 ^x	1199	<0.01	121
Wusterhausen B	1369 ^{xx}	2392 ^{xx}	<0.001	175	1331	1104 ^x	<0.05	83
Wusterhausen A	442	545	<0.05	123	1300	1522	<0.05	117
Vetschau A	532	519	>0.05	98	1419	1368	>0.05	96
Langensalza B	1119	1370	>0.05	82	1358	1962	<0.001	144
Jena A	300	430	<0.01	143	1486	1445	>0.05	97
Greifswald B	330	473	<0.01	143	1819	1545	>0.05	85
Liebenstein B	615	641	>0.05	104	1572	1623	>0.05	103
Chemnitz B	390	522	<0.05	134	1633	2038 ^{xx}	<0.001	125
Freiberg B	457	545	>0.05	119	2290 ^{xx}	1967	>0.05	86
SLD	302	381	-	-	340	415	-	-
%	622	1314	-	-	231	185	-	-

^x = 100%, ^{xx} = x %

On average of the 10 test populations, the lithium intake corresponds with the different dry matter consumption of women and men (men consume 20% more lithium than women). The differences are mostly significant. Men eat, on average only 6% more rubidium than women. The consumption of rubidium-rich beverages (juice, coffee, cocoa) and especially chocolate transferred much more rubidium to the women.

Table 34: Lithium and rubidium intake with mixed diets depending on age (µg/day) (n 980,980)

Age, years	Lithium				Rubidium			
	Women	Men	Fp	%	Women	Men	Fp	%
20 to 29	511	654	<0.01	128	1586	1754	<0.001	111
30 to 39	516	572		111	1518	1697		112
40 to 49	630	806		128	1397	1501		107
50 to 69	663	955		144	1464	1462		100
Fp	<0.01		-		<0.001		-	
%	130	146	-		92	83	-	

The age of women and men varies the lithium and rubidium intake quite different (Table 34). Older people consume approximately one third more lithium and 10% few rubidium. Younger people prefer lithium poorer vegetable foodstuffs and older lithium-rich animal products. The decreased rubidium intake could be the lower consumption of coffee and chocolate by the older one.

Table 35: Rubidium intake of German adults with mixed diets depending on the season (µg/day) (n 294,294)

Season	Women	Men	Fp	%	Women	Men	Fp	Men
Summer	538	614	<0.001	114	1355	1520	<0.05	112
Winter	637	983		154	1702	1717		101
Fp	<0.001				<0.001			
%	118	160			126	113		

The body weight did not significantly varies the lithium and rubidium intake, but the season (Table 35). During winter, cold season, the consumption of both alkali elements increased significantly. The rise of the intake lithium and rubidium intake is more voluminous than the seasonal increase of the dry matter and energy intake of 5 to 10 % (Anke et al. 1997, 1997c).

7. Apparent absorption, excretion and balance of lithium and rubidium

The apparent absorption rate and the balance of the alkali element were only determined in three test-teams (Chemnitz, Freiberg, Bad Langensalza). Both gender excreted ~ 30% of rubidium intake faecally and ~ 70% renally (Table 36). The apparent absorption rate of rubidium amounted to 62% in women 67% in men.

Table 36: Rubidium intake, excretion, apparent absorption rate and balance of German peoples with mixed diet (n 588)

Parameter	Women		Men		p	%
	s	x	x	s		
Intake, µg/day	774	1764	1989	816	<0.05	113
urine µg/day	764	1594	1638	736	>0.05	103
Excretion faeces µg/day	755	679	660	523	>0.05	97
urine %	70.1		71.3			
faeces %	29.9		28.7			
Apparent absorption rate, %	61.5		66.8			
Balance µg/day	-509		-309			
%	-28.9		-15.5			

The rubidium balance of both sexes was negative. Generally, the alkali elements were extensively absorbed and renally excreted. Women and men with mixed diet excrete ~ 98.5 the ingested sodium and 85% of the potassium renally (Anke 2006c). Their apparent absorption rate amounted 98 and 83%, respectively. Rubidium follows both macro elements with ~ 60 and ~ 65%.

Discussion

The transfer of lithium and rubidium in the food chain of animal and man is unproblematic and supply plants, animals and man with abundant amounts of both elements (Kośla et al. 2001). Generally, the lithium intake of man can be estimated through the chemically analyses of both alkali elements in food duplicates (duplicate portion technique) or calculated through the basket method with registration of any consumption in written reports which enable to calculate the dietary intake. In our experiments, we used both methods (Table 37). Comparison of chemical assays with calculations of lithium and rubidium intake showed that the basket method overestimate the intake by lithium about 240% and rubidium by 166% (Anke 2004c). Hence, the basket method should no longer used.

Table 37: Lithium and rubidium intake of adults with mixed diet determined by the duplicate portion technique and calculated by the basket method

Element	Duplicate	Basket	Duplicate	Basket	%
Li $\mu\text{g/day}$	313	733	383	941	240
Rb $\mu\text{g/day}$	1657	2613	1699	2950	166

The maintenance of humans with both alkali elements happen trough different foodstuffs (Table 38). Lithium is supplied to two-third by animal foodstuffs (dairy products and meat) a quarter by vegetable food and only $\sim 10\%$ by beverages, whereas rubidium is delivered to $\sim$ a quarter by animal foodstuffs, one third by vegetable foodstuffs and approximately $\sim$ a half by beverages (coffee, tea, cocoa, juice) (Anke 2004c).

Table 38: Intake of lithium and rubidium through animal and vegetable foodstuffs respectively and beverages by people with mixed diets in percent

Element	Animal foodstuff	Vegetable foodstuff	Beverages
Lithium, %	62	25	13
Rubidium, %	23	32	45

The normative human requirement of lithium, is postulated to $< 100 \mu\text{g/day}$. In Germany, all 70 tested women and 70 men consumed $> 100 \mu\text{g Li/day}$ on the average of a week (Figure 3 and 4). The results suggested that lithium supplementation in nutritional levels to humans with low lithium intake can have a beneficial effect on human behavior (Dawson 1971, Schrauzer and Shrestha 1991).

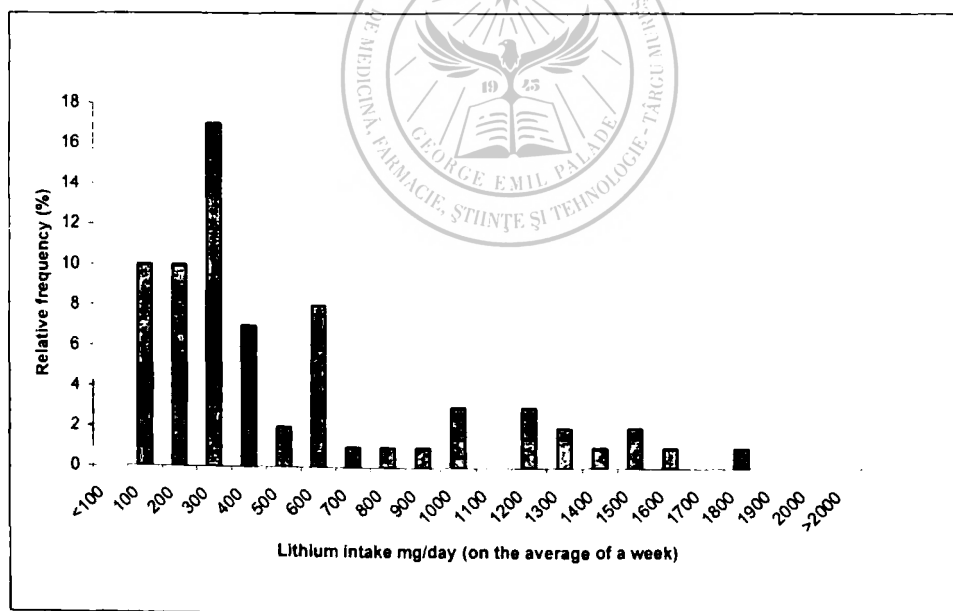


Figure 3: Frequency distribution of the daily lithium intake by women

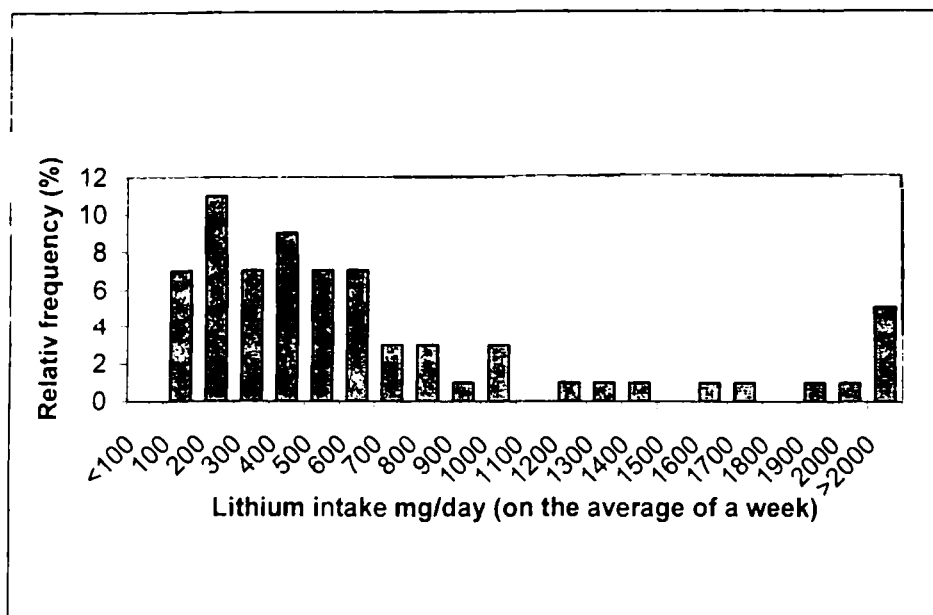


Figure 4: Frequency distribution of the daily lithium intake by men

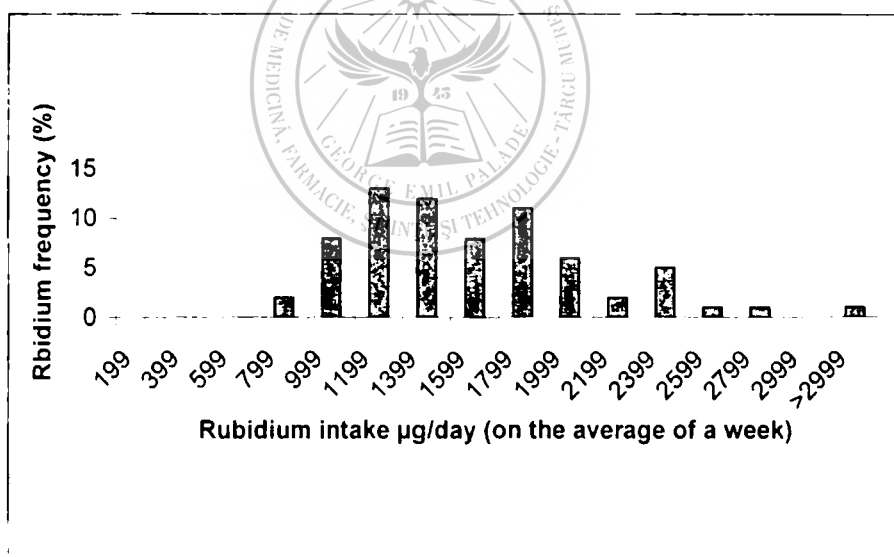


Figure 5: Frequency distribution of the daily rubidium intake by women

The delineate crossing of nutritional to beneficial lithium effects is not given, may be the beneficial role of lithium is a part of its nutritional importance. The pharmacotherapeutic effect of lithium (140 mg to > 280 mg Li/day) is associated with unpleasant side effects, including tremor of the hands, hypothyreosis, polyuria, polydipsia, acne psoriasis, edema, gastrointestinal problems, psychodynamic processes and malformations in newborn babies (Schäfer 2004, Müller-Oerlinghausen et al. 1997, Weiner 1991). All this symptoms demonstrate in animals toxic effects

and guided to the maximal imissions of 50 mg Li/kg feed DM for farm and wild animals. In humans, an acute intoxication risk existst when serum lithium concentration exceed 2.0 mmol/L (Müller-Oerlinghausen et al. 1997). In fact, with serum levels > 3.5 mmol/L there is danger to life (Kaschka 1997). Even serum levels > 1.0 mmol/L involve the risk of lithium poisoning, which manifests an irreversible damage of the kidneys and brain (Schou 1998, Schäfer 2004). The pharmacotherapeutic effects of lithium in humans are far from the nutritional needs and overlap with a lot of toxicological relevant "side effects" (Birch et al. 1995, Birch 1999, Ermidou-Pollet and Pollet 2002, Gallichio 1990a, b, Ribas et al. 1979, Xiong et al. 2004).

The pharmacotherapeutic effect of rubidium was interpreted as a potential antidepressant agent based on its ability to potentate morphine-induced motor activity.

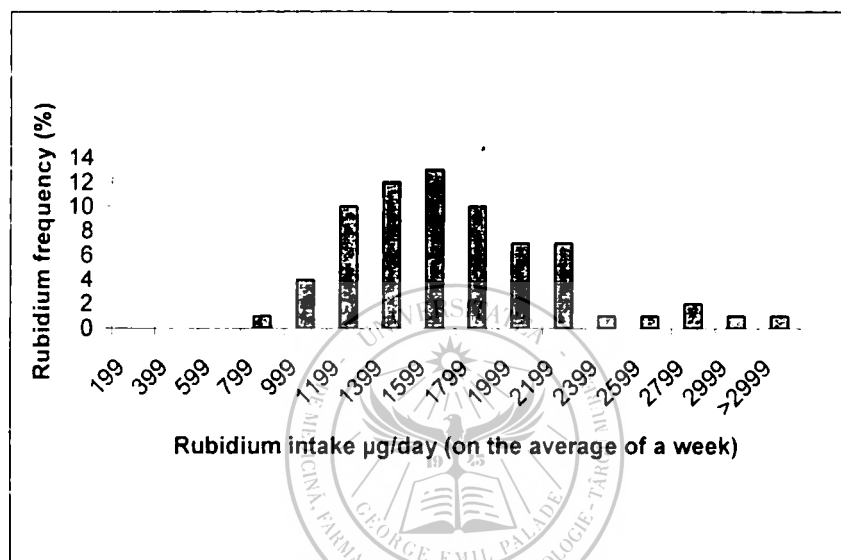


Figure 6: Frequency distribution of the daily rubidium intake by men

Rubidium was also successfully used as a drug for depressed, manic depressive and schizophrenic patients in amounts of 200 to 2000 mg/day. This rubidium concentration induced possibly toxic side effects, like lithium 200 mg Rb/kg feed DM were in rats nontoxic, but levels of 1000 mg/kg feed DM depressed growth reproductive performance and survival time in rats (Glendening et al. 1956). Possibly rubidium achieves, like lithium, similar pharmacotherapeutic effects, with fewer toxic side effects.

REFERENCES

1. ACOBETTRO RI, RIBAS, B, ORTIZ, T, TORRES, J.T. (1979) *Role of monoamine oxidase isoenzymes in rat motor activity after rubidium chloride treatment*. Biochem. Soc. Transactions 7, 534-540.
2. ANGELOW, L. (1994) *Rubidium in der Nahrungskette*. Qualification for lecturership Friedrich Schiller University, Faculty of Biology and Pharmacy, Jena, Germany.
3. ANGELOW, L., ANKE, M. (1994) *Rubidium in der Nahrungskette*. Mengen- und Spurenelemente 14, 285-300.

4. ANKE, M. (2004a) *Transfer of macro, trace and ultratrace elements in the food chain*. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M, editors. Elements and their Compounds in the Environment. Wiley – VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, pp. 101-126.
5. ANKE, M. (2004b) *Essential and toxic effects of macro, trace and ultratrace elements in the nutrition of animal*. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M, editors. Elements and their Compounds in the Environment. Wiley Verlag GmbH and Co. KGaA, pp. 305-341.
6. ANKE, M. (2004c) *Essential and toxic effects of macro, trace and ultratrace elements in the nutrition of man*. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M, editors. Elements and their Compounds in the Environment. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co KGaA pp. 343-367.
7. ANKE, M., ANGELOW, L. (1994) *The biological importance of rubidium*. In: Paris, I. editor. International Trace Element Symposium, Budapest, Hungary, pp. 241-262.
8. ANKE, M., ANGELOW, L. (1995) *Rubidium in the food chain*. Fresenius J. Anal. Chem. 352, 236-239.
9. ANKE, M., ANGELOW, L. (2004) *Rubidium*. In: Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoeppler, M. editors. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co KGaA, Weinheim, Germany: pp. 547-563.
10. ANKE, M., ANGELOW, L., GLEI, M., ANKE, S., LÖSCH, E., GUNSTHEIMER, G. (1997) *The biological essentiality of rubidium*. In: Ermidou-Pollet, S. (editor): International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives, G. Morogianni: Acharnai, Athens, Greece, pp. 245-263.
11. ANKE, M., ANGELOW, L., GLEI, M., MÜLLER, M., GUNSTHEIMER, U., RÖHRIG, B., ROTHER, C., SCHMIDT, P. (1997a) *Rubidium in the food chain of humans: Origins and intakes*. In: Fischer, P.W.F., L'Abbe, M.R., Cockell, K.A., Gibson, R.S., editors. Trace Elements in Man and Animals-9, NRC Research Press. Ottawa, pp.186-188.
12. ANKE, M., ANGELOW, L., SCHMIDT, A., GÜRTLER, H. (1993) *Rubidium an essential element for animals and man?* In: Anke, M., Meissner, D. and Mills, C.F. editors. Trace Elements in Man and Animals TEMA – 8, Verlag Media Touristik, Gersdorf, Germany, pp. 719-723.
13. ANKE, M., ARNHOLD, W., GLEI, M., MÜLLER, M., ILLING, H., SCHÄFER, U., JARITZ, M. (1995) *Essentiality and toxicity of lithium*. In: Kośia, T. (editor): Lithium in the Trophic Chain Soil – Plant – Animal- Man. Fundacja Rozwoj SGgW Warszawa, Poland, pp. 17-42.
14. ANKE, M., ARNHOLD, W., GROPPPEL, B., KRAUSE, U. (1991) *The biological importance of lithium*. In: Schrauzer, G.H., Klippel, G.H., editors. Lithium in Biology and Medicine, VHC, pp. 149-167.
15. ANKE, M., ARNHOLD, W., GROPPPEL, B., RICHTER, G., MEIXNER, B., ANGELOW, L. (1987) *Influence of lithium on feed- intake, growth and egg production of broilers and laying hens*. In: Pais, I. (editor) New Results in the Research of Hardly Known Trace Elements and the Analytical Problems of Trace Elements Research, University of Horticulture and Food Research, Budapest, Hungary, pp. 41-54.
16. ANKE, M., DORN, W., MÜLLER, M., RÖHRIG, B., GLEI, M., GONZALES, D., ARNHOLD, W., ILLING-GÜNTHER, H., WOLF, S., HOLZINGER, S., JARITZ, M. (1997b) *Der Chromtransfer in der Nahrungskette. 4. Mitteilung: Der Chromverzehr Erwachsener in Abhängigkeit von Zeit, Geschlecht, Alter, Körpermasse, Jahreszeit, Lebensraum, Leistung, Mengen- und Spurenelemente* 17, 912-927.
17. ANKE, M., GROPPPEL, B. (1989) *Fluormangelerscheinungen bei der Ziege. Mengen- und Spurenelemente* 9, 346-364.
18. ANKE, M., GROPPPEL, B., GRÜN, M., KRONEMANN, H., RIEDEL, E. (1981a) *Effects of Li-poor rations in ruminants*. In: Szentmihalyi S. editor. Conference on Feed Additives, Budapest, Hungary, pp. 245-248.
19. ANKE, M., GROPPPEL, B., KRONEMANN, H., GRÜN, M. (1983) *Evidence for the essentiality of lithium in goats*. In: Anke, M., Baumann, W., Bräunlich, H., Brückner, Ch., editors. 4 Spurenelementensymposium - Lithium, Universität Leipzig, Universität Jena, pp. 58-65.
20. ANKE, M., GROPPPEL, B., KUHNERT, E., ANGELOW, L. (1984) *Der Einfluß des Lithiums auf Futterverzehr, Wachstum und Verhalten von Schwein und Rind. Mengen- und Spurenelemente*, 4, 537-544.
21. ANKE, M., GRÜN, M., GROPPPEL, B., KRONEMANN, H. (1981b) *The biological importance of lithium. Mengen- und Spurenelemente* 1, 217-239.
22. ANKE, M., GÜRTLER, H., ANGELOW, L., GOTTSCHALK, J., DROBNER, C., ANKE, S., ILLING-GÜNTHER, H., MÜLLER, M., ARNHOLD, W., SCHÄFER, U. (1997c) *Rubidium- an essential element for animals and humans*. In: Fischer, P.W.F., L'Abbe, M.R., Cockell, K.A., Gibson, R.S., editors. Trace Elements in Man and Animals, TEMA- 9, NRC Research Press: Ottawa, Canada, pp. 189-191.
23. ANKE, M., RICHTER, G., MEIXNER, B., ARNHOLD, W., ANGELOW, L. (1985) *Der Einfluß des Lithiums auf den Futterverzehr, das Wachstum bzw. die Eiproduktion des Broilers und der Legehennen. Mengen- und Spurenelemente* 5, 412-419.
24. ANKE, M., SCHÄFER, U., ARNHOLD, W. (2003) In: Caballero, B., Trugo, L., Fringlas, P. editors. Encyclopedia of Food, Sciences and Nutrition. Elsevier Science Ltd., pp. 3589-3593.
25. ANONYMOUS (2005) *Maximale Immissionswerte für Lithium zum Schutz der landwirtschaftlichen Nutztiere*. VDI Richtlinie 2310 VDI/DIN, VDI/DIN- Handbuch Reinhaltung der Luft.

26. ARNHOLD, W. (1989) *Die Versorgung von Tier und Mensch mit dem lebensnotwendigen Spurenelement Lithium*. Doctoral thesis, University of Leipzig, Faculty of Animal Production and Veterinary Medicine.
27. ARNHOLD, W., ANKE, M. (1988) *Möglichkeiten der Identifizierung des Lithiumstatus*. Zentralblatt für Pharmazie, Pharmacotherapie und Labordiagnostik 127, 243-244.
28. ARNHOLD, W., ANKE, M., KRÄUTER, U. (1991) *Der Einfluß des Lithiummangels auf den Spurenelementstatus des Tieres*. Mengen- und Spurenelemente 11, 627-634.
29. BETTS, R.P., PASCHALIS, C., JARRATT, J.A., JENNER, F.A. (1978) *Nerve fibre refractory period in patients treated with rubidium and lithium*. J. Neur. Neurosurgery, Psychiatry 41, 971.
30. BIRCH, N.J. (1999) *Inorganic pharmacology of lithium*. Chem. Rev. 99, 2659-2682.
31. BIRCH, N.J., DAVIE, R.J., PADGHAM, C., GALLICCHIO, V.S. (1995) *Lithium therapy in practice: formulation, absorption and the pharmacokinetics of lithium*. J Trace Microprobe Techn 13, 27-41.
32. BIRCH, N.J., ROBINSON, D., INIE, R.A., HULLIN, R.P. (1978) *Lithium-6 stable isotope determination by atomic adsorption spectroscopy and its application to pharmacokinetic studies in man*. J. Pharm. Pharmacol. 30, 683-685.
33. CARROL, B.J., SHARP, P.T. (1971) *Rubidium and lithium opposite effects of amine-mediated excitement*. Science 172, 1355.
34. DAWSON, E.B. (1991) *The relationship of tap water and physiological levels of lithium to mental hospital admission and homicide in Texas*. In: Schrauzer, G.H., Klippel K.F., editors. Lithium in Biology and Medicine, VHC Weinheim pp. 171-187.
35. DEL SIGNORE, A., DI GIACOMO, F., GIACCIO, M. (1999) *Some biological properties of rubidium studied by means of the germinability tests*. Mengen- und Spurenelemente 19, 470-479.
36. DREBICKAS, V., DOROFJEVAITE, V., ZALINAITE, M., MISKINIENE, M., AIDUKONIENE, B. (1989) *Die Bedeutung des Lithiums für Labortiere*. In: Anke, M., Baumann, W., Bräunlich, H., Brückner, Chr. Editors. Lithium, 4. Spurenelementensymposium. Universität Leipzig und Jena. Wissenschaftliche Publikation der Friedrich-Schiller Universität Jena, pp. 76-77.
37. DUNNER, D.L., MELTZER, H.L., FIEVE, R.R. (1974) *Cerebrospinal fluid rubidium metabolism in depression*. Psychopharmacologia 37, 7.
38. ERMIDOU-POLLET, S., POLLET, S. (2002) *Neuroprotective effects of lithium. A review*. Mengen- und Spurenelemente 21, 1194-1201.
39. GALLICCHIO, V.S. (1990a) *Lithium and granulopoiesis: Mechanism of action*. In: Bach, R.O., Gallicchio, V.S., editors. Lithium and Cell Physiology, Springer-Verlag, New York, pp.82-93.
40. GALLICCHIO, V.S. (1990b) *Transport of the lithium ion*. In: Bach, R.O., Gallicchio, V.S., editors. Lithium and Cell Physiology, Springer-Verlag, New York, pp.47-57.
41. GLENDENING, B.L., SCHRENK, W.G., PARRISH, D.B. (1956) *Effects of rubidium in purified diets fed rats*. J. Nutr. 60, 563-569.
42. HENDRIX, P., VAN CAUWENBERGH, R., ROBBERECHT, H., DEELSKA, H. (1997) *Daily dietary rubidium intake in Belgium using duplicate portion sampling*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. 204, 165-167.
43. HORROBIN, D.F. (1991) *Lithium effects on fatty acid metabolism and their role in therapy of seborrhoeic dermatitis and herpes infections*. In: Schrauzer, G.H., Klippel, K.F. editors. Lithium in Biology and Medicine. VHC Weinheim, pp. 67-72.
44. JENNER, F.A., LEE, C.R., PASCHALIS, C., HILL, S.E., BURKINSHAW, L., JENNINGS, G. (1983) *Electrolyte metabolism in patients with periodic affective disorders during treatment with rubidium*. Psychopharm. 81, 301.
45. JOHANSSON, B., DOBROWOLSKI, J., OSMAN, K., LILJEFOTS, T. (1992) *Determination of some elements in erythrocytes and placenta in Upper Silesia (Poland) using ICP-MS*. J. Trace Elements Med. 5, 117-119.
46. JOHNSON, G.T., LEWIS, T.R., WAGNER, W.D. (1975) *Acute toxicity of caesium and rubidium compounds*. Toxicol Pharmacol 32, 239-245.
47. KABATA-PENDIAS, A., PENDIAS, H. (2001) *Trace Elements in Soils and Plants*. 3rd edition, CRC Press, Boca Raton, pp. 89-92.
48. KASCHKA, W.P. (1997) *Die Lithiumintoxikation*. In: Müller-Oelinghausen, B., Grell, W., Berghöfer, A. editors. Die Lithiumtherapie. Nutzen, Risiken, Alternativen, 2. Edition, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 424-434.
49. KNIGHT, R.B., NOSEK, T.M. (1981) *Effects of rubidium contractility and sodium pump activity in guinea-pig ventricle*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 219, 573-579.
50. KOŚLA, T. (1988) *Mengen- und Spurenelementstatus, -bedarf und -versorgung des Pferdes*. Habilitationsschrift Universität Leipzig, Sektion Tierproduktion und Veterinärmedizin Leipzig.

51. KOŚLA, T., SKIBNIEWSKA, E., DEBSKI, B., URBANSKA-SLANKA, G. (2001) *Rubidium in the trophic chain soil-plants-animals*. In: Ermidou-Pollet, S., Pollet, S. editors. 3rd International Symposium on Trace Elements in Humans: New Perspectives. G. Moroganis, Achamai, Greece, pp. 190-203.
52. KU, D., AKERA, T., TOBIN, T., BRODY, T.M. (1974) *Effects of rubidium on cardiac tissue: Inhibition of Na^+K^+ - ATPase and stimulation of contractile force*. Res. Commun. Chem. Path. Pharm. 9, 431-440.
53. KUMPULAINEN, J., TAHVONEN, R. (1990). *Characterization of a total diet reference material (ARC/CL HDP) for contents of essential and toxic elements*. Fresenius J. Anal. Chem. 338, 461-465.
54. KVIČALA, J., HAVELKA, J., NĚMEC, T., ZEMAN, V. *Selenium and rubidium changes in subjects with pathologically altered thyroid*. Biological Trace Element Research 32, 253-258.
55. MESSIHA, F.S., LARSON, J.W. (1976) *A pharmacokinetic study of rubidium and cesium salts*. Proc. West. Pharmacol. Soc. 19, 108.
56. MÜLLER-OELINGHAUSEN, B., GREIL, W., BERGHÖFER, A. (1997) *Praktische Ratschläge zur Durchführung und Kontrolle einer Lithiumbehandlung*. In: Müller-Oelinghausen, B., Greil, W., Berghöfer, A. editors. Die Lithiumtherapie. Nutzen, Risiken, Alternativen, 2. Edition. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg, pp. 547-569.
57. NIELSEN, F.H. (1986) *Rubidium*. In: Mertz W., editor. Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Academy Press, Inc. Orlando, pp. 431-434.
58. ONO, T., WADA, O., YAMAMOTO, M. (1992) *Study on the essentiality of lithium*. Biomedical Research on Trace Elements, 3, 41-47.
59. PICKETT, E.E. (1983) *Evidence for the essentiality of lithium in the rat*. In: Anke, M., Baumann, W., Bräunlich, H., Brückner, Ch., editors. 4. Spurenelementsymposium – Lithium, Universität Leipzig, Universität Jena, pp. 66-70.
60. REGIUS, A., ANKE, M., SARDI, J., MUCSY, I. (1993) *Effect of lithium supplementation on performance of ewes and growing lambs*. In: Anke, M., Meissner, D., Mills, C.F., editors. Trace Elements in Man and Animals TEMA - 8, pp. 603-604.
61. RIBAS, B., ACOBETTO, R.I., MATE, C., SANTOS, A. (1979) *Role of monoamine oxidase isoenzymes in rat motor activity, after rubidium chloride treatment*. Biochem. Soc. Trans 7, 533-536.
62. RIBAS, B., ACOBETTO, R.I., MATE, C., RUIZ, A.S. (1979) *Some effects of rubidium chloride on the motor activity and brain serotonin concentration of rats*. Biochem. Soc. Transactions 7, 533-536.
63. SANGHVI, I., GERSHON, S. (1973) *Rubidium and lithium: Evaluation as antidepressant and anti-manic agents*. Res. Comm. Chem. Path. Pharm. 6, 293.
64. SCHÄFER, U. (1997) *Essentiality and toxicity of lithium*. J. Trace Microprobe Techn. 15, 341-349.
65. SCHÄFER, U. (1998) *Past and present conceptions concerning the use of lithium in medicine*. J. Trace and Microprobe Techn. 16, 535-556.
66. SCHÄFER, U. (2004) *Lithium*. In: Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoeppeler, M. editors. Elements and their Compounds in the Environment. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, pp. 479-496.
67. SCHOU, M. (1998) *Lithium treatment of manic-depressive illness: a practical guide*, 6th edition, Karger, Basel.
68. SCHRAUZER, G.N. (2002) *Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality*. J. Amer. Coll. Nutrition, 21, 14-21.
69. SCHRAUZER, G.N., SHRESTHA, K.P. (1991) *Lithium in drinking water and the incidences of crimes, suicides, and arrest related to drug addictions*. In: Schrauzer, G.H., Klippel, K.F., editors. Lithium in Biology and Medicine, VHC Weinheim, pp. 191-203.
70. SIKORA, J., KLUCINSKI, W., KLECZKOWSKI, M., WINNICKA, A., DEMBELE, K. (1994) *Initial studies of the pharmacokinetics of lithium in horses*. Mengen- und Spurenelemente 14, 659-661.
71. SPIRITES, M.A., GAREY, R.E. (1975) *Serum erythrocyte and CNC levels in rhesus monkeys of orally and intravenously administered rubidium salts*. Biol. Psych. 10, 219.
72. SYME, G.J., SYME, L.A. (1979) *Inhibition of activity in rats by rubidium chloride*. Psychopharmacology 61, 227.
73. SZILAGYI, M., SURI, A., BALOGH, I., ANKE, M., BORKA, G. (1996) *Lithiumdagolast követő biokémiai és morfológiai változások malcokon*, Magyar Allatorvosok Lapja 45, 231-236.
74. SZILAGYI, M., ANKE, M., BALOGH, I., REGIUS-MOCSENYI, A., SURI, A. (1989) *Lithium status and animal metabolism*. In: Anke, M. et al. editors. 6th International Trace Element Symposium, Vol.4, University Leipzig, University Jena, pp. 1249-1261.
75. SZILAGYI, M., ANKE, M., BALOGH, I., REGIUS-MOCSENYI, A., SURI, A. (1991) *Lithium status and animal metabolism*. In: Yüregir, G.T. et al. (eds) Trace'89. Cukurova University, Medical Faculty, Adama, Turkey, pp. 107-118.
76. VAN CAUWENBERGH, R., HENDRIX, P., ROBBERECHT, H., DEELSTAR, H. (1999) *Daily dietary lithium intake in Belgium using duplicate portion sampling*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 208, 253-255.

77. WEINER, M.L. (1991) Overview of lithium toxicology. In: Schrauzer, G.N., Klippel, K.F. (editors) VCH, Weinheim, Germany, pp. 87-99.
78. WEISCHER, M.-L. (1979) *Einfluß von Lithium und Rubidium auf Neugierverhalten und lokomotorische Aktivität isoliert gehaltener männlicher Mäuse*. Psychopharmacology 61, 263.
79. XIONG, S., LOVELL, M.A., ASHFORD, J.W. GORMAN, L.S., MARKESBERY, W.R., XIE, C., WANG, J. SMITH, J.L., GALLICCHIO, V.S. (2004) *Lithium inhibits tau hyperphosphorylation mediated by glycogen synthase kinase 3 and protein phosphatase 2A in the hippocampus of eight week and twelve month old starved mice*. Mengen- und Spurenelemente 22, 1763-1799
80. YOKOI, K. (1997) *A study on possible essentiality nature of tin and rubidium*. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 50, 15-20.
81. YOKOI, K. KIMURA, M., ITOKAWA, Y. (1994) *Effect of low- rubidium diet on macro- mineral levels in rat tissues*. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci 50, 295-299.



Biológiailag aktív diterpénalkaloidok izolálása Kárpát-medencében előforduló *Aconitum* fajokból

Hohmann Judit¹, Csupor Dezső¹, Borcsa Botond¹, Forgó Péter², Molnár Attila³
Csedő Károly⁴, Máthé Imre¹

¹ Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézet, 6720 Szeged, Eötvös u. 6.

² Szegedi Tudományegyetem, Szerves Kémia Tanszék, Szeged

³ Debreceni Egyetem, Növénytan Tanszék, Debrecen

⁴ Marosvásárhelyi Orvosi Gyógyszerészeti Egyetem, Farmakognózia Intézet, Marosvásárhely

Plants of the family Ranunculaceae are known to produce a high variety of diterpene and norditerpene alkaloids. Many compounds exhibit high toxicity and a broad spectrum of pharmacological activities. In the course of our study the diterpene alkaloids of Aconitum anthora, A. vulparia, A. toxicum and A. moldavicum were investigated. The compounds were isolated from the alkaloid-containing fractions by means of multistep chromatographic purification, using CC, VLC, PLC, CPC and gelchromatography. The structures were determined with the aid of mass spectrometry and advanced NMR techniques. Several new norditerpene alkaloids were identified from A. vulparia and A. toxicum. With except of isothalatisidine, delcosine and lycoctonine all alkaloids were reported for the first time from the investigated plants. Some of the isolated alkaloids are structurally very similar to compounds, which were active in different in vitro and in vivo experiments, thus the pharmacological investigation of the alkaloids reported here seems to be reasonable.

Keywords: Aconitum anthora, Aconitum vulparia, Aconitum moldavicum, Aconitum toxicum, Ranunculaceae, diterpenealkaloids.

BEVEZETÉS

Aconitum fajokat és hatóanyagaikat évezredek óta alkalmazták a gyógyászatban különböző civilizációkban. Az európai hivatalos orvoslás a XIX. században az *Aconiti tubert*, ennek tinktúráját, extraktumát és tiszta hatóanyagát, az akonitint használta neuralgiás kórképek kezelésére, majd ezek a készítmények toxicitásuk és az alkaloidtartalom nagyfokú ingadozása miatt fokozatosan kiszorultak a terápiából. Ma az egyre népszerűbbé váló homeopátiás gyógyászat termékeiben találkozhatunk *Aconitum* kivonatokkal, ilyen készítmények egyre növekvő számban jelennek meg az európai gyógyszerpiacon.

A távol-keleti medicina (Kína, India, Japán, Kórea) számára az *Aconitum* drogok nemcsak történeti jelentőségűek, alkalmazásuk különbözőképpen feldolgozott készítmények formájában mind a mai napig fennáll. Fájdalomcsillapító, antireumatikus és kardiotonikus hatású termékek és külsőleg helyi érzéstelenítőként alkalmazott készítmények ma is a medicina fontos részét képezik [Hou 2005]. Az *Aconitum* fajok mint erős fiziológiai aktivitású vegyületek forrásai más szempontból is érdekesek a gyógyszerészet, a gyógyszerkutatás számára. Fő hatóanyagaik, a diterpén- és norditerpénalkaloidok markáns kardiovaszkuláris és központi idegrendszeri hatással rendelkeznek, ezért gyógyszerfejlesztések vezérmolekulái vagy ötletadó vegyületei. A diterpénalkaloidok erős fiziológiai aktivitása leggyakrabban a feszültségfüggő Na-csatornára kifejtett, a vegyületek szerkezetétől függően aktiváló vagy gátló hatásnak tulajdonítható, amelynek következtében antinociceptív, antiaritmiás vagy antiepileptikus hatást fejtenek ki [Ameri 1998, Frise 1997]. Az 1980-as évek végén forgalomba hoztak egy tiszta alkaloidot (lappakonitin) tartalmazó gyógyszert, melyet antiaritmiás szerként

alkalmaznak a gyógyászatban. További ígéretes gyógyszerjelölt molekula a metil-likakonitin, amely már nanomoláris koncentrációban kompetitív antagonistát hatást fejt ki az α -bungarotoxin-érzékeny nikotinos acetilkolinreceptorokon. Ez a vegyület a Parkinson-kór, a szkizofrénia, a Tourette-szindróma gyógyítására kifejlesztendő gyógyszerek kutatásában játszik szerepet [Caroll 2007, Hardick 1996]. További *Aconitum*-alkaloidok a GABA_A-receptoron kifejtett hatásuk következtében kiemelt érdeklődésre tartanak számot [Zhao 2003].

Az *Aconitum*-alkaloidok érdekes farmakológiájuknak, magas aktivitásuknak köszönhetően intenzíven kutatott vegyületek, ma egyre növekvő igény mutatkozik újabb, a gyógyszerfejlesztés számára perspektivikus vegyületek megismerésére, a vegyületcsoport farmakológiájának, toxikológiájának mélyebb értékelésére. Munkacsoportunk 2002-ben indította el kutatási programját, amelynek célja a Kárpát-medencében honos *Aconitum* fajok diterpénalkaloidjainak izolálása, szerkezet-azonosítása és farmakológiai vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Növényi nyersanyagok: Az *Aconitum vulparia* Rchb. föld feletti részét Nagyvázsöny térségében, az *A. toxicum* Rchb. gyökerét Maroshévíz mellett, az *A. anthorat* L. a Füzéri várhegyről és Tar-kőről, az *A. moldavicum* L. Kárpátalján gyűjtöttük be.

Extrakció, kromatográfia: A növényi nyersanyagok kivonását metanollal perkolálással végeztük. A folyadék-folyadék közti megosztás különböző pH-értéken kloroformos kirázással történt. Oszlopkromatográfiához szilikagél (Silica gel 60, 0,063-0,200 mm, Merck), poliamid (ICN) és alumínium-oxid (Aluminiumoxide Neutral, Brockmann II, Reanal) állófázist használtunk. A vákuum-folyadékkromatográfiás elválasztások során alumínium-oxid (Aluminiumoxide G, Type E, Merck) és fordított fázisú szilikagél (LiChroprep RP-18, 25-40 μ m, Merck) állófázist alkalmaztunk. A preparatív rétegekromatográfiás elválasztást szilikagél (20x20 cm Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck) és alumínium-oxid (20x20 cm Aluminiumoxide 60 F₂₅₄) TLC-lemezen végeztük. A gélekromatográfiás elválasztás során Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) állófázist alkalmaztunk. A centrifugális rétegekromatográfiás elválasztást Chromatotron típusú készülékkel (Model 8924, Harrison Research) saját készítésű alumíniumoxid- és szilikagél-rétegen végeztük.

Szerkezetmeghatározás: Az izolált vegyületek szerkezetét NMR spektroszkópiás módszerek [Bruker Avance DRX 500 spektrométer, 500 (¹H), illetve 125 MHz (¹³C); ¹H-NMR, JMOD, ¹H,¹H-COSY, NOESY, HSQC és HMBC spektrumok] és nagyfelbontású tömegspektrometriás mérések (Finnigan MAT 65 S és VG ZAB SEQ hibrid tömegspektrométer) segítségével határoztuk meg.

EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS

Az *Aconitum* fajok diterpénalkaloidjainak izolálását megelőzően különböző lelőhelyről származó növényminták és különböző növényrészek alkaloidösszetételének és alkaloidtartalmának rétegekromatográfiás szűrővizsgálatát végeztük el. A klasszikus alkaloid izolálási módszerrel készített extraktumokat szilikagél rétegen teszteltük Dragendorff-reagenssel végezve a detektálást. Magas alkaloidtartalom és gazdag alkaloidösszetétel mutatkozott négy faj, az *A. vulparia*, *A. anthora*, *A. toxicum* és *A. moldavicum* esetén, így ezeket választottuk ki részletesebb növénykémiai vizsgálatok céljára.

Az egyes fajok preparatív feldolgozása különbözőképpen történt a jelenlévő alkaloidok és kísérőanyagok eltérő fizikai, kémiai tulajdonságai miatt. Az *A. anthora* esetén az általánosan alkalmazott alkaloidizolálási technika, amely metanolos extrakciót, majd a kivonat savas és lúgos pH-értéken történő folyadék-folyadék közti megosztását foglalja

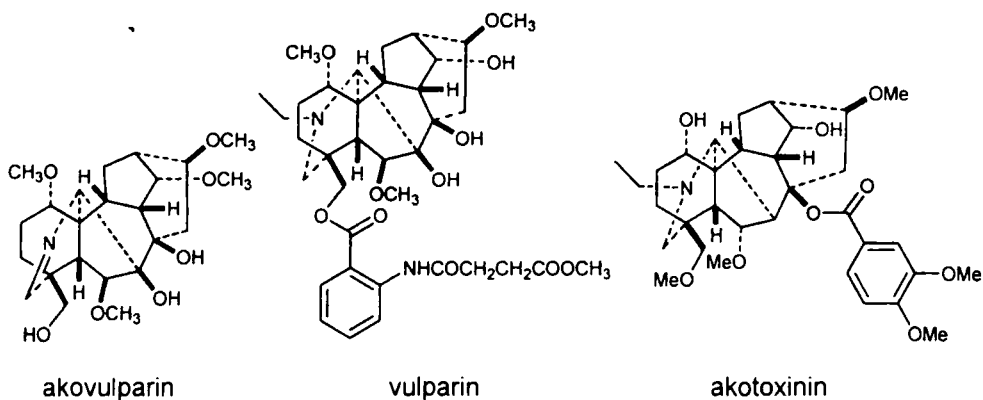
magába, eredményes elválasztását eredményezett. A savas közegből kirázott lipofil frakció a ballasztanyagokat tartalmazta, a lúgos közegből ezt követően nyert lipofil frakcióban pedig az alkaloidok dúsultak fel. Az *A. vulparia* alkaloidjainak kinyerése esetén ez a klasszikus eljárás csak bizonyos módosításokkal volt alkalmazható, ugyanis a savas pH-értéken kapott kloroformos frakció is tartalmazott alkaloidokat. Ezeket a komponenseket ismételt fáziscserével sikerült a nagy mennyiségű klorofilltól elválasztanunk. Az *A. toxicum* esetén egy új, pH-változtatás nélküli, az esetleges bomlás, műtermékképződés esélyét csökkentő elválasztási módszert dolgoztunk ki. A metanolos kivonatot oszlopkromatográfiával, poliamid szorbensen tisztítottuk 20%-os és 40%-os MeOH-lal végezve az eluálást a klorofill és a fenolos vegyületek eltávolítása céljából. A 20%-os MeOH-lal nyert eluátumban halmozódtak fel az alkaloidok, ezen kívül klorofill és más kísérőanyagok csak kis mennyiségben voltak jelen. Az *A. moldavicum* esetén ugyancsak egy továbbfejlesztett, módosított izolálási eljárást alkalmaztuk, amelyre azért volt szükség, mert a pH-grádiens alkaloidkinyerés (fáziscsere) nem biztosította az alkaloidok és ballasztanyagok elválasztását. A kidolgozott új eljárás nemcsak megfelelően szelektív, de egyúttal kíméletes is, az észtertípusú diterpénalkaloidok bomlás nélküli kinyerését tette lehetővé. Az *A. moldavicum* gumójából metanolos kivonatot készítettünk, majd ezt alumínium-oxid oszlopkromatográfiával grádiens elúcióval frakcionáltuk.

A különböző kísérletekben nyert alkaloidfrakciókat többlépéses kromatográfiás [vákuum-folyadékkromatográfia (VLC), centrifugális rétegekromatográfia (CPC), oszlopkromatográfia (CC), gélkromatográfia (GC), preparatív rétegekromatográfia (PLC)] elválasztással tisztítva nyertük a tiszta vegyületeket. Az izolálás során normál és kémiaiag módosított szilikagél és alumínium-oxid állófázist valamint különböző összetételű mozgófázisokat használtunk; a géltráfrációt metanollal, acetonnal vagy kloroform-metanol 1:1 eleggyel végeztük Sephadex LH-20 gélen.

Az izolált anyagokat spektroszkópai módszerek segítségével azonosítottuk, elsősorban egy- és kétdimenziós NMR módszereket (^1H -NMR, JMOD, ^1H , ^1H -COSY, NOESY, HSQC és HMBC) és tömegspektroszkópiát (HREIMS, HRESIMS) alkalmaztunk. Meghatároztuk a vegyületek jellemzésére szolgáló spektrális adatokat (^1H -, ^{13}C -NMR kémiai eltolódásértékek, csatolási állandók, ultraibolya elnyelés) és fizikai jellemzőket (olvadáspont, optikai forgatóképesség).

Az ^1H -NMR és JMOD spektrumok adatait irodalmi adatokkal összevetve először arról tájékozódunk, hogy ismert vagy új vegyületről van-e szó, majd az újnak mutatkozó vegyületekkel teljes szerkezetanalízist végeztünk. Ennek keretében a JMOD és HSQC spektrumok alapján azonosítottuk a molekulát felépítő metil-, metilén- metincsoportokat, kvaterner szénatomokat és szubsztituenseket, majd a skaláris proton-proton kölcsönhatásokat értékeltük, s így molekula-részszerkezeteket vezettünk le. Ezek kapcsolódását heteronukleáris távolható korrelációk segítségével bizonyítottuk. A molekulakonstitúció azonosítása után vizsgáltuk az alkaloidok térbeli szerkezetét a NOESY spektrumokban detektált Overhauser-effektusok felhasználásával, és meghatároztuk valamennyi királis szénatom konfigurációját. Néhány esetben hasonló részletességű NMR vizsgálatot végeztünk korábban már ismert vegyületekkel is irodalomban még nem közölt spektrális adataik meghatározása céljából.

Munkánk eredményeként új norditerpénalkaloidokat azonosítottunk, így a vulparint, akovulparint és akotoxinint (1. Ábra), valamint korábban már ismert vegyületeket (izotalatizidin, izotalatizidin-8,14-dimetiléter, hetizinon, szeptentriodin, delkozin, likoktonin, antranoil-likoktonin, *N*-dezetil-*N*-metil-likoktonin, finetiadin, delektinin, akonitin, szongorin, szongoramin) nyertünk.



1. Ábra Új norditerpénalkaloidok az *Aconitum vulpari*ából (akovulparin, vulparin) és az *A. toxicumból* (akotoxinin)

Három komponens (izotalatizidin, delkozin, likoktonin) kivételével valamennyi diterpén- és norditerpénalkaloidot elsőként mutattunk ki az adott növényfajból.

Az izolált diterpénalkaloidok farmakológiai vizsgálata a szerkezetek ismeretében igen perspektivikusnak tűnik. Több vegyület nátriumcsatorna blokkoló és aktiváló, nikotinos acetilkolinreceptoron és GABA receptoron ható molekulákkal szoros szerkezeti rokonságot mutat. Az általunk nyert anyagok központi idegrendszeri hatásának elektrofiziológiai vizsgálata a Pécsi Tudományegyetem Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Intézetében megkezdődött. Patkányagy neokortikális, hippokampális és talamikus neuronokon *in vivo* vizsgálatuk folyik.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Richter Centenárium Alapítványnak a kutatási program támogatásáért.

IRODALOM

1. AMERI A – *The effects of Aconitum alkaloids on the central nervous system*, Prog Neurobiol, 1998, 56:211-235.
2. CARROLL IF, MA W, NAVARRO HA et al – *Synthesis, nicotinic acetylcholine receptor binding, antinociceptive and seizure properties of methyllycaconitine analogs*, Bioorg Med Chem 2007, 15:678-85.
3. FRIESE J, GLEITZ J, GUTSER UT et al – *Aconitum sp. alkaloids: the modulation of voltage-dependent Na⁺ channels, toxicity and antinociceptive properties*, Eur J Pharmacol, 1997, 337:165-174.
4. HARDICK DJ, BLAGBROUGH I, COOPER SG et al – *Nudicauline and elatine as potent norditerpenoid ligands at rat neuronal α -bungarotoxin binding sites: Importance of the 2-(methylsuccinimido)benzoyl moiety for neuronal nicotinic acetylcholine receptor binding*, J Med Chem 1996, 39:4860-4866.
5. HOU JP, JIN Y - *The healing power of Chinese herbs and medicinal recipes*, The Haworth Integrative Healing Press, New York – London - Oxford 2005, 328-331.

6. ZHAO XY, WANG Y, LI Y, CHEN XQ, YANG HH, YUE JM, HU GY – *Songorine, a diterpenoid alkaloid of the genus Aconitum, is a novel GABA(A) receptor antagonist in rat brain*, Neurosci Lett 2003, 337:33-36.



BioArena as biodetection system in the study of plant ingredients

Ernő Tyihák¹, Zsuzsa Király-Véghely¹, György Kátay¹, Ágnes M. Móricz², Péter G. Ott¹

¹ Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, P.O.B. 102, Budapest, Herman O. str. 15, H-1525, Hungary

² Department of Chemical Technology and Environmental Chemistry, L. Eötvös University, P.O.B. 32, Budapest 112, H-1518, Hungary

Corresponding author: Ernő Tyihák, Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, P.O.B. 102, H-1525 Hungary

E-mail address: etyih@nki.hu

The BioArena system, which integrates the up-to-date methodology and biological results of conventional bioautography with planar layer chromatographic techniques (advantageously with linear off-line OPLC), is especially suitable for investigating biochemical interactions in an adsorbent layer after chromatographic separation. The results from BioArena show that formaldehyde (HCHO) which can originate from pathogen cells in some situations or from methylation-demethylation-oxidation processes in the spots, can play a special role in the antibiotic activity of trans-resveratrol and other antibiotic-like compounds. However, when L-arginine and glutathione were used as endogenous HCHO-capturing molecules in the culture medium the antimicrobial activity of the antibiotic compounds on the adsorbent layer decreased substantially. Cu(II) ion as HCHO mobilizing and coordinating molecule could increase dramatically the antibiotic effect of trans-resveratrol. HCHO and H₂O₂ as normal endogenous components are present in different cells so there is a possibility for their interaction in which singlet oxygen can be formed. This very reactive oxygen derivative can oxidize the water molecules and so H₂O₃ forms from which with disproportion – among others – ozone can be formed in the chromatographic spots as well. The elimination of ozone from the chromatographic spots results in the decrease of the antibiotic effect of antibiotics.

Key words: antibiosis, antibiotics, BioArena, bioautography, formaldehyde cycle, formaldehydome, OPLC, ozone, TLC

The infectious agents can be the causes or risk factors for various human diseases, which are one of the most changeable and exciting areas of clinical practice [10,11]. It is especially important fact that e.g. 98% of death of children in developing countries is resulted from infectious diseases [3].

Among the cell proliferation promoting and retarding factors antibiotics are the most important molecules, which are originating from the antibiosis processes [4]. The word antibiotic is very broad and includes widely disparate mechanisms. Although the „antibiotic era” is barely five decades old, mankind is now faced with the global problem of emerging resistance in virtually all pathogens. Surveys have revealed that almost no group of antibiotics was introduced to which resistance has not been observed [5]. The resistance of microbial strains to antibiotics is a big problem in the field of antimicrobial animal and human therapy [25]. Due to increasing microbial resistance in medicine and agriculture, discovery of new antibiotics is an especially important research objective.

The biological systems as microbes or plants contain thousands of constituents and are a valuable source of new and biologically active molecules e.g. antibiotics, antineoplastics, herbicides and insecticides [3,24]. Medicinal plants have been used for centuries as remedies for different human diseases: they contain substances of therapeutic value. For their investigation, it is important to have suitable biological assays and chemical screening methods. Modern aspects of the biological detection mean the discovery of new antimicrobial agents with novel modes of action through mechanism of

action investigations to bioactivity-guided fractionation/isolation and development of animal experimental model.

In this paper we summarize the advantages of BioArena as a complex bioautographic system in the study of plant ingredients.

TECHNICAL AND BIOCHEMICAL BACKGROUND OF THE INVESTIGATIONS

Technical background

The biological potential of the direct bioautography is much bigger than it seems from excellent up-to-date results. The exploitation of this potential occurs in the so-called BioArena system [20,21], which is the first further development of the original direct bioautography.

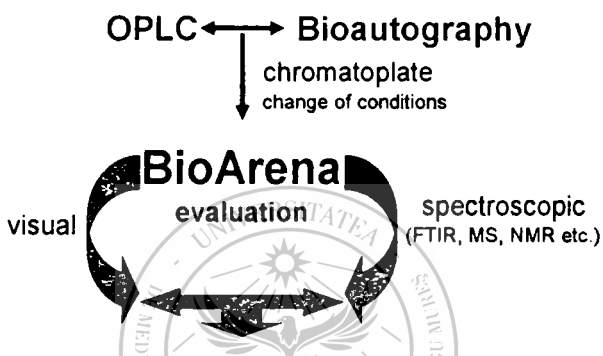


Figure 1. The main steps of the BioArena

(From Tyihak E et al J Planar Chromatogr, 2005,18. 67. With permission).

Figure 1. shows the basic elements of the BioArena [20,21]. It has to be pointed out that BioArena is based on the direct bioautography with exploitation of its all advantages. It is a system which integrates the advantages of planar layer liquid chromatography (ideally, versions of linear off-line OPLC [15,19]) and basic direct bioautography [1,2] as well as visual and spectroscopic evaluation of spots before and after inoculation. This integration utilizes the possibilities of interactions of microbes with dye substances and with other small and large co-factor molecules in the planar layer adsorbent bed after a chromatographic separation. These endogenous and/or exogenous molecules are available unlimitidly for the cells of the indicator organism from the culture medium on the adsorbent layer [20,21].

Occurrence and role of HCHO in biological systems - formaldehydome system

Study of the interactions between microbes or other living cells and antibiotic-like (more exactly, cell proliferation influencing) compounds and key endogenous and characteristic exogenous molecules on a planar layer adsorbent bed promises to furnish new information about the function and role of formaldehyde (HCHO) as a small, indispensable, endogenous molecule during the cell proliferation, differentiation and disease resistance in general [17].

HCHO - similarly to hydrogen peroxide (H_2O_2) another small molecule – is an endogenous component, mainly in the form of hydroxymethyl groups, of all biological systems [17,18]. It is typically formed during enzymatic methylation and demethylation

processes, but there are other origins of this simplest aliphatic aldehyde in biological systems [8,17,18]. It has become increasingly evident that there is a primary HCHO cycle in biological systems in which the S-methyl group of L-methionine can be formed from HCHO originating from natural HCHO generators and that the HCHO-yielding function of S-adenosyl-L-methionine (SAM) is an essential component of this fundamental biological pathway [17,18].

The term "formaldehydome" means the complete set of HCHO-cycle-mediated and non-mediated HCHO pathways of a given biological unit (Figure 2). The quality of the distribution of HCHO molecules in methyl and/or hydroxymethyl/formyl groups (e.g. hypo- or hypermethylated regions in DNA or methyl groups in histones) and at the same time the demethylation of the different methylated/hydroxymethylated compounds (e.g. demethylation of N-methylated L-lysine molecules in histones [9]) fundamentally affect the composition of the formaldehydome and give a characteristic profile for a biological unit.

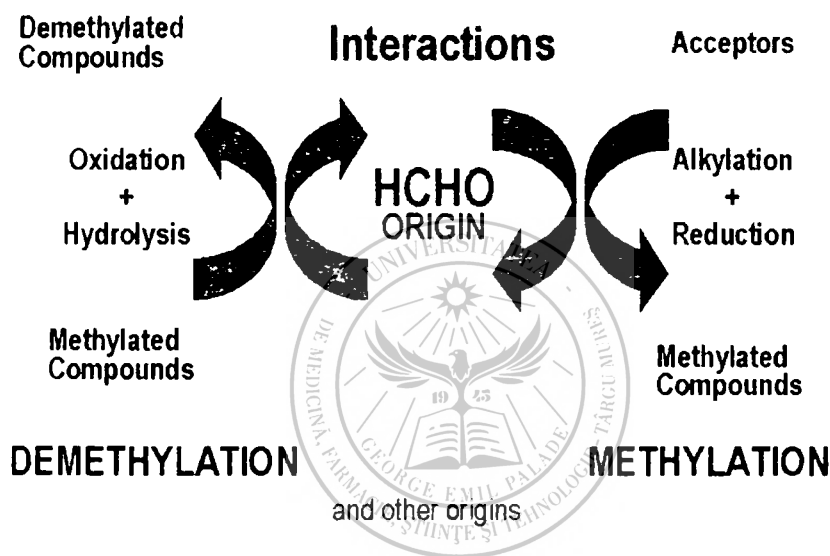


Figure 2. Basic elements of the formaldehydome

(From Tyihak E et al, J Planar Chromatogr, 2005, 18: 67. With permission)

Although the role of HCHO in the induction of neoplasia and atherosclerosis has been widely discussed [12], the real function of HCHO in these processes is unknown. The unknown reactions of HCHO demand a new approach to analyse parts of the formaldehydome with special emphasis on the detailed mechanisms of different means of endogenous and exogenous HCHO capture, donation, and transfer, etc. Although conventional bioautography [1] can be used for biological detection of the antibiotic effect it is not suitable for studying and understanding all the complicated reactions involved. It is supposed that these HCHO reactions in cells occur among other chemical reactions. Model experiments are necessary with complex separation and detection systems. One solution is the BioArena system. HCHO is practically present in all "-ome" systems: all big biological units as the genome, proteome, metabolome etc. are interlaced by dynamic methylation-demethylation processes [22].

Interactions between HCHO and H_2O_2

HCHO – similar to H_2O_2 – is an endogenous, indispensable component of all biological systems. These small molecules can be continuously formed by almost all cells, both intracellularly and extracellularly [17,18]. The inhibiting-killing activity of HCHO released

can be further increased by means of the interaction with H_2O_2 , that is, HCHO and H_2O_2 can meet in different regions of cells and so they can interact endogenously. In this interaction the very reactive singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and excited HCHO can be formed [14,16].

It is a recent observation that antibodies can catalyze the generation of very reactive biological oxidants including dihydrogen trioxide (H_2O_3) with a ring skeleton and ozone (O_3) in the interaction of $^1\text{O}_2$ with H_2O [26,27]. It is supposed that HCHO, originating from the formaldehydome system, is also present in the activity process of antibodies and it may be in general one basis of the formation of $^1\text{O}_2$ in this complicated system. (Figure 3) illustrates the reaction series supposedly, taking into account the earlier and more recent observations [13,16,23,26,27]. It is probable that the mechanism of bacterial killing by antibodies and antibiotics is based on similar or the same principle. These very reactive small molecules – from HCHO to O_3 – may be crucial factors of the innate (natural) resistance and form a common bridge between the innate (natural) and adaptive (induced) resistance in plant and animal organisms, alike [22].

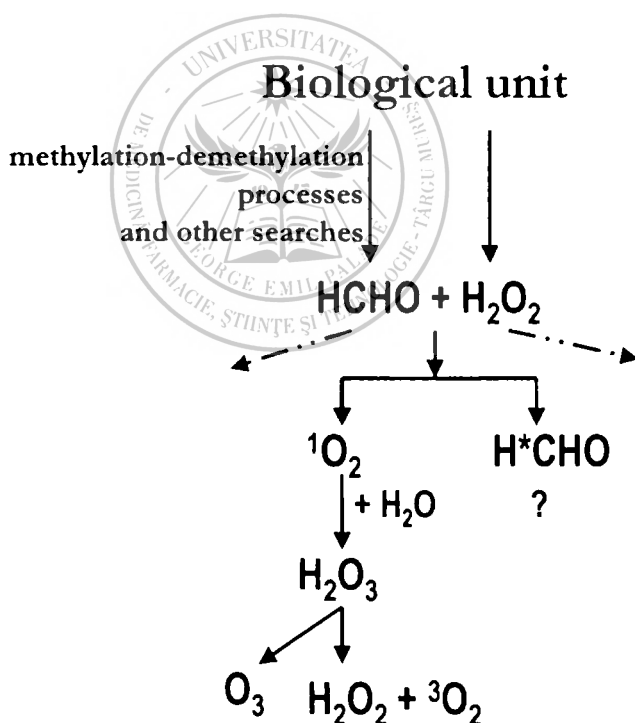


Figure 3. Possibilities of formation of different reactive oxidants in the interactions of HCHO and H_2O_2 .

These reactive small molecules can also be formed in the chromatographic spots after inoculation and so they can be studied in a relatively separated form from the biological system.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The test substances were purchased from Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary. Dye reagent: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest, Hungary) was used to visualize the antimicrobial activity. MTT was dissolved in distilled water and the solution was used immediately after preparation.

Other chemicals

All solvents and other chemicals were of analytical grade and were purchased from Merck Co., Ltd. (Darmstadt, Germany) and REANAL Co., Ltd., (Budapest, Hungary).

Separation methods

TLC: TLC chromatoplates covered with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck Co., Ltd., Darmstadt, Germany) were used.

The test substances were spotted onto the adsorbent layer (after a precondition at T = 120°C, t = 3 h [1,2]) with micrometer syringe and automatic sample applicator (CAMAG Co., Ltd., Muttenz, Switzerland). The chromatograms were developed in TLC chamber using different eluent systems (e.g. chloroform-methanol 80+8 (v/v)), next the chromatoplates were dried and after that were ready for bioautographic detection.

OPLC: Sample application was carried out onto the dry adsorbent layer (after a precondition at T = 120°C, t = 3 h [1,2,21]) using micrometer syringe or Nanomat sample applicator (CAMAG Co., Ltd., Muttenz, Switzerland).

An automatic OPLC instrument was used which consisted of the liquid delivery system and the separation chamber (OPLC-NIT Co., Ltd., Budapest, Hungary). Cassette containing the chromatoplate with samples can be inserted into the chamber [19]. After the separation process the cassette can be pulled out and the chromatoplate is dried and it can be used to bioautographic detection.

Chromatographic conditions in OPLC instrument were as follows: chromatoplate, silica gel 60F₂₅₄ (Merck Co., Darmstadt, Germany) with all edges sealed. Chromatographic conditions: e.g. chloroform-methanol 80+4 (v/v), external pressure, 5.0 MPa; flow rate, 250 µl/min; eluent volume, 8700 µl. Separation time, 2680 sec.

Bioautography

For the bacterial biotest, the phytopathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* race 6, causing halo blight on bean was used. Bacterial cells were grown on a rich medium (King's B broth) [21] at 28°C, at 200 rpm on centrifugal shaker, until they reached late exponential phase (OD_{560 nm} = 0.7), corresponding to 1.5 x 10⁹ cells/mL.

⁻¹. Just before use, 50 % vol. of fresh medium was added to the culture and different co-factors were added to medium as well. Having completed the development, dried chromatoplates were immersed into the bacterial suspension of *Pseudomonas savastanoi* for 20s. Visualisation of the chromatograms with MTT was performed either after a short draining period or after an overnight incubation [21].

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of deprivation and mobilization of HCHO on the antibacterial activity

Interaction and double effect of trans-resveratrol [20,21]. It has been established that trans-resveratrol (TR), a common food component in grapes, wines etc. can interact with HCHO in model chemical experiments and in biological systems (e.g. pig heart tissue) [18]. The mobilization of HCHO from a biological unit by TR is a totally new approach to the „red wine” topic and so is its double effect : first, the elimination of HCHO by TR may cause a chemopreventive effect; second, the reaction products between TR and HCHO

may act as killing/inhibiting factors e.g. against pathogens or cancer cells. This double effect of TR may be one basis of its most diverse beneficial activities.

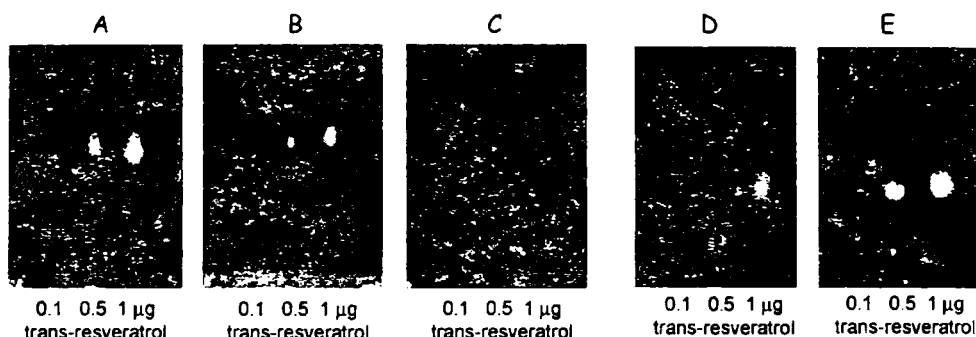


Figure 4. Effect of endogenous and exogenous substances on the antibacterial activity of trans-resveratrol

Chromatographic conditions: silica gel 60F₂₅₄ (Merck after preconditioning at 120°C for 3 h), chloroform – methanol, 80 + 8 (v/v); automatic OPLC instrument; external pressure 5.0 MPa, flow - rate 250 ml min⁻¹, mobile phase volume 9700 µl, eluent flush 450 µl, and separation time 2375 s.

Biological conditions: A: *Pseudomonas savastanoi* bacterial suspension (Psm); B: Psm + 2 mg L-arginine in 1 mL Psm; C: Psm + 2 mg glutathione in 1 mL Psm; as well as E: 2 mg CuSO₄·5H₂O in 100 mL bacterial suspension. A and D are controls.

The BioArena system gives a good possibility for studying the microchemical reactions of TR with HCHO using endogenous HCHO capturer and mobilizing molecules in the culture medium. (Figure 4) illustrates that TR really behaves as an antibacterial antibiotic against *Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola. The control (bacterial cell suspension only) sheet shows this clearly. Adding endogenous HCHO-capturing molecules such as L-arginine and glutathione to the culture medium with bacterial cells, the antibacterial activity of TR decreases dose-dependently. TR can mobilize the HCHO from the bacterial cells to TR spots as well.

The second part of the figure shows the effect of Cu (II) ions on the antibacterial activity of TR. Cu(II) ions mobilize, and coordinate the HCHO molecules in hydroxymethyl groups [23] and so they can transport HCHO molecules to TR spots. The antibacterial activity of TR can be increased dramatically using a higher amount of Cu (II) ions in the culture medium [21] (Figure 5).

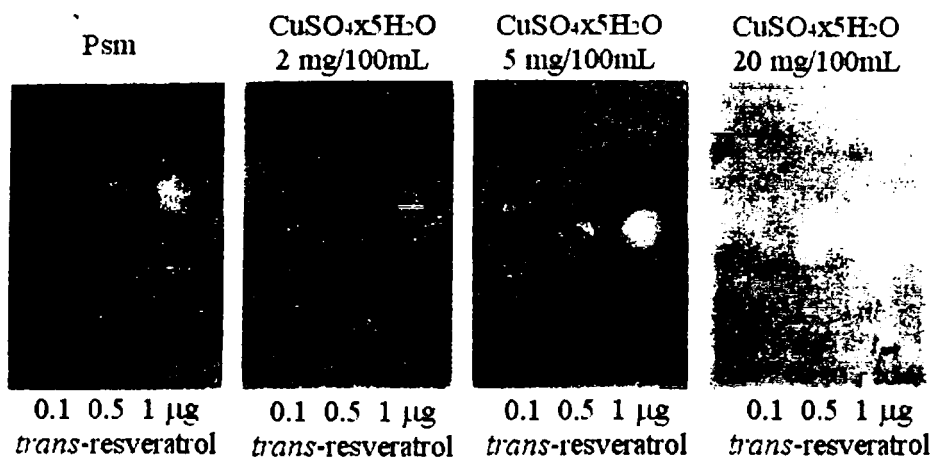


Figure 5. The effect of copper (II) ions on the antibacterial activity of trans-resveratrol – non linear effect!
(From Tyihák E et al, J Planar Chromatogr; 2005, 18: 67. With permission).

Salicylic acid is a well known „old plant medicine”. The antimicrobial activity of this phenolic acid has also been written. Figure 6 demonstrates the antibacterial activity of salicylic acid and when using HCHO capturer molecules similarly to earlier investigations, this activity is also characteristically decreased. It follows from these results that salicylic acid acts through HCHO and its reaction products. This statement is supported by the last chromatogram sheet where the effect of vitamin C is shown. The L-ascorbic acid as reducing agent reduced the HCHO molecules so the antibacterial activity of the salicylic acid is decreased appreciably.

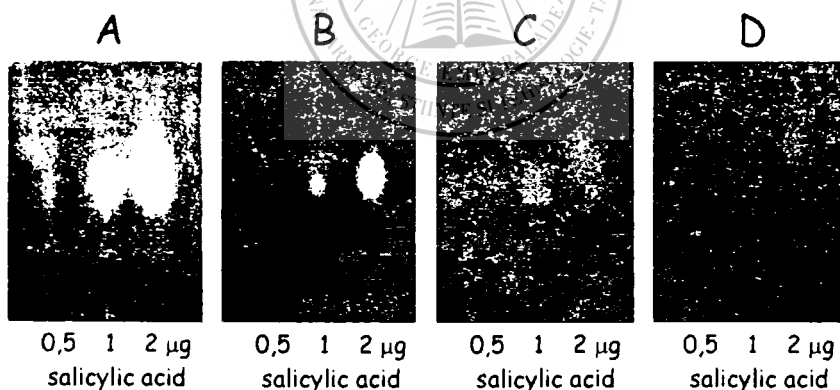


Figure 6. Effect of endogenous and exogenous substances on the antibacterial activity of salicylic acid.

Chromatographic conditions: silica gel 60F₂₅₄ (Merck), mobile phase: chloroform-methanol 80+ 8 (v/v); Desaga glass TLC chamber.

Biological conditions: A: *Pseudomonas* sp., Psm, control; B: A + 2 mg L-arginine in 1mL Psm; C: 2 mg glutathione in 1 mL Psm. D: A + 1mg L-ascorbic acid in 1 mL Psm. Incubation at optimum temperature and detection with MTT.

Elimination of O₃ from the chromatographic spots and its effect on the antibacterial activity of antibiotics

It follows from the essence of BioArena system [20,21] that there is an unlimited possibility for the interactions between microbes and biologically active small and big compounds in the adsorbent layer bed of a chromatoplate. We exploited this possibility using cinnamic acid as an antibiotic-like compound. Figure 7 shows the antibacterial activity of the cinnamic acid (Figure 7 a). It is supposed that O₃ can be formed in the chromatographic spots of cinnamic acid, which is responsible mainly for this antibacterial effect. O₃ can originate from the interaction between HCHO and H₂O₂ in which in the first time singlet oxygen can be formed, which can oxidize the water molecules and so H₂O₃ can be formed. From H₂O₃ with disproportion – among others – O₃, a super killing factor forms (see Figure 3). Using Indigo Carmine for elimination of O₃ molecules from the chromatographic spots of cinnamic acid it has been established that in the presence of Indigo Carmine decreased really dose-dependently the antibacterial activity of cinnamic acid as it can be seen on Figure 7. Modifying the light and contrast conditions on the picture of chromatogram in computer the effect of Indigo Carmine on the antibacterial activity of cinnamic acid seems more attractive as it can be observed on Figure 8.

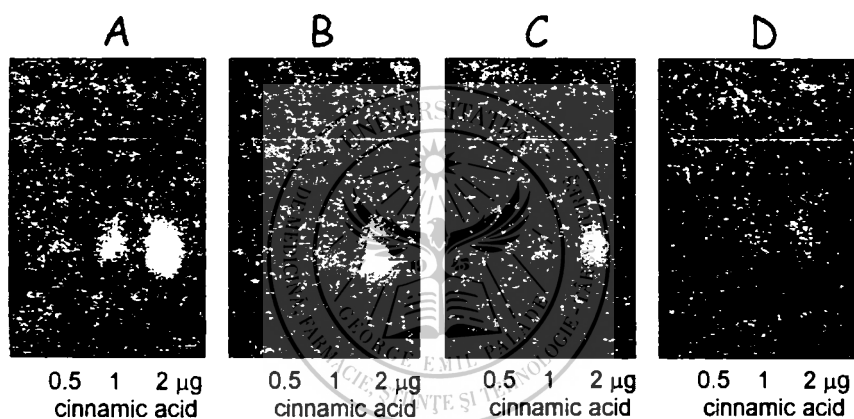


Figure 7. Effect of Indigo Carmine on the antibacterial activity of cinnamic acid.

Chromatographic conditions: silica gel 60F₂₅₄ (Merck); mobile phase: chloroform-methanol 80+8; (v/v); Desaga glass TLC chamber.

Biological conditions: A: 100 mL *Pseudomonas savastanoi* suspension, Psm, B: A + 10 mg Indigo Carmine; C: A + 20 mg Indigo Carmine; D: A + 40 mg Indigo Carmine. Incubation and detection with MTT

The animal experiments are very expensive and sometimes raise severe moral issues. Therefore, searching for new solutions is both useful and actual. In this complex system there is a possibility for isolation of potential medicinal products as antibiotics or antineoplastic substances. It may be a BioArena-guided isolation procedure and at the same time an evaluating system, which leads to production of new pure ingredients

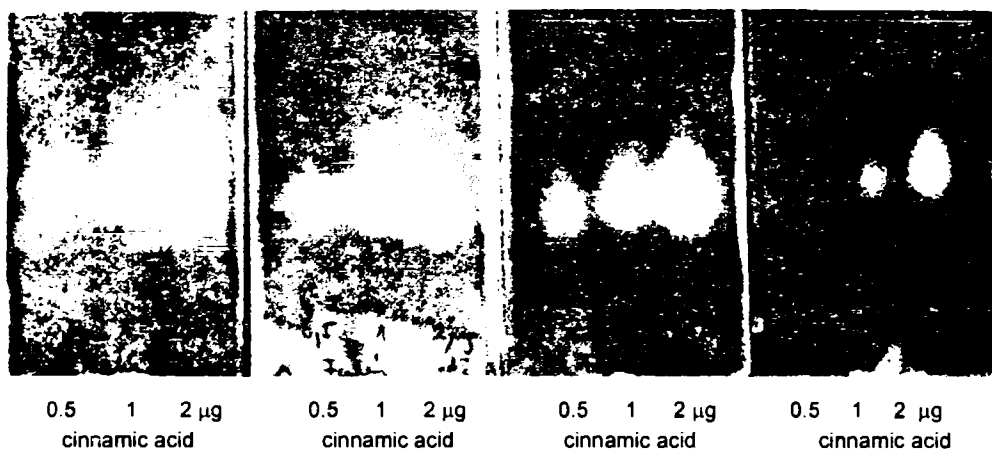


Figure 8. as figure 7 after special balance of light and contrast conditions of chromatogram picture. (in computer).

The combination of chemical and biological screening has been proved to be very efficient for the survey of a number of extracts and for the isolation of new plant ingredients. Plant active components of biological interest are usually isolated following a bioactivity-guided fractionation procedure which can include conventional and modern (BioArena system) biological detection, as well. The parallel development and application of different biological detection methods is also crucial for exact and efficient localization of the active components [7]. However, the development of BioArena system (e.g. coordination of operating steps, using aimed series of endogenous and/or endogenous molecules [21]) opens new horizons in the bioassay-guided fractionation and isolation works.

CONCLUSIONS

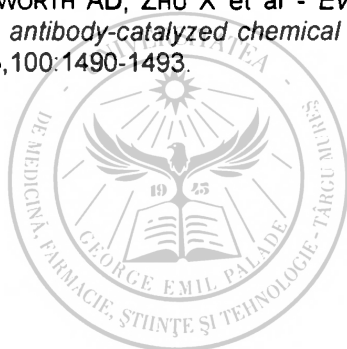
The use of the potentialities of the TLC/OPLC techniques for the separation, isolation and identification of the constituents of plant and other extracts [7] as well as complicated reaction mixtures (e.g. in combinatorial chemistry) [6] is an especially actual task. The possibilities of the biological detection also include the application of the conventional versions of bioautography to new antimicrobial agents with novel modes of action. However, these conventional solutions are not suitable for studying and understanding all the complicated biochemical reactions involved. Model experiments are necessary with complex separation and detection systems in micro- and ultramicroassay level. One solution is the BioArena system, which integrates the advantages of the layer chromatographic separation (ideally linear OPLC [15,19]), and e.g. direct bioautography [1]. This integration exploits the possibilities of interaction of microbes with dye substances and with other small and large co-factor molecules in the layer adsorbent bed of layer arrangement after chromatographic separation that makes these endogenous and/or exogenous co-factor molecules available as a culture medium for pathogenic cells. In these interactions HCHO and its reaction products appear as key molecules of the formaldehydome. Thus, in the biological world, they participate in a series of practically unknown interactions in different tissues (cells). Although, HCHO as a key molecule and its reaction products can generate surprising and new reactions in model experiments,

further biochemical key molecules can hopefully also be studied in BioArena or in similar new model systems.

REFERENCES

1. BOTZ L, NAGY S, KOCIS B – *Detection of microbiologically active compounds*, in Nyiredy, Sz. (ed.) *Planar Chromatography-A Retrospective View for the Third Millennium*, Springer, Budapest, Hungary, 2001, 489-516.
2. Botz L, Kocsis B, Nagy S – *Bioassays: Microbial tests. Bioautography*. In Worsfold P, Townshend A, Poole C (Eds), *Encyclopedia of Anal Sci*, Vol 1, Elsevier Acad Press, Oxford, 2005, 271-277.
3. CHOMNAWANG MT, SURASSMO S, NUKOOLKAM VS et al - *Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria*. *J Ethnopharmacol*, 2005,101:330-350.
4. COOK R J, BAKER KF - *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*, Am. Phytopath. Soc., St. Paul, Minnesota, 1983, 32.
5. ELOFF JN -*On expressing the antibacterial activity of plant extracts – a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care*, *South African J. of Sci*, 2000, 96:116-118.
6. GOMBOSUREN N, NOVAK Z, KOTSCHY Á et al - *A multidimensional overpressured layer chromatographic method for the characterization of tetrazine libraries*, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2007, 69:239-249.
7. HOSTETTMANN K, MARSTON A, WOLFENDER H - *Strategy in the search for new lead compounds and drugs from plants*, *Chimia*, 2005,59:291-294.
8. KALÁSZ H - *Biological role of formaldehyde and cycles related to methylation, demethylation, and formaldehyde production*. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3:175-192.
9. KLOSE RJ, YAMANE K, BAE Y et al - *The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36*, *Nature*, 2006, 442:312-316.
10. LORBER B - *Update in infectious diseases*, *Ann Intern Med*, 2002, 137:974-980.
11. LORBER B - *Update in infectious diseases*, *Ann Intern Med*, 2006, 145:354-360.
12. MONTICELLO TM, MORGAN KT - *Chemically-induced nasal carcinogenesis and epithelial cell proliferation: a brief review*. *Mutat Res*, 1997,380:33-41.
13. SÁRKÓZI Á, MÓRICZ ÁM, OTT PG et al - *Investigation of Chelidonium alkaloids by use of a complex bioautographic system*, *J Planar Chromatogr* 2006,19:267-272.
14. TRÉZL L, PIPEK J - *Formation of excited formaldehyde in model reactions simulating real biological systems*, *J Mol Struct –Theochem*, 1988, 170:213-223.
15. TYIHÁK E, MINCSOVICS E, KALÁSZ H - *New planar liquid chromatographic technique: overpressured thin-layer chromatography*, *J Chromatogr*, 1979, 174:75-81.
16. TYIHÁK E, ROZSNYAY S, SÁRDI É et al - *Possibility of formation of excited formaldehyde and singlet oxygen in biotic and abiotic stress situations*, *Acta Biol Hung*, 1997, 45:3-10.
17. TYIHÁK E, TRÉZL L, SZENDE B - *Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome*, *Ann NY Acad Sci*, 1998, 851:259-270.
18. TYIHÁK E, ALBERT L, NÉMETH Zs et al - *Formaldehyde cycle and the natural formaldehyde generators and capturers*, *Acta Biol. Hung*, 1998, 49:225-238.
19. TYIHÁK E, MINCSOVICS E - *Overpressured layer chromatography (optimum performance laminar chromatography) (OPLC)*, In Nyiredy Sz (ed): *Planar*

- Chromatography: A Retrospective View for the Third Millennium, Springer, Budapest, 2001, 137-176.
20. TYIHAK E, OTT PG, MÓRICZ ÁM et al - *Antibiosis, antibiotics and formaldehyde cycle: The unique importance of planar chromatographic techniques to progress in these fields*. J Planar Chromatogr, 2004, 17:84-88.
21. TYIHAK E, MÓRICZ ÁM, KATAY GY et al - *The potential of BioArena in the study of the formaldehydome*, J Planar Chromatogr, 2005, 18:67-72.
22. TYIHAK E - *Double immune response of plants to pathogens and its biochemical basis*, In Teixeira da Silva JA (ed): Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Advances and Topical Issues, Vol. III. Global Sci Books, London, UK, 2006, 380-387.
23. TYIHAK E, MÓRICZ ÁM, OTT PG et al - *Double effect of trace elements*. In Szilágyi M, 24. Szentkirályi K (eds): Procs. Trace Elements in the Food Chain, Budapest, Working 25. Committee on Trace Elements, HAS, Budapest, 2006, 394-399.
26. WEDGE DE, CAMPER ND - *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals and Pharmaceuticals*, Cutler HG, Cutler, S. J., Eds., CRC Press. Boca Raton, FL 2000.
27. WEDGE D E, GALINDO JCG, MACIAS FA - *Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs*, Phytochemistry, 2000, 53:747-754.
28. WENTWORTH AD, JONES LH, WENTWORTH P JR et al - *Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens*, Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:10930-10935.
29. WENTWORTH PJR, WENTWORTH AD, ZHU X et al - *Evidence for the production of trioxigen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigen*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100:1490-1493.



A kromatográfia szerepe az anabolikus hatású ekdiszteroidokat tartalmazó növényfajok felfedezésében

Báthori Mária^{1*}, Máthé Imre

¹Szegedi Tudományegyetem, Farmakognózi Intézet, Szeged Eötvös u. 6. - 6720
Magyarország
e-mail: bathori@pharm.u-szeged.hu

The aim of the present work was to study the ecdysteroid occurrence and distribution within the plant flora.

Mainly randomly selected plant species were examined and compared for the presence of ecdysteroids. A fast, rapid, robust and economical screening strategy was elaborated for the analysis of this compounds in the plants to select new suitable sources of ecdysteroids. This strategy based on TLC utilized the special advantages of this method.

The results proved the erratic distribution of ecdysteroids in the plant world. The occurrence of ecdysteroids within some particular family was also screened in detail from taxonomic point of view. The most widespread data were assessed for Caryophyllaceae, Asteraceae and Lamiaceae family. The most frequent occurrence was observed in the members of Caryophyllaceae family (69%) and the highest concentration of ecdysteroids was demonstrated in the species of Asteraceae ($\geq 2\%$). The results revealed that the ecdysteroids can be considered as taxonomic markers in the Silene genus of Caryophyllaceae.

Keywords: Ecdysteroid distribution in the plant species, Asteraceae, Caryophyllaceae, Silene species, Taxonomic markers

Bevezetés

A szteroid hormonok az élővilágban igen elterjedtek. Míg a gerincesekre jellemző szteroid hormonok mellett a brasszinozolidok a növények növekedési hormonjai, addig a gerinctelenek szteroid hormonjait az ekdiszteroidok alkotják. Ezek a vegyületek igen elterjedtek a nagyszámú rovarvilágban kívül más állatfajokban és a növényekben is.

Az ekdiszteroidok a rovarokban fejlődésszabályozó hormon szerepet töltenek be, a rovar embriogenezist, vedlést, diapauzát speciálisan irányító, a pete- és a spermiumérést befolyásoló anyagok [9]. Exogén ekdiszteroid bejuttatásával a rovar szervezetébe fejlődési rendellenességet, torzalakúságot, életképtelen formák létrejöttét lehet előidézni.

A rovarfejlődési hormonokkal szerkezetileg rokon vegyületeket véletlenszerűen fedezték fel a növényekben. A növények gazdag nyersanyagforrásai az ekdiszteroidoknak, gyakran több nagyságrenddel nagyobb mennyiségben (50 ng/g-30 mg/g) szintetizálják ezeket a vegyületeket, mint a rovarok [13]. A növényekben az ekdiszteroidok védelmi szerepet töltenek be, védik a növényt a nem adaptálódott rovarkátevőktől, talajférgectől.

A növényekből nyert ekdiszteroidokkal megindulhatott ezeknek a vegyületeknek a farmakológiai vizsgálata, mely vizsgálatok számos jelentős farmakológiai hatását bizonyították az ekdiszteroidoknak emlősökön [10,12]. Igazolt farmakológiai hatásai

közül legkifejezettebb a fehérjeszintézist fokozó hatás, amely hatás nem jár együtt androgén, ösztrogén és timolitikus mellékhatásokkal. Így felhasználásuk a terápiában vagy a sportban biztonságos, szemben a tiltott anabolikumokkal. Mivel emlősökön magas dózisban sem toxikusak (6 g/kg), megindult ezeknek a vegyületeknek és készítményeiknek alkalmazása elsősorban, mint izomtömeg növelő és teljesítményfokozó anyagoknak [10, 12].

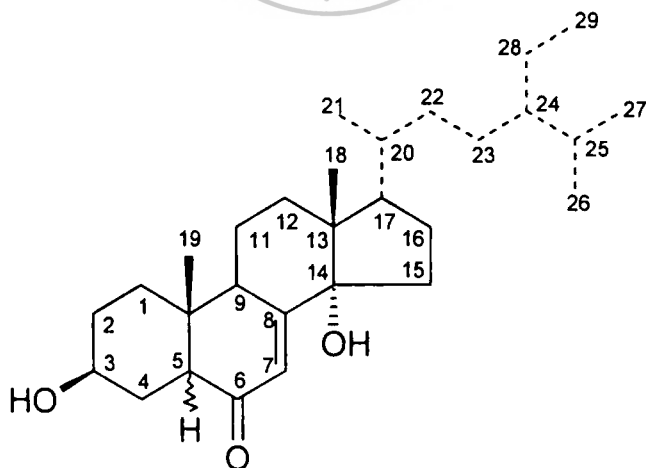
Az anabolikus hatáson kívül adaptogén hatásuk miatt és fájdalomcsillapítóként is alkalmazzák az ekdiszteroidokat és készítményeiket. Ígéretes jelöltjei a jövő terápiás felhasználásnak neuroprotektív, antiarrhythmias hatásuk miatt. Antihyperglykaemiás hatásuk alapján orálisan alkalmazható diabetikumok lehetnek [10, 12].

Számos potenciális lehetőséget ígér az ekdiszteroidok alkalmazása a géntechnológia területén. A biotechnológiai ipar már ma is széleskörűen használja ezeket a vegyületeket az ekdiszteroid indukálta génexpressziós rendszerekben [10, 12].

Az ekdiszteroidok, mint rovar hormonok mezőgazdasági szempontból a természetbarát, környezetkímélő inszekticid (Insect Development and Reproduction Disrupter) fejlesztések igénye miatt fontosak [8].

Az ekdiszteroidok ipari méretekben is alkalmazott legalkalmasabb nyersanyagforrásai a *Leuzea carthamoides*, *Ipomoea* fajok, *Polypodium vulgare*, *Achyranthes* és *Cyathula* fajok hazánkban nem honosak vagy nehezen hozzáférhetőek. Világméretekben is korlátozottan állnak rendelkezésre, gyakran kipusztulóban vannak [12]. A begyűjtési korlátok mellett ezeknek a növényi nyersanyagoknak alacsony hatóanyagszintje és az izolálási nehézségek jelentenek akadályt az előnyös ekdiszteroid kinyerésre. A növények termesztésbe vonásával lényegesen csökken a hatóanyag szint. Ezek a nehézségek motiválták az új növényi nyersanyagforrások felkutatására irányuló munkánk.

Szerkezetüket tekintve az ekdiszteroidok, a szteránvázis vegyületek egyik, jól körülhatárolható csoportját alkotják [11]. A szterán vázon a C-17-es helyzetben általában C₈-C₁₀ alkil vagy alkenil oldalláncot viselnek (1. ábra).



1. ábra. Az ekdiszteroidok általános szerkezeti váza

Általános jellemzőjük a 14 α , a 3 β hidroxileződés, valamint a B gyűrűben a 7-én-6-on kromofór csoport jelenléte. Többszörösen hidroxilezett (3-8 hidroxil), többnyire 5 β -androsztán sorba tartozó szteroidok.

Munkánk célja

Egyszerű, sorozatvizsgálatokra alkalmas, rétegekromatográfián alapuló szűrővizsgálati stratégia kidolgozása az ekdiszteroidok növényekben való kimutatására, amely kis mennyiségű ekdiszteroid kimutatását is lehetővé teszi.

Az ekdiszteroidok szűrővizsgálata, elterjedésük tanulmányozása a növényvilágban, a megfelelő ekdiszteroid nyersanyagforrások felkutatása, melyek magas koncentrációban tartalmazzák a fő ekdiszteroidot a 20-hidroxiekdizont vagy a farmakológiailag aktív ekdiszteroidoknak alkalmas forrásai.

A növények ekdiszteroid profiljának feltérképezése.

Az ekdiszteroidok szűrővizsgálatára használt anyagok és módszerek

Növényi nyersanyag

A szűrővizsgálatra használt növényfajok saját gyűjtésünkben és különböző botanikus kerti magtételből felnevelt állományból származtak. Az egyes növényfajok rendszertani meghatározását az MTA Ökológiai és Botanikai Kutatóintézetben (Vácrátót), a Kertészeti Egyetem Gyógynövény termesztési Intézetben (Budapest) és a Szegedi Tudományegyetem Farmakognózi Intézetében végezték.

Szűrővizsgálatoknál használt módszerek

Rétegekromatográfia (TLC)

TLC-nél alkalmazott álló fázisok: TLC silica plates 60 F254, 20x20 cm, rétegvastagság 0,2 mm (10-12 μ m), TLC plates RP-18 WF254, 20x20 cm, rétegvastagság 0,25 mm, TLC aluminium sheets silica gel 60 F254, 20x20 cm (E. Merck, Darmstadt, Németország), és Whatman KC18F (Whatman, Clifton, NJ, USA). HPTLC plates CN F254 10x20 cm (5-7 μ m) (E. Merck, Darmstadt, Németország).

NP-TLC-nél alkalmazott mozgó fázisok:

1. diklór-metán – etanol (96%) (8: 2, v/v),
2. etilacetát – metanol – ammónia oldat (25%) (85: 15: 5, v/v/v),
3. toluol – acetón – etanol (96%) – ammónia oldat (25%) (100: 140: 32: 9, v/v/v/v),
4. kloroform – metanol – benzol (25: 5: 3, v/v/v),
5. etilacetát – etanol (96%) – víz (16: 2: 1, v/v/v),

RP-TLC-nél általában alkalmazott mozgó fázisok

6. metanol – víz (4: 6, v/v),
7. acetónitril – víz (35: 65, v/v),
8. acetónitril – 0,1%-os trifluorecetsav (35: 65, v/v)
9. tetrahidrofurán – víz (45: 55, v/v)

CN-TLC-nél alkalmazott mozgó fázisok:

10. n-hexán – acetón (6: 4, v/v)
11. acetónitril – víz (2: 8, v/v)

A detektálást UV-fényben 254 nm-en (CAMAG UV-lámpa, CAMAG, Muttensz, Svájc) és vanillin-kénsav reagenssel történő bepermetezés után természetes fényen és UV-fényben 366 nm-en végeztük. A detektálásra Shimadzu C₉-931 PC Scannert (Shimadzu, Japán) és CAMAG TLC Scannert II (CAMAG, Muttensz, Svájc) használtunk.

Kényszeráramlásos kromatográfiánál kifejlesztési sebességek 0, 3; 0,4; 0,45; 0,5; 0,6 és 0,7 ml/perc voltak

Eredmények és az eredmények értékelése

Az ekdiszteroidok szűrővizsgálata

Az ekdiszteroidokban gazdag növényforrás kiválasztására, növényfajok ekdiszteroid profiljának feltérképezésére rétegekromatográfiás analíziseket használtunk, kihasználva a rétegekromatográfia sokoldalúságát. Kiterjedt szűrővizsgálatainkkal lehetőségünk volt az ekdiszteroidok eloszlásának tanulmányozására a növényvilágban s egy-egy kisebb rendszertani egységben (nemzetség, sectio), valamint a kiválasztott növények ekdiszteroid profiljának feltérképezését is sikeresen oldottuk meg.

Vizsgálati módszerünk értékelése

Szűrővizsgálatainknál nem az érzékeny kimutatásokra, hanem a gyors, egyszerű, sorozatvizsgálatokra alkalmas analízisekre törekedtünk. Vizsgálati módszerünk számos előnnyel rendelkezett az egyéb tesztelési módszerekkel szemben. Igazi értéke elsősorban multikomponensű keverékek analízisében és sorozatvizsgálatokra való alkalmazhatóságában van. A TLC-vel számos álló és mozgó fázis párhuzamos használatára, több minta szimultán vizsgálatára vagy multidimenzionális analízisére van lehetőség. Minden komponens láthatóvá tehető a lemezen, ellentétben a HPLC-vel. Egy kifejlesztéssel vizsgálható az ekdiszteroidok széles polaritási skálája. Csekély műszerezettséget kívánó, egyszerű, gyors, gazdaságos módszer. Mintaelőkészítést nem igényel, szemben a HPLC-vel, amely sorozatvizsgálatoknál idő és oldószerigényes eljárás, az oszlop egyensúlyi viszonyainak beállításához, az oszlop mosásához nagy mennyiségű oldószer szükséges, így sorozatmérésekre nem gazdaságos a módszer.

A TLC felbontóképessége, specificitása egyértelműen megfelelt ezekre az összehasonlító sorozatvizsgálatokra.

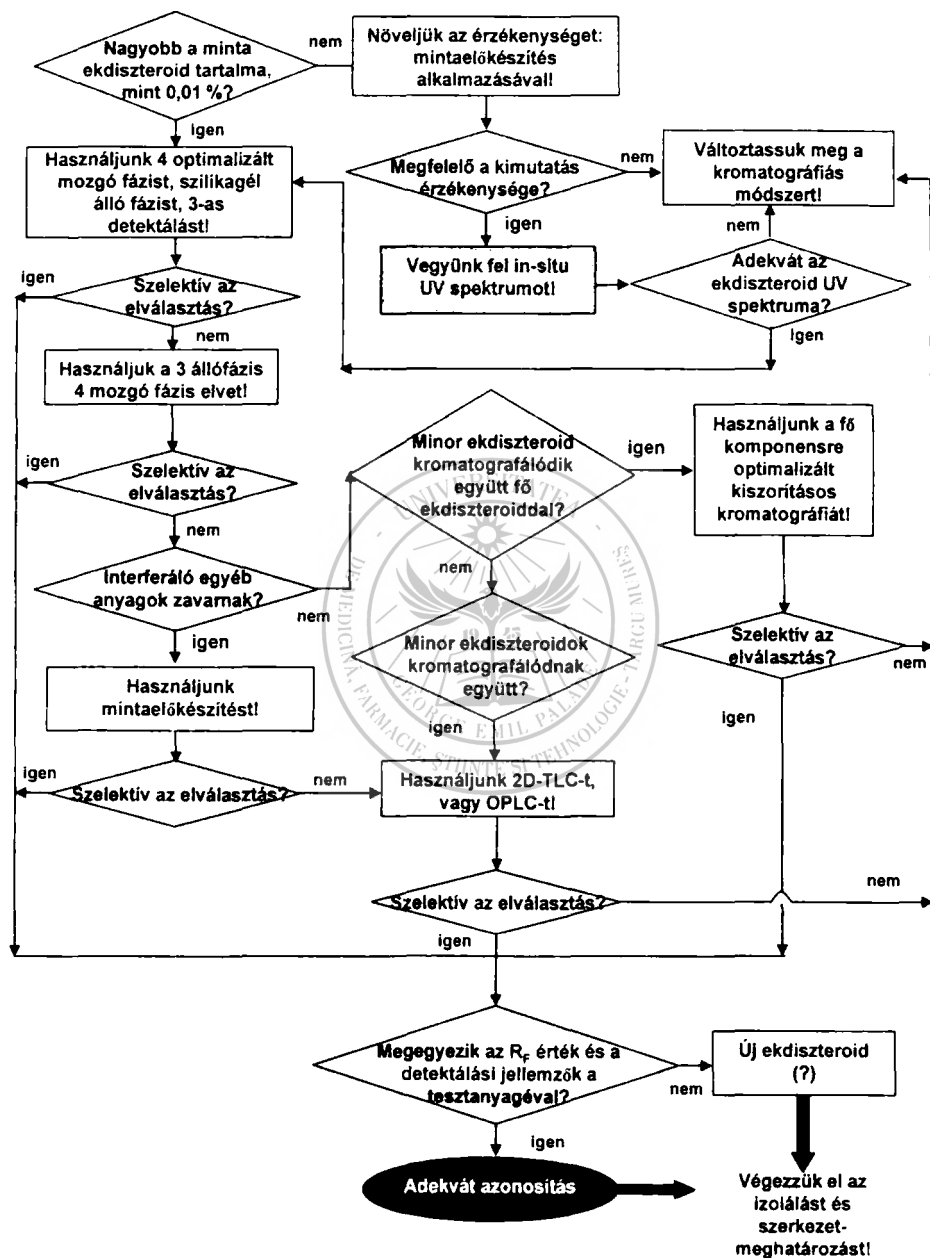
A szűrővizsgálatok összetettségét, a megbízható analízishez szükséges lépések számát

- a minta ekdiszteroid tartalma és ekdiszteroid összetételének komplexitása,
- az ekdiszteroidokkal interferáló egyéb anyagok mennyisége határozta meg.

Az 2. ábra az ekdiszteroidok szűrővizsgálati stratégiáját mutatja különböző mennyiségű ekdiszteroidot tartalmazó minta esetén, illetve, ha a minta nagy mennyiségű ekdiszteroidokkal interferáló egyéb típusú komponenseket tartalmazott.

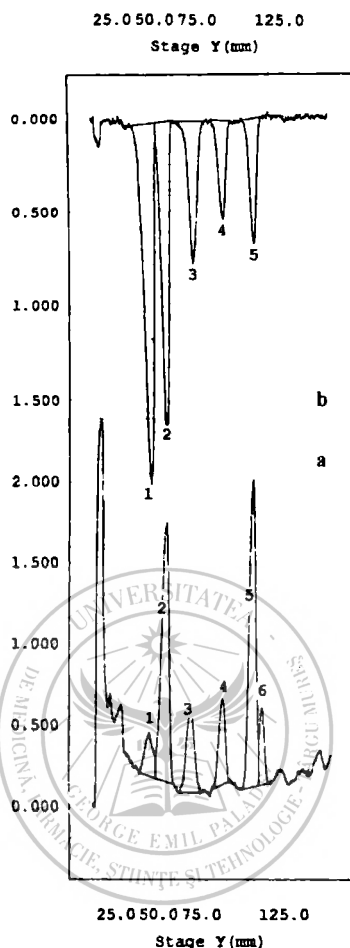
Az eljárás első lépésében klasszikus adszorpciós TLC analíziseket végeztünk a nyers növényi kivonatból szilikagél álló fázison, 4 optimalizált oldószer-rendszerünkkel, párhuzamos kifejlesztésekkel, háromszoros detektálással. Mozgó fázisaink egyszeri kifejlesztéssel külön-külön is lehetővé tették a karakterisztikus ekdiszteroid azonosítását (1. táblázat és 3. ábra).

2 ábra. Az ekdiszteroidok szűrővizsgálatának stratégiája növényekben



I. táblázat. Az ekdiszteroidok TLC kromatográfiás jellemzői (R_f értékei: ($R_f \times 100$))

Ekdiszteroid	OH-csoportok száma	A foltok színe vanillin-kénsav reagensre UV/366 nm és látható fényen		NP-TLC				RP-TLC				CN-TLC		
				mozgó fázisok								10.	11.	
				1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.			9.
Ajugaszteron C 1	6	s piros	s piros	35	-	34	35	45	29	34	-	47	35	24
Dakrihainaszteron 25	5	piros	piros	48	-	55	63	71	10	21	-	34	50	15
24(28)-Dehidromakiszteron A 2	6	lila	lila	39	-	32	36	48	30	36	31	52	29	35
2-Dezoxi-20-hidroxiেকသ်ဒီဇွန် 4	5	ibolya	türkiz	43	42	49	46	53	29	33	31	52	44	32
2-Dezoxi-20E 22-glükózid 4e	4	ibolya	türkiz	10	7	8	14	17	46	53	51	69	7	50
5α-2-Dezoxi-integriszteron A 5	6	ibolya	türkiz	16	24	30	21	21	58	61	53	70	24	57
2-Dezoxi-integriszteron A 6	6	ibolya	türkiz	32	21	36	38	39	44	52	47	58	32	43
2-Dezoxi-polipodin B 7	6	ibolya	türkiz	60	-	46	49	60	24	32	30	46	-	-
22-Dezoxi-20E 8	5	narancs	narancs	26	23	30	34	47	30	34	32	58	31	31
22-Dezoxi-integriszteron A 9	6	narancs	narancs	22	16	18	25	36	39	42	39	61	21	57
9,20-Dihidroxiেকသ်ဒီဇွန် 10	7	ibolya	kanárisárga	39	-	35	38	47	38	53	46	62	23	53
9β,20-Dihidroxiেকသ်ဒီဇွန် 11	7	ibolya	okker	-	-	29	38	38	34	-	-	-	18	48
Ekdizon 12	5	ibolya	v sárga	33	27	35	40	41	33	38	35	61	30	30
Herkeszteron 26	7	piros	piros	26	-	-	-	-	57	54	-	68	21	51
5α-20-Hidroxiেকသ်ဒီဇွန် 13	6	ibolya	türkiz	28	23	32	38	38	49	54	50	65	21	46
20-Hidroxiেকသ်ဒီဇွန် (20E) 14	6	ibolya	türkiz	24	21	27	30	37	47	56	46	66	26	48
20-Hidroxiেকသ်ဒီဇွန် 22-acetát 14c	5	barnás kék	barna	34	24	32	40	44	39	38	34	56	34	28
20-Hidroxiেকသ်ဒီဇွန် 22-benzoát 14e	5	ibolya	türkiz	32	37	27	39	42	30	-	-	-	-	-
26-Hidroxi-polipodin B 15	8	ibolya	rózsaszín	12	10	11	15	16	59	69	61	78	8	65
Integriszteron A 16	7	ibolya	türkiz	18	15	16	24	29	55	63	56	70	11	54
Izovitexiron 17	6	ibolya	s. zöld	32	-	37	37	43	39	41	-	50	33	23
Makiszteron A 18	6	ibolya	lila	-	-	31	38	40	57	49	41	-	28	37
Makiszteron C 19	6	ibolya	ibolya	50	-	41	40	57	26	33	30	45	30	27
Muriszteron A 20	7	ibolya	türkiz	38	24	28	39	57	36	36	32	42	40	36
25-Hidroxi-dakrihainaszteron 27	6	piros	piros	21	-	27	28	37	52	54	-	68	24	46
Polipodin B 21	7	ibolya	türkiz	32	20	25	35	38	48	55	49	66	33	50
Posztszteron 22	3	ibolya	barna	46	27	37	49	58	44	40	35	56	-	-
Rubroszteron 23	3	ibolya	sárga	46	27	37	47	55	59	52	47	66	46	48
Turkeszteron 24	7	s.piros	s.piros	10	-	12	14	19	99	68	-	77	8	62



3 ábra. A *Silene otites* nyers kivonatának (a) és a referencia anyagoknak (b) a denzitogramja. A TLC elválasztásoknál alkalmazott álló fázis TLC silica plates 60 F254, 20x20 cm, a mozgó fázis diklórmetán—etanol, 82 : 18 v/v volt. A karakterisztikus ekdiszteroidok elúciós sorrendje a következő volt: 1: integriszteron A, 2: 20-hidroxi-ekdizon, 3: 20-hidroxi-ekdizon 22-acetát, 4: 2-dezoxi-20-hidroxi-ekdizon, 5: 2-dezoxi-ekdizon.

Több rendszerben (4 mozgófázis) párhuzamos kifejesztéseket végezve általában sikeresen végrehajtottuk a növényi minták ekdiszteroid spektrumának szűrővizsgálatát (ecdysteroid profiling) [5, 6], referencia anyagok segítségével.

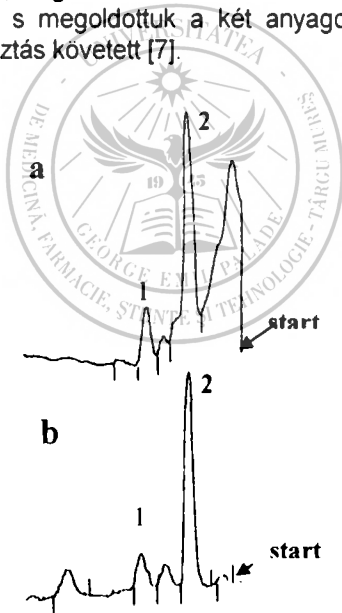
Az ekdiszteroidok szűrővizsgálatánál a hármas detektálás gyakran nagy segítséget jelentett a kimutatásokban. Így a vanillin-kénsav reagens hatására keletkező színek többnyire specifikusak, virtuális elválasztás tettek lehetővé, amit az együtt migrálódó ekdiszteroidok megkülönböztetésére jól fel lehetett használni. Erre mutat néhány példát a I. táblázat. Néhány mozgó fázisban egyes ekdiszteroidok közel kromatografálódnak

egymáshoz. Foltjaik eltérő színe, a kromatogramok értékelésénél igen hasznos információkat nyújtottak.

Ha a párhuzamos kifejlesztésekkel szilikagél álló fázison nem kaptunk megfelelő felbontást, a szelektivitás javítását az álló és mozgó fázis változtatásával, a "3 álló / 4 mozgó fázis" elv alkalmazásával érték el [3]. A "3 álló / 4 mozgó fázis" elv szerint, melyet munkacsoportunk dolgozott ki, ha két ekdiszteroid szilikagél álló fázison három mozgó fázisunkban azonosan viselkedett, optimalizált rendszereink közül egy további mozgó fázisban általában elválasztható volt, változtatva az álló fázisokat is (I. táblázat). A 3 álló és 11 mozgófázisunkkal, párhuzamos kifejlesztéseket végrehajtva az ekdiszteroidok széles polaritási skálája értékelhető a relatíve apoláris dezoxi-ekdiszteroidoktól a poláris többszörösen hidroxilezett ekdiszteroidokig, ekdiszteroid glikozidokig. A "3 álló / 4 mozgó fázis" elv alkalmazásával általában el tudtuk végezni növényfajok ekdiszteroid profiljának teljes adekvát feltérképezését.

Ha a minta ekdiszteroid tartalma 0,01%-nál kisebb volt, vagy nagy mennyiségű (>1 %) ekdiszteroidokkal interferáló egyéb anyagot tartalmazott, *mintaelőkészítést*, *in situ* UV spektrum felvételeket alkalmaztunk [7, 1]. A mintaelőkészítés növelte a felbontást és az érzékenységet, *in situ* UV spektrumok felvétele a kimutatás biztonságát.

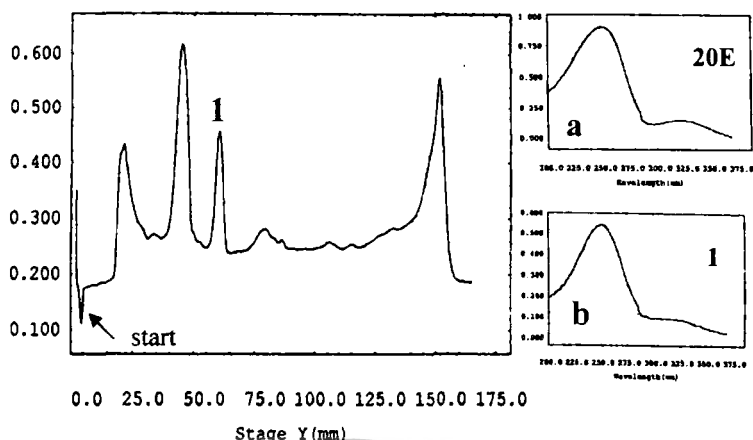
A mintaelőkészítésnél a növényekben általában jelen levő fenolos hidroxil csoportot tartalmazó anyagok ekdiszteroidoktól való elkülönítésére poliamid szilárd fázisú extrakciót (4. ábra) alkalmaztunk. A fenolos karakterű anyagok vizes elúciónál kötve maradtak az állófázison, míg az ekdiszteroidok eluálhatók voltak. Így jelentős tisztítást értünk el (4/b. ábra) s megoldottuk a két anyagcsoport elkülönítését, amit adekvát kromatográfiás elválasztás követett [7].



4. ábra. A *Serratula tinctoria* nyers kivonatának (a) és poliamid szilárd fázisú extrakcióval előtisztított kivonatának (b) denzitogramja.

Álló fázis TLC silica plates 60 F₂₅₄, 20x20 cm, kétszeres kifejlesztés a 1. és 4. számú mozgófázisokban. A számokkal jelzett csúcsok a következő ekdiszteroidokat reprezentálják: 1: polipodin B, 2: 20-hidroxiokdizon.

Ha a minta igen kis mennyiségű (<0,0001%) ekdiszteroidot tartalmazott (algák: *Fucus serratus*, *Dilsea carcosa*) több lépéses mintaelőkészítést követően *in situ* UV spektrumok felvételével (5. ábra) tudtuk igazolni biztonságosan a minta ekdiszteroid pozitivitását.



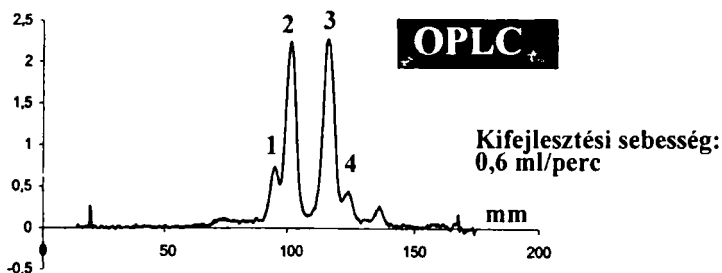
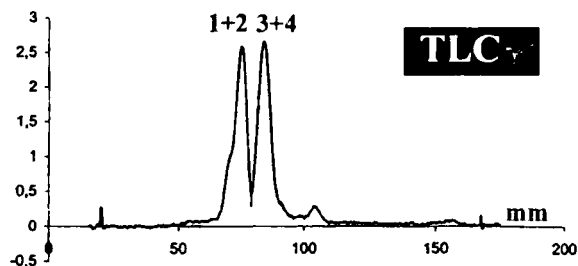
5. ábra. A *Dilsea carcosa* tisztított kivonatának densitogramja a 20-hidroxiiekdizon UV spektrumával (a), és az 1 jelzésű ekdiszteroid csúcs maximumánál felvett UV spektrummal (b). A TLC elválasztásnál alkalmazott álló fázis TLC silica plates 60 F₂₅₄, 20x20 cm, a mozgó fázis 1. számú oldószerszerrendszer.

Ha vizsgálatainknál a párhuzamos TLC analízisek, a "3 álló / 4 mozgó fázis elv alkalmazása, mintaelőkészítések végrehajtása sem vezetett eredményre (komplex ekdiszteroid spektrum), a hatékonyság fokozását szeszkvidimenzionális, kétdimenziós kifejlesztéssel, kizorításos és túlnyomásos kromatográfia alkalmazásával (OPLC) oldottuk meg [2, 4]. Ezeknek a módszereknek a kifejlesztésével gyakran célszerűbb, alternatív elválasztásokat nyertünk a szűrővizsgálatokhoz, melyeket más növényeknél is alkalmazni lehet.

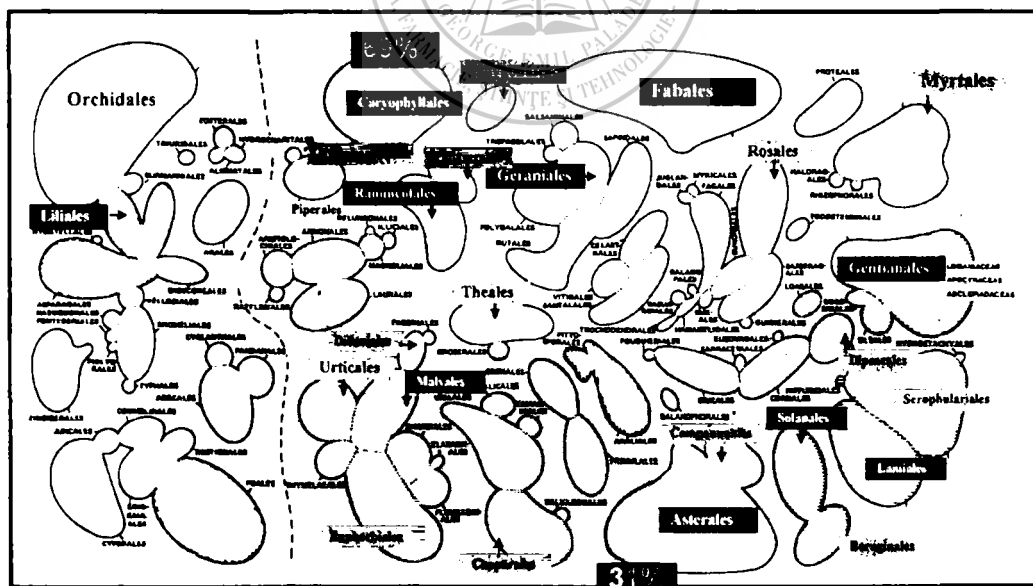
OPLC-nél a klasszikus TLC-hez viszonyítva további paraméterek változásával tudtuk optimalizálni az elválasztást, és a reprodukálhatóság is fokozódott. Így például szebb elválasztást értünk el a kifejlesztési sebesség optimalizálásával (6. ábra), mint klasszikus TLC-nél.

Az ekdiszteroidok növényvilágban való eloszlásának tanulmányozása, egy-egy kisebb rendszertani egység vizsgálata ekdiszteroidokra

A szűrővizsgálatokat egyrészt véletlenszerűen kiválasztott fajokkal végeztük, másrészt a "pozitív tribus" elv alapján minden hozzáférhető fajt vizsgáltunk egy ekdiszteroidokban gazdag, kisebb rendszertani egységen (törzs, nemzetség, sectio) belül. Szerteágazó mintavételezésekkel több száz (364) faj szűrővizsgálatát végeztük el. Szűrővizsgálataink eredményeit a Zárótermők törzsében a 7. ábra mutatja.



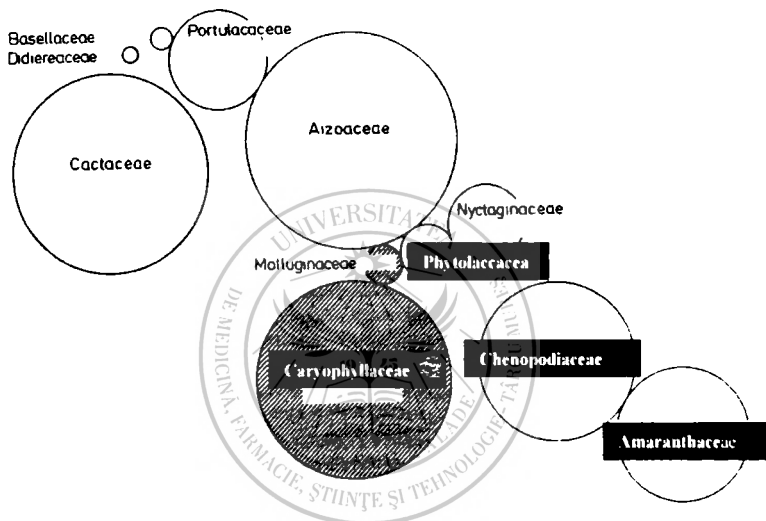
6. ábra A konvencionális TLC és az OPLC szeparálás összehasonlítása ugyanazon ekdiszteroid tartalmú minta analízisének. Az elválasztásoknál alkalmazott álló fázis TLC silica plates 60 F₂₅₄, 20x20 cm, a mozgó fázis mindkét esetben diklórmétán - etanol (79:21, v/v) oldószerszám volt. Az OPLC-nél 0,6 ml/perc átfolyási sebességet alkalmaztunk. A számokkal jelzett csúcsok a következő ekdiszteroidokat reprezentálják: 1: 9 α ,20-dihidroxiekdizon, 2: 24(28)-dehidromakiszteron A, 3: 2-dezoxi-20-hidroxiekdizon, 4: vitikoszteron E.



7. ábra Szűrővizsgálataink eredményei a Zárvertermők törzsében
(Az ekdiszteroidra pozitív növényrendszertani egységeket sötét mezővel jelöltük)

Célunk alkalmas növényforrás, érdekes ekdiszteroidokat tartalmazó faj felfedezése volt, ezért vizsgáltuk a már ismert, ekdiszteroidokra pozitív fajoktól rendszertanilag távol eső taxonokat is (algák) [2]. Ezek várhatóan új ekdiszteroid szerkezeteket kell tartalmazzanak taxonómiai megfontolásból. Szisztematikus vizsgálatainkkal nagyszámú, magas ekdiszteroid tartalmú és széles ekdiszteroid spektrummal rendelkező, illetve speciális ekdiszteroid összetételű fajt fedeztünk fel a hazai flórában vadon előforduló, vagy termesztett és külföldi magtételből felnevelt fajok között. Csaknem 80 ekdiszteroidra pozitív fajt emeltünk ki a növényvilágból, és kiválasztottunk néhány (10), az ekdiszteroidok izolálására megfelelő nyersanyagjelölt fajt. Ez utóbbiak a *Silene*, *Serratula* és *Ajuga* nemzetségből kerültek ki.

A *Caryophyllales* renden belül a *Phytolaccaceae*, *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae* és *Caryophyllaceae* családra korlátozódik az ekdiszteroidok jelenléte (8. ábra).



8. ábra Az ekdiszteroidok előfordulása a *Caryophyllales* rendben szűrővizsgálataink alapján (Az ekdiszteroidra pozitív növénycsaládokat sötét mezővel jelöltük)

A *Caryophyllaceae* családban az ekdiszteroidok gyakoriságát 40 %-osnak találtuk. A családban a *Silene*, *Melandrium*, *Viscaria* és *Lychnis* nemzetségekben találtunk ekdiszteroidokban pozitív fajokat. A *Silene* fajok kiemelkedtek ekdiszteroid szintetizáló készségükkel. Eddig 55 *Silene* faj tesztelését végeztük el, és ezek több mint fele (69 %) mutatott ekdiszteroid pozitivitást (II. táblázat).

A különböző *Silene* fajok ekdiszteroid produkciójáról kaptunk képet, amikor szervenkénti bontásban mintegy 30 botanikus kerti magtételből felnevelt állomány fajait vizsgáltuk meg. Különösen a *Silene otites* (L.) Wib., a *Silene nutans* (L.), a *Silene catholica* (Aiton), *Silene tatarica* (L.) Pers. és a *Silene flavesceus* Waldst et Kit. fajok bizonyultak kedvező ekdiszteroid forrásnak.

Vizsgálataink szerint az *Asteraceae* család fajaiban az ekdiszteroidok gyakorisága nem magas (31 %), s itt is csupán néhány nemzetségre korlátozódott az ekdiszteroidok jelenléte (*Rapontiacum*, *Serratula*, *Leuzea*). Viszont kifejezetten erőteljes az ekdiszteroidok feldúsulása néhány *Serratula* fajban (*Serratula coronata*, *S. wolffii*, *S.*

tinctoria): Az ekdiszteroid tartalom és az ekdiszteroid gyakorisága között nem található korreláció.

II. Táblázat Az ekdiszteroidok előfordulása a *Silene* genusban

Section	Faj	
Siphonomorpha Otth.	<i>S. catholica</i> L. Aiton	+
	<i>S. fruticosa</i> L.	-
	<i>S. italica</i> L. Pers.	+
	<i>S. italica</i> ssp. <i>nemoralis</i> Waldst. and Kit.	+
	<i>S. longiflora</i> Ehrh.	+
Sclerocalycinae (Boiss.) Schischkin.	<i>S. multiflora</i> (Waldst. & Kit.) Pers.	+
	<i>S. tatarica</i> (L.) Pers.	+
	<i>S. radicata</i> Boiss. & Heldr.	+
	<i>S. viridiflora</i> L.	+
	<i>S. bupleuroides</i> L.	+
Otites Otth.	<i>S. chlorantha</i> (Willd.) Ehrh.	+
	<i>S. chlorifolia cordifolia</i> All.	-
	<i>S. frivaldszkiana</i> Hampe.	+
	<i>S. densiflora</i> D. Urv.	-
Odontopetalae Schischkin ex Chowdhuri	<i>S. otites</i> (L.) Wib.	+
	<i>S. requienii</i> Otth.	-
Inflatae (Boiss.) Chowdhuri	<i>S. roemerii</i> Friv.	+
	<i>S. sendtneri</i> Boiss.	+
	<i>S. zawadzkyi</i> Herbich	+
	<i>S. cucubalus</i> Wibel.	+
Brachypodae	<i>S. fabarioides</i> Hausskn.	+
	<i>S. fabaria</i> (L.) Sibth. & Sm.	+
	<i>S. flavescent</i> Waldst. & Kit.	+
Auriculata	<i>S. vallesia</i> L.	+
	<i>S. altaica</i> Pers.	-
Suffruticosae	<i>S. multicaulis</i> Guss.	-
	<i>S. saxifraga</i> L.	+
Fruticulosae Rohrb.	<i>S. ciliata</i> Pourret	-
Rupifraga Otth.	<i>S. rupestris</i> L.	+
Compactae Boiss.	<i>S. armeria</i> L.	+
Elisanthe (Fenzl) Fenzl	<i>S. dioica</i> (L.) Clairv.	+
Atocion Otth.	<i>S. dioica</i> (L.) Clairv.	+
Behenantha Otth.	<i>S. dioica</i> (L.) Clairv.	+
Lasiocalycinae Chowdhuri	<i>S. echinata</i> Otth.	+
Eudianthe (Reichenb.) A. Braun	<i>S. coeli-rosa</i> (L.) Godron in Gren.	-
Erectorefractae	<i>S. pendula</i> L.	+
Dichotoma (Rohrb.) Chowdhuri	<i>S. dichotoma</i> Ehrh.	-
Silene	<i>S. micropetala</i> Lag.	-
Dipterospermae (Rohrb.) Chowdhuri	<i>S. bellidifolia</i> Juss. ex Jacq.	-
Conomorpha Otth.	<i>S. apetala</i> Willd.	-
	<i>S. colorata</i> Poir.	-
Heliosperma Reichenb.	<i>S. conica</i> L.	-
	<i>S. pusilla</i> Waldst & Kit.	+
	<i>S. conoidea</i> L.	-

Széleskörű szűrővizsgálataink alapján lehetőségünk volt néhány taxonómiai következtetés levonására az ekdiszteroidok növényekben való előfordulására vonatkozóan. További vizsgálatok szükségesek azonban ezek végső bizonyítására. Eredményeink igazolták az ekdiszteroidok sporadikus előfordulását a növényvilágban. Az ekdiszteroidok megjelenése a különböző rendszertani egységekben nem mindig tükrözött filogenetikai kapcsolatokat. Ha megfigyeljük az ekdiszteroidok előfordulását az egyes rendszertani egységekben, nem tudtuk értelmezni, miért szakad meg

előfordulásuk egy-egy családnál? Miért jelennek meg az ekdiszteroidok ismét magasabb fejlettségi fokon levő családoknál [14]? Miért nem szintetizálódik ekdiszteroid a család minden nemzetségében? Ugyanakkor bizonyított, hogy a rizs növény, amelyet ekdiszteroid negatív fajnak ismertünk, ekdiszteroidot képes szintetizálni az ekdiszteroid szintézist gátló enzimek működésének feloldásával (negatív "feedback" mechanizmus). Az ekdiszteroidok bioszintéziséhez szükséges gén jelen van a növényben, hogy történik-e bioszintézis, az a reguláció szintjén kereshető [11].

Szisztematikus szűrővizsgálataink a "pozitív tribus" elvét is igazolták, amely szerint az ekdiszteroid tartalmú fajok tribus-ba, nemzetségbe, vagy sectio-ba csoportosulnak. Korábbi vizsgálataink és más szerzők eredményei is ezt bizonyították [15, 16]. A *Silene* nemzetség néhány sectio-jára jellemző, hogy szinte csak ekdiszteroid tartalmú fajokat foglal magában (II. táblázat). Ilyen fajcsoportnak találtuk a *Siphonomorpha*, *Sclerocalycinae*, *Inflatae*, *Otites* sectio-t. Más sectio-k negatívnak mondhatók ekdiszteroidokra. Fontos azonban megjegyezni, hogy az ekdiszteroidra pozitív taxonómiai egységen belül előfordul negatív faj is, és fordítva is igaz a megállapítás. Ennek értelmezése további vizsgálatra szorul.

Irodalom

1. BÁTHORI M – *Phytoecdysteroids effects on mammalian, isolation and analysis*, Mini Rev Med Chem, 2002, 2:285-293.
2. BÁTHORI M, BLUNDEN G, KALÁSZ H – *Two-dimensional thin-layer chromatography of plant ecdysteroids*, Chromatographia, 2000, 52:815-817.
3. BÁTHORI M, HUNYADI A, JANICSÁK G, et al – *TLC of ecdysteroids with Four-Mobile Phases and Three-Stationary Phases*, J Planar Chromatogr, 2004, 17:23-25.
4. BÁTHORI M, KALÁSZ H – *Separation methods for phytoecdysteroids*, LC-GC Europe, 2001, 14:626-633.
5. BÁTHORI M, KALÁSZ H, JANICSÁK G et al – *Thin-layer chromatography of phytoecdysteroids*, J Liq Chromatogr RT, 2003, 26:2629-2649.
6. BÁTHORI M, MÁTHÉ I, GUTTMAN A – *Determination of 20-hydroxyecdysone content by thin-layer chromatography and micellar electrokinetic chromatography*, Chromatographia, 1998, 48:145-148.
7. BÁTHORI M, MÁTHÉ I, PRASZNA L et al – *TLC analysis to determine the seasonal dependence of the level of 20-hydroxyecdysone in the leaves of Serratula tinctoria (L.)*, J Planar Chromatogr, 1996, 9:264-268.
8. DARVAS B – *Insect development and reproduction disrupters*, in Ben-Dov Y, Hodgson CS (eds): *Soft Scale Insects their Biology, Natural Enemies and Control*, Elsevier, Amsterdam, 1997, 165-182.
9. DINAN L – *Ecdysteroid structure-activity relationships*, in Atta-ur-Rahman (ed): *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol.29. Elsevier, Amsterdam, 2003, 3-71.
10. DINAN L – *Phytoecdysteroids: biological aspects*, Phytochemistry, 2001, 57:325-339.
11. LAFONT R – *Phytoecdysteroids in world flora - diversity, distribution, biosynthesis and evolution*, Russ J Plant Physiol, 1998, 45, (3):276-295.
12. LAFONT R, DINAN L – *Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update*, J Ins Sci, 2003, 3, (7):1-30.
13. LAFONT R, HORN DHS – *Phytoecdysteroids, Structures and Occurrence*, in Koolman J (ed) *Ecdysone. From Chemistry to Mode of Action*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1989, 39-64.
14. SAVCHENKO T, WHITING P, GERMADE A et al – *Ecdysteroid agonist and antagonist activities in species of the Solanaceae*, Biochem Syst Ecol, 2000, 28:403-419.
15. ZIBAREVA LN – *Distribution and levels of phytoecdysteroids in plants of the genus Silene during development*, Arch Insect Biochem Physiol, 2000, 43:1-8.
16. ZIBAREVA L, VOLODIN V, SAATOV Z et al – *Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae*, Phytochemistry, 2003, 64:499-517.

Gyógynövények tradicionális növényi gyógyszerekben és étrend-kiegészítőkben. Haladás, vagy visszalépés?

Szendrei Kálmán

Farmakognóziai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Az Európai Unióhoz történt csatlakozás fontos kísérője a gyógynövények vonatkozásában a Gyógyszerkönyvben hivatalos drogok számának jelentős növekedése, továbbá két új termék kategória jogilag szabályozott megjelenése a nemzeti forgalmazásban: a hagyományos növényi gyógyszereké és az étrend-kiegészítőké. Gyógyszerkönyvünkben először jelentek meg olyan drogok, amelyek felvételét nem elsősorban a hazai forgalmazási igények indokolták, hanem az Unió, a többi tagország igényei. Ezeket megközelítőleg 90-100 olyan új drogcikkely jelzi, amelyek korábban nem voltak hivatalosak Magyarországon (1. ábra). Jelentősen megnőtt a hivatalos illó- és zsirosolajok száma, választéka is. A drogok többsége külföldi eredetű, sőt más kontinenseken honos növényektől származik. Kevés kivétellel a drogokat ott gyűjtik, vagy termesztik és készítik elő a későbbi feldolgozáshoz. Ezideig csak kevés ilyen faj honosítása történt meg az európai kontinensen. Kis túlzással állíthatjuk, hogy a nagy utazások és az Újvilág felfedezése óta nem volt ilyen gyors és jelentős átalakulás a hazai gyógynövénykincsben.

A növekedési folyamatban a korábbi időkhez képest két jelentős különbség észlelhető: 1. Ma elsősorban gyógyhatásúnak tartott növényekről van szó és nem fűszerekről, élelmiszerekről; 2. Ezeknek a növényeknek a többsége már feldolgozott termékek formájában kerül a fogyasztóhoz és nem drog-, fűszer-, zöldség-, gyümölcsként. Ugyanakkor a gyógynövényekből készült, vagy azokat is tartalmazó gyógyszerkönyvi galenikumok száma továbbra is alacsony, a VI. és VII. Gyógyszerkönyv szintjén maradt. Ennek fontos következményei vannak a fogyasztóra, és jelentős új feladatokat jelent az oktatásban és a továbbképzésben, szakmai tájékoztatásban.

A 2004-ben elfogadott két európai direktíva (2004/24/EC és 2004/46/EC) és kötelező átültetésük a nemzeti szabályozásba a fentieknél is fontosabb változásokat hozott. Jogszabályi szinten került rögzítésre két új termékcsoporthoz. Az egyik, a hagyományos növényi gyógyszerek (traditional herbal medicines) termékcsoporthoz. A nyilvánvaló újításon túl – ami a tradíciónak, mint a termék minőségét, terápiás értékét igazoló kategóriának az újrafelfedezését jelenti - a direktíva fő célja a nagyon heterogén európai termékszabályozás összehangolása, s ezáltal a kölcsönös termékáramlás elősegítése volt. A közös nevezőt Európa hosszas egyeztetések után a „tradíció” fogalmában, illetve újraforgalmazásában vélte megtalálni, az engedélyezés feltételeinek egységesítésével. A teljes gyógyszerregisztrációnál könnyebb, de sok tagállam aktuális szabályozásánál – így a magyar u.n. „gyógyhatású termékek” engedélyezésénél is - nehezebb feltételeket szabott. A forgalomban lévő készítmények „átminősítésére” 2011-ig adott haladékokat. Nem ellenőrzött információk szerint ilyen kérelemmel egyetlen termékre vonatkozóan sem került eddig sor Magyarországon, pedig már 2,5 év eltelt a rendelet életbelépése óta. Ehelyett

korábban „gyógyhatású” (sőt egyes esetekben OTC gyógyszer) termékeket a gyártók/forgalmazók étrend-kiegészítővé „minősítik át” (jelentik be).

Az étrend-kiegészítők szabályozásában hasonló, de ellentétes irányú célok vezették az Unió megfelelő bizottságait; azonban a tagállamok közötti harmonizálás és ezáltal termékek szabad piaci áramlásának biztosítását ebben az esetben az engedélyezés gyakorlati felszámolásával és csak minimális bizonylati, dokumentációs követelményekkel vélték elérni. A termékeket a cégek bejelentik (notifikálják), az engedélyezés nagyon leegyszerűsített formális procedurából áll. A későbbi forgalmazás során is korlátozott az ellenőrző hatóságok mozgástere és jogköre.

Étrend-kiegészítő

(37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet)

A hagyományos étrend kiegészítését szolgáló olyan élelmiszer, amely

- koncentrált formában tartalmaz tápanyagokat (vitaminok, ásványi anyagok), egyéb táplálkozási és élettani hatással rendelkező anyagokat, egyenként vagy kombináltan;
- adagolt vagy adagolható formában kerül forgalomba
- előre csomagolt formában kerül forgalomba a végső fogyasztó számára
- A termék minőségét, összetételét ma nem ellenőrzi a hatóság a forgalomba hozatal előtt (alatta is csak ritkán, ha panasz van)

Összetevők

- **Eredeti termékpaletta: vitaminok és ásványi anyagok**
14 vitamin, 33 származék formájában (sók, észterek)
17 ásványi anyag, 79 származék formájában (főleg sók)
Ma is ezek a leggyakoribb összetevők, komplex összetételek
- **A termékpaletta átalakul: egyre több "egyéb táplálkozási vagy élettani hatással rendelkező anyag", elsősorban gyógynövények jelenik meg az étrend-kiegészítőkben**
Jelentős iparág alakul ki, egyre jelentősebb gyógyszergyártók is megjelennek
Consumer Health Sector pl. Cetebe (GlaxoSmithKline)

Az új jogi szabályozás kétségtelenül elérte eredeti célkitűzéseinek egy részét: a nagyobb és gyorsan tovább növekvő termékválasztékot és a termékforgalom jelentős szabadságát egész Európában. Ebben követi az Egyesült Államok példáját. Részben pozitívként értékelhetjük a gyorsan növekvő fogyasztói igények szabad kielégítését is. Az új termékcsoporthoz forgalmi mutatói minden eddigi rekordot megdöntöttek és a trend töretlenül tovább tart. Két-három év alatt kb. 1500 új étrend-kiegészítő készítmény került forgalomba Magyarországon.

Az étrend-kiegészítők rendeletileg rögzített definíciójából érthető, hogy az eredetileg vitaminokból, ásványi anyagokból és néhány más táplálkozási célú anyagból álló étrend-kiegészítőkben hamarosan tömegesen jelennek meg a gyártók és forgalmazók által „táplálkozási vagy élettani” értékűnek minősített összetevők, elsősorban a legkülönbözőbb növényi összetevők, gyógynövények; hazaiak és egzotikumok. Olyanok, amelyeknek gyakran sem a gyógynövényes irodalomban, sem a táplálkozástudományban nincs kellő szakmai megalapozottsága. Ma ezek száma több száz, s nálunk is jóval meghaladja a százat. Európában korábban nem alkalmazott növények és növényi termékek alkalmazása indult meg étrendi és/vagy gyógyászati célra. Vannak közöttük helyi eredetűek, gyógynövényként, vagy táplálékként ismertek is, de sokkal több a más világrészekből (főleg Ázsiából) beáramló gyógynövény és termék. Ez a páratlanul gyors felfutás a fogyasztásban felfogható egyértelmű pozitívként. A fogyasztó számára ezeknek a termékeknek a hozzáférhetősége nagyobb, forgalmazásuk szélesebb körű a többi gyógynövényt tartalmazó termékeknél.

A negatívumok között hatásában a két direktíva hatására kialakult szabályozási aszimmetria a legfontosabb. A gyógyszer és hagyományos növényi gyógyszer kategóriákra vonatkozó engedélyezési eljárás indokolatlanul magas követelményeket állít és bürokratikus, az étrend-kiegészítőkre vonatkozó szabályozás viszont szokatlanul liberális, gyakorlatilag a termelők és forgalmazók lelkiismeretére bízva a fogyasztót. Az élelmiszer kereskedelmben jelentkező tömeges visszaélések jelzik, hogy ez megengedhetetlen kockázatoknak teszi ki a jóhiszemű egészséges és beteg fogyasztókat. Mint említettem, a gyártók a szabályozási aszimmetria hatására a korábban gyógyhatású vagy gyógyszerként engedélyezett gyógynövény készítményeket étrend-kiegészítővé „leminősítve” forgalmazzák. Ezzel elkerülik a bürokratikus és költséges újra-engedélyeztetést és szélesebb forgalmazási lehetőséghez jutnak. Eredmény: egy gyógyszerként, vagy hagyományos növényi szerként csak nehezen, vagy nem forgalmazható készítmény széles körben fogyasztható étrend-kiegészítőként. Amennyiben az engedélyezés megtagadásának oka a nem bizonyítható hatásosság, vagy valamilyen vélt vagy bizonyított kockázati tényező, úgy ez a forgalmazás és fogyasztás negatívumként értékelendő. Az étrend-kiegészítőként történő tartós és nem pontosan adagolt fogyasztás tovább növelheti a kockázatot.

Az eredeti étrend-kiegészítő definícióból adódó összetételek (vitaminok, ásványi anyagok) kiterjesztése folytán gyakorlatilag végtelen számú kombinációban jelenhetnek meg újabb és újabb növényi és egyéb anyagokat tartalmazó termékek. Eredményként fokozatosan növekszik az átfedés a növényi (valamint a vitamin, ásványi anyag) tartalmú gyógyszerjellegű készítmények és az étrend-kiegészítők összetétele és felhasználásai között. Kirívó esetekben az étrend-kiegészítők magasabb dózisokban tartalmazzák ezeket az összetevőket, mint a hasonló összetételű gyógyszerek.

A hazai gyógytermék kategóriában. 1986-os létrejötte óta túlsúlyban voltak és vannak ma is a hazai eredetű termékek, míg az étrend-kiegészítők között ma nagyon jelentős a külföldi eredetű termékek túlsúlya (> 80%). A forgalmazók, szakmértelem- és tökehiány miatt elsősorban külföldön, főleg más EU államokban már forgalomba hozott készítményeket jelenetnek be és forgalmazznak. Ennek következtében kölcsönösségről a

termékáramlásban nem beszélhetünk. Magyarország, más ipari termékekhez hasonlóan, ezen a területen is döntően befogadó országgá, külföldi cégek piacává vált. Ez tovább nehezíti a termékek pontos eredetének követhetőségét és a minőség, biztonságosság ellenőrizhetőségét.

A fentiek jeleit tapasztaljuk a hazai és a nemzetközi étrend-kiegészítő forgalomban, ami a minimális tájékoztatási kötelezettségekkel együtt, áttekinthetetlenné teszi a választékot a fogyasztó és a szakember (orvos, gyógyszerész) számára is, megfoszt mindenkit a „kellően informáltság” lehetőségétől. A fogyasztó kockázata többirányú: nem jut kellő tájékoztatáshoz a készítmény minőségéről, megbízhatóságáról, és ártalmatlanságáról. Arra sincs kellően dokumentált (és a tájékoztatóban tükrözött/képviselet) garanciája, hogy a szertől összetétele folytán egyáltalán joggal várható eredményt (aluldozozás kockázata). A nagyon gyenge/legyengített hatósági jogkörök és ellenőrzési lehetőségek sem nyújtanak számára garanciát.

A leggyakoribb problémát az étrend-kiegészítők alkalmazási ajánlásai jelentik. Bár a irektíva és a hazai rendelet látszólag egyértelmű határokat szab az alkalmazási ajánlásoknak, és az ezzel kapcsolatos promóciós reklámtevékenységnek, a termékcsoport alapdefiníciójából adódó ellentmondások az ajánlások terén nagyon sok szabálytalanságot eredményeznek. Ezek olymértékben megszorodtak, hogy ma már az európai jogalkotás sem a restrikció lehetőségein, hanem a termékcsoport kereteinek további bővítésén, tehát a további liberalizálás irányában dolgozik (health claims).

Alkalmazási ajánlások

37/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet

- "Az étrend-kiegészítő jelölése, megjelenítése és reklámozása során tilos a terméknek betegséget megelőző vagy gyógyító hatást tulajdonítani, illetve ilyen tulajdonságra utalni."
- "Az étrend-kiegészítő jelölése, megjelenítése, reklámozása nem állíthatja vagy sugallhatja, hogy a változtatott, kiegyensúlyozott étrend nem alkalmas a szükséges tápanyagok bevitelére."

Az alapdefiníciónak megfelelő alkalmazási célokon túl (a hagyományos étrend kiegészítése szükség esetén) a gyártók és forgalmazók az étrend-kiegészítőket ma már az egészségfenntartás és helyreállítás csaknem minden területére ajánlják. Ezen túl a mai fogyasztói érdeklődés és igények kielégítésére egyre több divatos alkalmazási területet nyitottak meg: fizikai-, mentális és szexuális teljesítményfokozók, testformálók, és más „lifestyle” termékek. A termékpromóció intenzív, félrevezető és gyakran még a liberális határokat is megszegi. Sok ismeretlen egzotikum, csodaszerű hatást ígérő gyógynövény és termék kerül így forgalomba, különböző elosztó rendszereken keresztül.

Proces tehnologic pilot de obținere a unui extract standardizat din *Juglandis folium* (semifabricat) și stabilirea metodologiei de control al calității

Viorica Istudor¹, Maria Lidia Popescu¹, Cerasela Elena Gîrd¹, Ligia Elena Duțu¹,
Mariana Pavel¹, Lucia Pîrvu², Gh. Țarălungă³, C. Ionescu-Tîrgoviște⁴

¹UMF „Carol Davila” București, Facultatea de Farmacie, aviator Traian Vuia 6, sector 2

²Centrul Național de Cercetare Dezvoltare Chimică

³Centrul de Cercetări Științifice Medico-Militare, București

⁴Institutul Național de Diabet și Boli Nutriționale „N. C. Paulescu”

Obiectivele acestei lucrări constau în obținerea din *Juglandis folium* a unui extract standardizat în polifenoli și flavone (semifabricat), care să intre în formula unui produs farmaceutic cu proprietăți hipoglicemice – Fitohipoglic (denumire provizorie) și elaborarea metodologiei de control al calității. Selectarea principiilor active de standardizare s-a bazat pe prezența constituenților respectivi în produsul vegetal și pe proprietățile hipoglicemice ale acestora, cunoscute din literatura de specialitate.

Procesul tehnologic a constat din extracție succesivă cu etanol 40 % și apă, urmată de distilarea alcoolului și a apei la 40° C, sub presiune redusă, până la stadiul de extract uscat. Efectul hipoglicemic a fost verificat pe soluțiile apoase și hidroalcoolice folosind șobolani Wistar, prin determinarea glicemiei *à jeun* și a celei provocate (administrare s.c. de glucoză 33 %). Calitatea extractului obținut a fost verificată prin reacții de identificare și determinare cantitativă (fotocolorimetrică) a flavonelor (prin complexare cu $AlCl_3$), a polifenolilor (cuplare cu reactiv Arnow) și a pierderii prin uscare la 105° C. După experimentare în laborator procesul tehnologic a fost transpus la fază pilot.

Din 500 g produs vegetal extras cu alcool 40 % s-au obținut 59,5842 g extract cu 2,51 - 2,72 g % flavone și 34,48 - 36,6 g % polifenoli totali (reprezenți prin taninuri galice și catehice, inclusiv flavone), care manifestă efect hipoglicemic numai pe glicemia *à jeun*.

The aim of this study is the obtaining from Juglandis folium of an extract standardized in polyphenols and flavones which can be a part of a hypoglycemic pharmaceutical product – Fitohipoglic (provisional name), as well as the elaboration of the quality control methodology. The selection of the active substances for standardization was based on the presence of these substances in the herbal drug and on their hypoglycemic activity known from the specialty literature.

*The technological process consisted in the successive extraction with ethanol 40 % and water followed by alcohol and water distillation at 40° C, at low pressure, until the stage of a dry extract. The hypoglycemic effect was verified on aqueous and hydroalcoholic solutions using Wistar rats, by determination of *à jeun* and induced glycemia (administration of glucose 33 % s.c.). The quality of the obtained extract was verified by identifying and quantitative (photocolorimetric) determination reactions of flavones (reaction with $AlCl_3$), polyphenols (reaction with Arnow reagent) and loss on drying at 105° C. After laboratory experiments the technological process was transferred in pilot phase.*

*We obtained 59.5842 g extract (from 500 g herbal drug in ethanol 40%) with 2.51 - 2.72 g flavones and 34.48 - 36.6 mg % total polyphenols (represented by gallotannins and condensed tannins, including flavones). This extract had hypoglycemic effect only upon the *à jeun* glycemia.*

Key words: *extractum Juglandis, standardisation, hypoglycemic effect*

Selectarea frunzelor de nuc (*Juglandis folium*) ca materie primă pentru obținerea unui extract standardizat s-a bazat pe cunoașterea din literatura de specialitate a proprietăților hipoglicemice ale unor constituenți chimici prezenți în acest produs: 6 – 10 % taninuri elagice și galoilglucoză; 3 – 4 % flavonozide (hiperozidă = 3-O-alfa-D-galactozida

quercetolului, quercitrozida = 3-O-ramnozida quercetolului, 3-O-arabinozidele quercetolului și kaempferolului), acizi polifenolici (cafeic, ferulic, *p*-cumaric, *p*-hidroxi-fenilacetic, clorogenic, neoclorogenic, galic, salicilic). De asemenea mai sunt citați: 4-O-beta-D-gucozida alfa-hidrojuglonei (0,6 %) sau 5-hidroxi-1,4-naftohidrochinona liberă în ceara epicuticulară (substanță ușor oxidabilă și convertibilă într-un compus naftochinonic colorat în brun), 0,25 % ulei volatil constituit din 1,8-cineol, borneol, acetat de bornil, alfa-și beta-pinen, *p*-cimen [1, 4, 5, 6, 12].

Produsul este menționat ca având proprietăți hipoglicemiente nedovedite [5].

Precizăm că taninurile galice sunt menționate pentru scăderea glicemiei prin stimularea captării glucozei în adipocite similar insulinei (intervin în translocarea GLUT-4, induc fosforilarea receptorului insulenic), în inhibarea 11-beta-HSD-1 – supraexpresia acestei enzime fiind implicată în declanșarea și întreținerea sindromului metabolic și a diabetului zaharat non-insulinodependent (DZ II) [11]; flavonele, apigenolul, kaempferolul, quercetolul, naringenolul și heterozidele lor sunt inhibitori ai 11- beta-SDH-1 [15] și alături de derivații polifenolici, datorită faptului că inhibă aldozo-reductaza și că reduc formarea produșilor de glicozilare avansată previn apariția cataractei și a fenomenelor de îmbătrânire [2, 8, 10, 15].

De asemenea reamintim că în practica medicală curentă, în tratamentul DZ II, se folosesc sulfamidele antidiabetice (derivați ai sulfonilureii), biguanidinele, agoniștii selectivi pe receptorul nuclear PPAR-gamma, inhibitorii alfa-glucozidazei (AGI) și ai aldozo-reductazei (ARI) [7].

Din aceste motive am dedus că și acțiunea hipoglicemiantă citată de unele tratate pentru *Juglandis folium*, neexplicată până în prezent, ar putea fi imprimată de taninuri, flavone și polifenoli. În consecință am presupus că un extract selectiv hipoglicemiant obținut din acest produs vegetal trebuie să fie standardizat în taninuri, flavone și polifenoli.

MATERIAL ȘI METODE

Ca materii prime s-au folosit: frunzele speciei *Juglans regia* L., nuc, (Juglandaceae) de proveniență PLAFAR, apa distilată și etanolul 40 %. Verificarea identității și calității produsului vegetal s-a efectuat cu ajutorul analizei farmacognostice (examen macro- și microscopic, analiză chimică calitativă și cantitativă). Pentru stabilirea procesului tehnologic de obținere s-au determinat substanțele solubile în mai mulți solvenți hidrofilii, capabili să extragă principiile active (apă distilată, etanol 20 și 40 %), în raport diferit față de produsul vegetal (5/1, 10/1, 15/1), mai multe procedee de extracție (macerare, infuzare, refluxare, extracție succesivă cu alcool 40 % și apă) și timpi de extracție. Controlul interfazic a constat în identificarea și dozarea principiilor active din soluțiile extractive obținute (taninuri, flavone și polifenoli) și în verificarea efectului hipoglicemiant. Pentru identificarea flavonelor s-au practicat reacții specifice (reacția cianidolului, transformarea în fenoxizi cu ajutorul hidroxidului de amoniu, formarea chelaților cu $AlCl_3$) [3, 13].

Determinarea cantitativă s-a efectuat spectrofotometric: flavonele prin complexare cu $AlCl_3$ și polifenolii prin cuplare cu reactiv Arnow. Am considerat că prin cuplare cu reactiv Arnow reacționează și taninurile și ca urmare nu mai este necesară și metoda de reducere a acidului fosfowolframic. Prețul de cost ridicat al pulberii de piele face mai puțin accesibilă metoda oficială de determinare a polifenolilor neabsorbiți de pulberea de piele [3, 13].

Efectul hipoglicemiant s-a determinat pe șobolani Wistar sănătoși urmărind glicemia á jeun și glicemia provocată. Pentru glicemia á jeun șobolanii au fost repartizați în loturi omogene de câte 6 animale (3 masculi și 3 femele), cu greutate de 155 – 280 g, ținute în microclimat adecvat (vivariu), cu acces liber la hrană și apă, în afara contactului cu insecticide. Soluțiile de testat în concentrație de 10 % au fost obținute prin refluxare

succesivă cu etanol 40 % (JR-EtOH) și apă (JR-H₂O suc), sau numai cu apă (JR-H₂O pur). Din fiecare soluție s-au administrat per os câte 20 ml/kg m.c. Monitorizarea a constat în urmărirea curbei ponderale și a stării de sănătate pe o perioadă de 7 zile înainte începerii experimentului. Cu 16 ore înainte de administrarea soluțiilor de testat animalelor li s-a oprit accesul la hrană, dar au avut acces liber la apă. Monitorizarea din timpul experimentului a constat în cântărirea animalelor și determinarea glicemiei á jeun cu ajutorul glucometrului GLUCOCARD X-METER. Hiperglicemia provocată s-a obținut prin administrare s.c. de glucoză 33 % (2 ml/kg m.c.) față de martor și s-a determinat după 30, 60, 90 și 120 de minute. S-a ales această modalitate de administrare a soluțiilor de testat și a intervalelor de determinare a glicemiei pentru a surprinde cât mai bine momentul pătrunderii în circulația sistemică și a eventualului efect asupra peak-ului glicemic. Analiza statistică a rezultatelor experimentale s-a efectuat prin testarea semnificației diferenței mediilor prin testul „t”-Student pentru $p < 0,05$ [9].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Substanțele solubile au fost de: 14,15 – 14,23 g % (în maceratul apos), 14,70 – 14,90 g % (în infuzie), 17,36 – 17,50 g % (în soluția obținută prin refluxare cu apă); 18,70 – 18,90 g % (în soluția obținută prin refluxare cu alcool 20 %) și 19,35 – 19,54 g % (în soluția obținută prin refluxare cu alcool 40 %). Din analiza acestor rezultate reiese că solventul cu cea mai bună capacitate de dizolvare s-a dovedit a fi etanolul 40 %, iar metoda de extracție cea mai avantajoasă este refluxarea timp de 30 de minute. Raportul produs vegetal/solvent, după îmbibare, este de 1/10.

Cantitatea de flavone, exprimată în g rutozidă la 100 mL soluție este de: $7,139 \times 10^{-3}$ (în macerat), $13,712 \times 10^{-3}$ (în infuzie), $14,938 \times 10^{-3}$ (în soluția obținută prin refluxare cu apă), $17,842 \times 10^{-3}$ (în soluția obținută prin refluxare cu etanol 20 %) și $39,799 \times 10^{-3}$ (în soluția obținută prin refluxare cu etanol 40 %).

Cantitatea de polifenoli totali exprimată în g acid cafeic la 100 mL soluție este de: $63,401 \times 10^{-3}$ (în macerat), $113,820 \times 10^{-3}$ (în infuzie), $201,232 \times 10^{-3}$ (în soluția obținută prin refluxare cu apă), $323,004 \times 10^{-3}$ (în soluția obținută prin refluxare cu etanol 20 %) și $361,399 \times 10^{-3}$ (în soluția obținută prin refluxare cu etanol 40 %).

Din cele două determinări cantitative de principii active reiese că cele mai bune rezultate s-au obținut la extracția cu etanol 40 %.

Ca urmare a acestor rezultate s-a optat pentru refluxarea cu etanol 40 % urmată de refluxarea cu apă (pentru extracția și a altor principii active hidrosolubile).

În aceste condiții din 500 g produs vegetal s-au obținut:

59,5842 g extract cu 2,51 - 2,72 g % flavone (exprimate în rutozidă) și 34,48 – 36,6 g % acizi polifenolici (exprimați în acid cafeic), prin extracție cu etanol 40%;

24,6482 g extract cu 2,15 - 2,40 g % flavone și 18,64 – 20,40 g % acizi polifenolici, prin extracție succesivă cu apă;

75,434 g extract cu 1,49 - 1,62 g % flavone și 10,54 – 11,20 g % acizi polifenolici, prin extracție cu apă.

În ceea ce privește cantitățile de principii active din soluțiile experimentate pe șobolani, exprimate în g/100 mL, am determinat: $10,152 \times 10^{-3}$ flavone (rutozidă) și $147,88 \times 10^{-3}$ polifenoli (acid cafeic) în JR-EtOH; $19,797 \times 10^{-3}$ polifenoli (acid cafeic) în JR-H₂O suc și $114,71 \times 10^{-3}$ polifenoli (acid cafeic) în JR-H₂O pur. Se constată că cea mai bogată fracțiune în principii active este JR-EtOH.

În urma testelor farmacodinamice s-a conchis că în absența administrării glucozei efecte hipoglicemice au avut numai JR-EtOH la 30, 60, 90 și 120 de minute după administrare. Reamintim că JR-EtOH este singura soluție în care s-au extras atât

flavonele, cât și taninurile. Absența efectului hipoglicemiant la celelalte soluții, în care există numai taninuri și acizi polifenolici, ne determină să afirmăm că cel mai bun efect hipoglicemiant îl prezintă flavonele. S-ar putea ca la aceste rezultate să fi contribuit absorbția mai bună a flavonelor, comparativ cu absorbția taninurilor.

Nici una dintre soluțiile testate nu au avut efect hipoglicemiant în condiții de hiperglicemie provocată prin administrare subcutanată a glucozei 33 % în cantitate de 2 ml/kg m.c.

Deoarece modelul experimental a folosit șobolani sănătoși, considerăm că extinderea cercetărilor pe animale cu diabet indus experimental, fie prin administrarea de streptozocină, fie prin administrare de aloxan, este necesară pentru a demonstra dacă există sau nu un proces de refacere a celulelor beta-pancreatice sau dacă altul este mecanismul de acțiune.

Validarea procesului tehnologic de obținere a extractului s-a bazat pe repetabilitatea și reproductibilitatea rezultatelor, iar validarea metodologiei de control al calității a fost posibilă datorită linearității curbelor etalon obținute cu amestecul substanțelor de referință (rutozidă și acid cafeic) la lungimi de undă corespunzătoare maximei de absorbție a flavonelor (427 nm pentru rutozidă) și acizilor polifenolici (510 nm pentru acid cafeic), valorii factorului de corelare ($r = 0,996$), erorii standard, reproductibilității rezultatelor.

CONCLUZIE

Extractum Juglandis obținut poate fi supus experimentărilor farmacologice în vederea determinării profilului toxicologic (DL_{50} , citotoxicitate), farmacologic pe șobolani cu diabet indus experimental și farmacocinetic, pentru a putea fi folosit ca semifabricat în formula produsului farmaceutic hipoglicemiant denumit provizoriu Fitohipoglic.

BIBLIOGRAFIE

1. BRUNETON J – *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*, TEC & DOC – Lavoisier, 2005, 418.
2. CHAUDRY P.S. et al. – *Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indometacin*, Biochem. Pharmacol., 1983, 32 (13):1995 – 1998.
3. CIULEI I, ISTUDOR V, PALADE M et al – *Analiza farmacognostică și fitochimică a produselor vegetale*, Editura Tehnoplast Company SRL, București, 1995, vol. I:78 – 82, 100, 125 – 127.
4. EVANS WC – *Trease and Evans' Pharmacognosy*, W.B. Saunders Company Ltd, London – Philadelphia – Toronto – Sydney – Tokyo, 1996, 248, 496
5. GRUENWALD J, BRENDLER T, JAENICKE C – *Physicians' Desk Reference for Herbal Medicines*, Montvale, New Jersey, 2000, 793 – 794
6. ISTUDOR V – *Farmacognosie. Fitochimie. Fitoterapie*, Editura Medicală, București, 1998, vol.I, 229.
7. NEGREȘ S – *Insulina și antidiabetice de sinteză* în *Tratat de Farmacologie sub redacția Cristea A.N.*, Editura Medicală, București, 2005, 764 – 772.
8. SONG D, LORENZO B, REIDENBERG MM – *Inhibition of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase by gossypol and bioflavonoids*. J. Lab. Clin. Med., 1992, 120:792 – 797.
9. SIMIONOVICI M, CARSTEAL., VLĂDESCU – *Cercetarea farmacologică și prospectarea medicamentelor*, Editura Medicală, București, 1983, 328 – 341.
10. VARNA SD, KINOSHITA JH – *Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids: their role in prevention of diabetic cataracts*. Biochem. Pharmacol., 1976, 25:2505 – 2513.

11. WALTNER-LAW ME, LIU XW, LAW BK et al - *Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production*, J. Biol. Chem., 2002, 277 (38):34933 – 34940.
12. WICHTL M, ANTON R – *Plantes thérapeutiques*, Edition TEC & DOC, Paris, 2003, 315.
13. x x x *Farmacopeea Română X*, Editura Medicală, București, 1993, 335, 1063 – 1064.
14. YOSHIKAWA M, SHIMADA H, NISHIDA N et al - *Antidiabetic principles of natural medicine. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of Myrcia multiflora DC (Myrtaceae): structure of myrciacitrin I and II and myrciaphenones A and B*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1998, 46 (1):113 – 119.
15. ZHANG YH, LORENZO B, REIDENBERG MM – *Inhibition of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase obtained from guinea pig kidney by furosemide, naringenin and some other compounds*, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1984, 49:81 – 85.



A soft-hard felfogás kiterjesztési lehetőségei a fitobiológiában

Tókes B.¹, Ferencz L.², Duşa Silvia¹, Donáth-Nagy Gabriella¹, Száva J.³, Bálan Júlia²,
Bodó Erzsébet², Tóth Katalin¹, Szakács J.¹, Vintilă Alina¹

¹Marosvásárhelyi Orvostudományi és Gyógyszerészeti Egyetem, ROMANIA

²SAPIENTIA Magyar Tudományegyetem, ROMANIA

³Dr. Száva J. Eugen INGENIEURBÜRO, München, GERMANY

Prof. Dr. TÓKES Béla, Marosvásárhelyi Orvostudományi és Gyógyszerészeti Egyetem, Fizikai
Kémia Tanszék, Marosvásárhely, 540139, Gh. Marinescu 38 sz, belatokes@yahoo.com

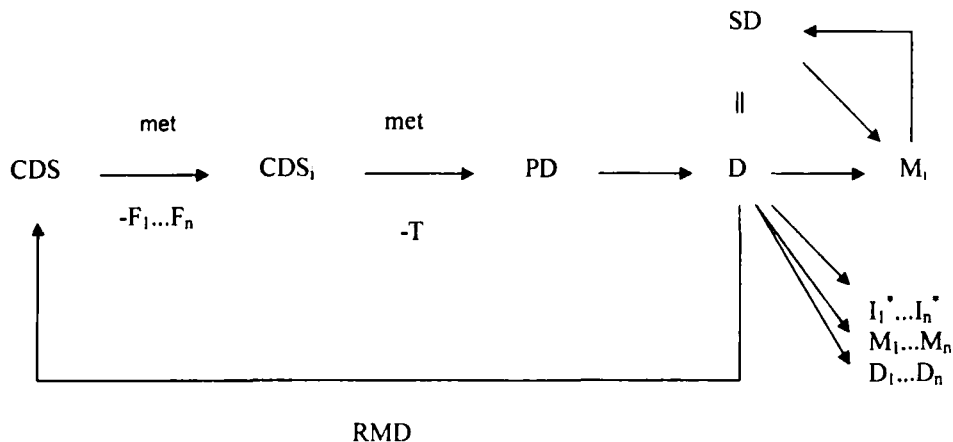
În cercetările noastre anterioare am demonstrat că principiul compușilor chimici „soft” se poate extinde și asupra fitohormonilor, modificând metabolismul lor din oxidativ în hidrolitic. În acest mod, în mecanismul de acțiune fitobiologică a auxinelor nu se formează radicali liberi, inhibitori ai creșterii în condiții obișnuite. Același efect l-am realizat prin adăugare de capcane de radicali liberi naturali (acid ascorbic, polifenoli etc.) la soluțiile de auxine. În afară de rezultatele scontate, se remarcă suplimentar și anumite fenomene oscilatorii, nesemnificate până în prezent în fitobiologie. Ca un alt domeniu al RMDD în fitobiologie, am modelat relațiile structură-proprietate ale unor complexanți biodegradabili, în lumina cerințelor moderne ale cultivării plantelor. Din acest punct de vedere chelatanții unor micro- și macroelemente prezintă importanță. Majoritatea complexanților tradiționali (EDTA și alții) însă în general nu sunt biodegradabili. Am studiat sistematic câțiva liganzi biodegradabili noi, cu structură poliaminopolicarboxilică, bazându-ne pe posibilitățile modelării moderne cu calculatorul. Am stabilit unele corelații între energiile sterice ale complexelor și parametrii componentelor. Am ajuns la concluzia că liganzii poliaminopolicarboxilici noi sunt mai puțin stabili, deci mai ușor degradabili decât complexii cu EDTA. Am interpretat legătura dintre parametrii de corelație și cei structurali ai complexelor.

Cuvinte cheie: auxine, mecanism de acțiune, substanțe „soft”, capcane de radicali liberi, biodegradabilitate, complexe

As we demonstrated previously, the concept of the „soft” chemicals can be extended on phytohormones, modifying their mechanism from oxidative in hydrolytical one. In this way, in the action mechanism of auxines doesn't form free radicals, inhibitors of the growth, in usual conditions. We realized the same effect adding natural free radical traps (ascorbic acid, polyphenols) to the auxine solutions. Beside the supposable results, we remarked supplementary some oscillatory phenomena unknown in the phytobiology. As another field of the RMDD extension, we have modeled the structure-property relationships of some biodegradable complexes in light of modern plant cultivation criteria. From this point of view, micro- and macro element chelators play a remarkable role. The great majority of the traditional chelators (e.g., EDTA) are, however, essentially non-biodegradable. We have systematically investigated some new biodegradable ligands with polyamino-polycarboxylic structure, using the molecular modeling method and the possibilities of modern computers. We established mathematical relations between the steric energy of the complexes and the element's properties. We have concluded that the new complexes with polyamino-polycarboxylic chelators are less stable, therefore easier degradable than the complexes with EDTA. We have drawn conclusions regarding the correlation parameters and the stereo chemical properties of the complexes.

Key-words auxines, action mechanism, „soft” chemicals, free radical trapping, biodegradability, complexes.

A nagy terápiás indexű gyógyszerek, illetve a kevésbé toxikus vegyszerek retrometabolizmusra (RMDD) alapozott tervezésére, illetve előállítására Bodor [3] két utat ajánl: a kémiai célbajuttatás rendszerét (CDS) és a lágy gyógyszerek (SD) létrehozásának lehetőségét (1. ábra). Ez utóbbi felfogás arra irányul, hogy éloszervezetekbe jutó gyógyszerek (vegyszerek) oxidatív metabolizmusát hidolitikusra cserélje ki, és ily módon – a szabadgyökképződés kizárásával – csökkentse a vegyületek toxicitását, illetve – gyógyszerek esetén – növelje azok terápiás hatását



1. ábra. A retrometabolikus gyógyszertervezés elvi vázlata

Habár az említett területeken, bevezetése óta, az RMDD alapján jelentős, a gyakorlatban is elterjedten alkalmazott eredményeket értek el [4], a növényvilágban ennek a felfogásnak a lehetőségeit csaknem teljesen figyelmen kívül hagyták. Néhány közleményünkben [15-17] már évekkel ezelőtt körvonalaztunk több olyan területet, amelyekre az RMDD, de különösen annak soft gyógyszerekre-vegyszerekre vonatkozó változata sikerrel átültethető. Ebben a dolgozatunkban összefoglaljuk és rendszerezzük eddigi eredményeinket. A gyakorlati célokon túlmenően, sok esetben, elméleti jellegű kérdések (reakciómechanizmusok, kémiai szerkezet – fizikai – kémiai – biológiai tulajdonságok kapcsolata stb.) tisztázása is lehetővé vált. A vizsgált kémiai rendszerek és kölcsönhatásaik modellezése ugyancsak lényegesen hozzájárult a tanulmányozott jelenségek megértéséhez. Két területet emelünk ki:

Az auxinok szerkezet – hatás összefüggéseinek, illetve hatásmechanizmusának a tanulmányozása.

Ismeretes, hogy a növényi hormonok (auxinok) növekedésserkentő hatása az idő és a koncentráció függvényében maximumon halad át [1]. A jelenség magyarázatára több elmélet született, amelyek közül az tűnik elfogadhatóbbnak, hogy az auxin (hard alak) működése közben fotooxidáció megy végbe, ami szabadgyökképződéshez vezet, a szabadgyökök viszont gátolják (feed-back) a hormon további hatását. Ha viszont a hard fitohormonokat (pl. az indolil-valsavat) soft analógjaikká alakítjuk, a szabadgyök kepződése és evvel együtt a maximum megjelenése megszűnik.

Az RMDD szerint adott vegyület „meglágyítása” gyakran úgy érhető el, hogy a molekulában lévő telített oldalláncokban két vicinális metilén csoportot velük izoelektronikus és izosztérikus észter- vagy fordított észter-csoporttal (soft-analóg) cserélnek ki. Ily módon az oxidatív metabolizációt hidrolitikusra változtatják, azaz szabadgyökképződés nem lép fel. Ekkor viszont a hatás görbe állandó határértékhez tart.

Hogy a hatásmechanizmus valóban szabadgyökös, azt különböző, más utakon is ellenőriztük. Egyrészt, a nem-módosított molekulaszerkezetű auxin táplálható szabadgyök-csapda tulajdonságokkal jellemezhető vegyületeket kevertünk, másrészt magába az auxin molekulába vittünk be olyan szubsztituenseket, amelyek szabadgyök-csapdaként viselkedtek. Mindkét esetben a hatásmaximum eltűnését kellett észlelnünk.

b) Biológiai lebomló komplexképzők szintézise valamely “vezérmolekula” szerkezeti elemeinek előre megtervezett úton történő módosításával.

Az emberi tevékenység során a környezetbe jutó különböző vegyi anyagok a főcél mellett – közvetve, vagy közvetlenül - számos, többnyire toxikus mellékhatást is kifejthetnek. Sajátos helyet foglalnak el az említett vegyszerek között a növényvilág számára fontos, elsősorban fémion-komplex alakban használt, makro-, mikro- és nyomelemek. A hagyományosan használt komplexképző ligandumok túlnyomó többsége nem toxikus (pl. az EDTA), azonban csak kis mértékben bomlik le biológiai úton, ami a környezeti felhalmozódásukhoz és a továbbiakban gyakran ma még beláthatatlan káros következményekhez vezet.

Az utóbbi évtizedek kutatásai eredményeképpen számos olyan kelátképző vegyületet terveztek meg és állítottak elő, amelyek biológiai lebonthatósága eléri a 80-90%-ot [12, 13]. Nézetünk szerint ezek a ligandumok (illetve a velük létrejött komplexek) úgy tekinthetők, mint a „soft” gyógyszerek és vegyszerek egy különleges csoportja.

A biológiai lebonthatóságnak számos molekulaszervezeti feltétele van. Kimutatták [11], hogy a kémiai szerkezetben végrehajtott aránylag kis módosítások az oxidációs-redukciós úton, hidrolitikusan vagy konjugációval végbemenő lebomlás mértékét és ütemét lényegesen befolyásolhatják. A tapasztalati adatokból, bár az átalakulások mechanizmusát sok esetben még nem ismerjük, több szabály körvonalazódott. Ezt a folyamatot csökkenti a szerves halogének, a nitro-, a nitrozo-, az azo-, az arilamino-csoportok, a lánclágazások (főleg a kvaterner szén és a terciér nitrogén), a policiklusok, a heterociklusok, az éteres kötés stb. jelenléte, de megkönnyítik az enzimatisz hidrolízissel felhasználható funkciók (pl. észterek, amidok), a hidroxil-, aldehides karbonil-, észter-csoport alakjában bevitt oxigén, az oxigenáz enzimekkel támadható nemszubsztituált egyenes alkil-láncok és fenilgyűrűk. Könnyen észrevehető a soft vegyszerek és a biodegradális vegyületek analógiája.

Jelenleg elfogadott, hogy a többszörösen szubsztituált szerkezetek kisebb sebességgel bomlanak le, mint az egyszerűbbek, továbbá az igen kis mértékben oldható vegyületek biológiai lebonthatósága fokozható az oldékonyságot növelő funkciók csoportok bevitelével.

A biológiai lebonthatóság relatív sebességének az előrejelzése a kémiai szerkezet alapján jelentősen hozzáférhetőbb lett a biztonságosan használható vegyszerek fogalmának bevezetésével [3, 4] és gyakorlati megtervezhetőségükkel. Az előrejelzésre matematikai modelleket használnak, amelyek közül nagy hagyományokra tekint vissza az ún. additív (fragmentációs) modell, amely a környezetkémiaiában azonban csak az utóbbi években terjedt el. Ennek a megközelítésnek az alap gondolata az, hogy a vizsgált funkció a molekula egy vagy több szubsztuktúrájának (fragmentumának) az egymástól független hozzájárulását tükrözi. Ez a feltétel azonban ritkán, vagy csak megközelítően teljesül. Újabban több, hatékonyabb modell-változatot dolgoztak ki, többnyire lineáris és nemlineáris algoritmusok alapján. Ezek a vegyületeket könnyen és nehezen, illetve előzetesen és véglegesen lebomló csoportokra osztják, és a biodegradáció sebességének félkvantitatív becslését teszik lehetővé, vizes közegben (BIODEG-adatbázis). Minden vegyülethez egy-egy minőségi jelzőt (descriptor) rendelnek, mint amilyen a BR (biodegradables rapidly) vagy a BSA (biodegradables slowly even with acclimation), és egy hitelességi kódot (reliability code), pl. a szűrés-követés (screening studies) stb.

I. táblázat. Szerkezeti fragmentumok és együtthatók

Fragmentumok	BIODEG modellek		Relevancia modellek	
	Lineáris együtthatók	Nemlineáris együtthatók	Előzetes együtthatók	Végleges együtthatók
Alifás OH	0,159	1,118	0,129	0,160
Alifás NH ₂ , NH	0,154	1,110	0,043	0,024
Alifás COOH	0,073	0,643	0,386	0,365
Tercier amin	-0,205	-2,223	-0,288	-0,225
Kvaterner (egyes kötésekkel kapcsolódó) szén	-0,184	-1,723	-0,153	-0,212

A szakirodalom számos EDTA-analóg komplexképzőt javasol növelt lebonthatóságú ligandumként [9, 10]. Ezek szerkezetének tanulmányozásából kiderül, hogy az általános szabályokkal is összhangban, a biodegradabilitást nagymértékben meghatározzák a nitrogén atomhoz kapcsolt szubsztituensek: $-H > -COCH_3 > -CH_3 > -C_2H_5 > -CH_2CH_2OH > -CH_2COOH$ vagy $-NHCOCH_3 > -N(COCH_3)_2$, továbbá: $-NHCH_2COOH > -N(CH_2COOH)_2$.

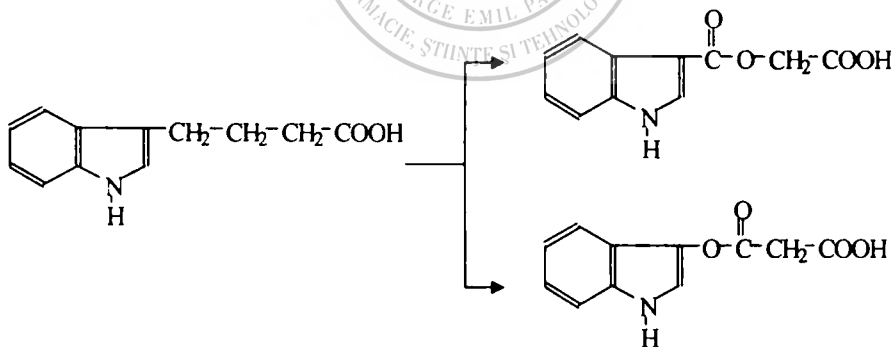
Bebizonyosodott továbbá, hogy a megfelelő nehézfém-komplexek biológiai lebonthatósága jobb, mint a ligandumoké.

KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK, MÓDSZEREK

a) Az auxinok vizsgálata

A „lágyított” auxinokat kutatócsoportunk szintetizálta. Azonosításukat, szerkezet- és tisztaságvizsgálatukat elemi analízissel és IR spektrumok alapján végezte [15].

A soft-analógokat az indolil-vajsavból származtattuk, ugyanis az oldallánc tartalmazza az ehhez szükséges vicinális metilén csoportokat:

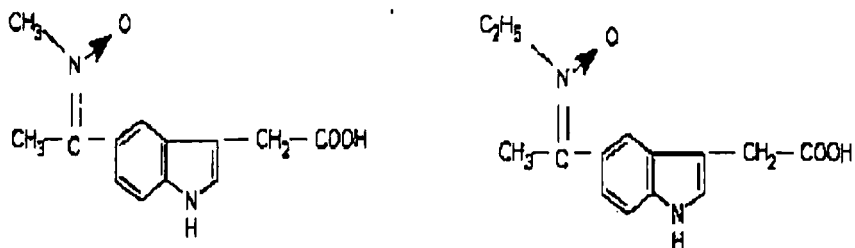


2. ábra. Az indolil-vajsav „meglágýtása”

Az összehasonlító vizsgálatok során az auxinhoz hozzáadott szabadgyökfogóként indulásként aszkorbinsavat használtunk. Folytatásképpen egyes nitronok hasonló hatását próbáljuk majd ki. Az észlelt jelenségek körülmintőbb magyarázata érdekében megvizsgáltuk a

tornaperoxidáz – auxin-oxigén rendszerben fellépő oszcillációs reakciókat is. A periódikus hatásváltozásokat potenciometriásan mértük.

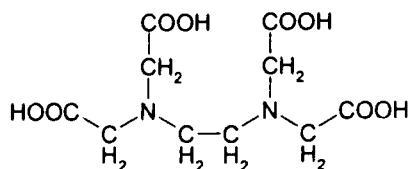
A határmechanizmus tisztázása érdekében kutatócsoportunk olyan vizsgálatokat is végzett, amelyekben a gyökfogót – ebben az esetben a nitron csoportot – nem az oldathoz adta, hanem az auxin szerkezetébe építette be:



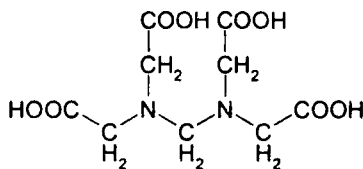
3. ábra. Oxiazometin (gyökfogó) csoportot tartalmazó auxinok

b) Biológiai lebomló EDTA-analógok vizsgálata

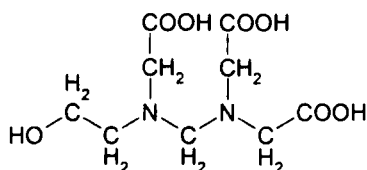
A biológiai lebomló komplexképzőket a Dr. E. J. Száva INGENIEURBURO (München) laboratóriumában terveztük meg és állítottuk elő. Ezek vegyületek szabadalommal védettek. A komplex-generátor fémionok a Mg(II), Ca(II), Mn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III) és a Zn(II) - a fitobiológia jellemző makro- és mikroelemei voltak. A ligandumok protonálódási állandóit, illetve a fém-komplexek stabilitási állandóit potenciometrikusán és spektrometriásan határoztuk meg. A szerkezeti képletek alább következnek*:



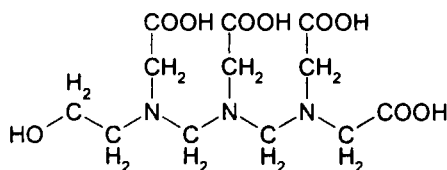
EDTA



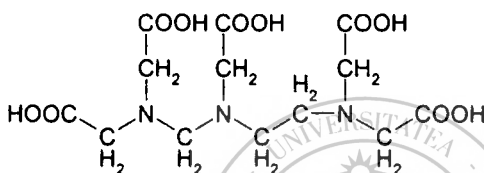
MDTA



HEMDTA



HEDTTA



METPA

4. ábra. A vizsgált ligandumok szerkezeti képletei

*A rövidítések a következő vegyületeket jelölik:

EDTA: {[2-(bis-karboximetil-amino)-etil]-karboximetil-amino}-ecetsav,

MDTA: {[bis-karboximetil-amino)-metil]-karboximetil-amino}-ecetsav,

HEMDTA: {[bis-karboximetil-amino)-metil]-(2-hidroxi-etil)-amino}-ecetsav,

HEDTTA: {karboximetil-[(karboximetil-[(karboximetil-(2-hidroxi-etil)-amino)-metil]-amino)-metil]-amino}-ecetsav,

METPA: {[2-(bis-karboximetil-amino)-etil]-karboximetil-amino}-metil]-karboximetil-amino}-ecetsav.

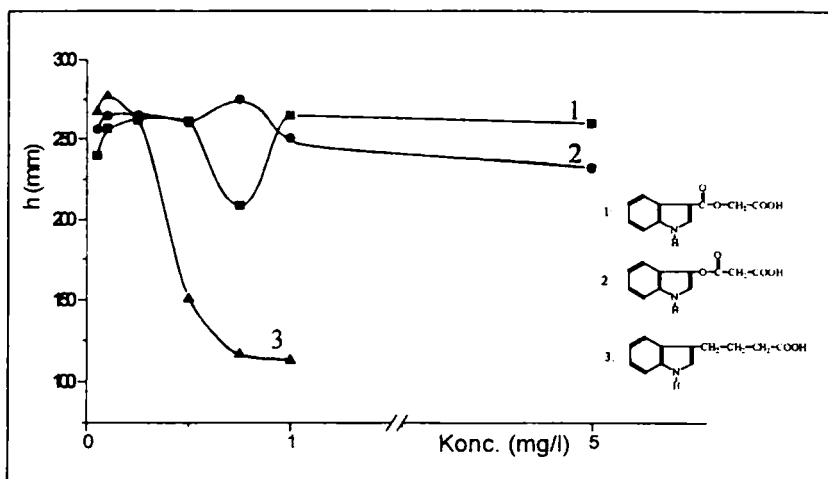
A komplexek tanulmányozására, a stabil konformációk kiválasztására, a sztérikus energiák számítására kiválóan alkalmasak a számítógépes modellezés, illetve a molekula-dinamikai számítások. Ezekhez a Chem3D (©Cambridge Soft) szoftvert [5] használtuk.

A statisztikai számításokat saját készítésű szoftver segítségével végeztük (Regress, Regressm, ©Ferencz L.).

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

a) Az auxinok vizsgálata

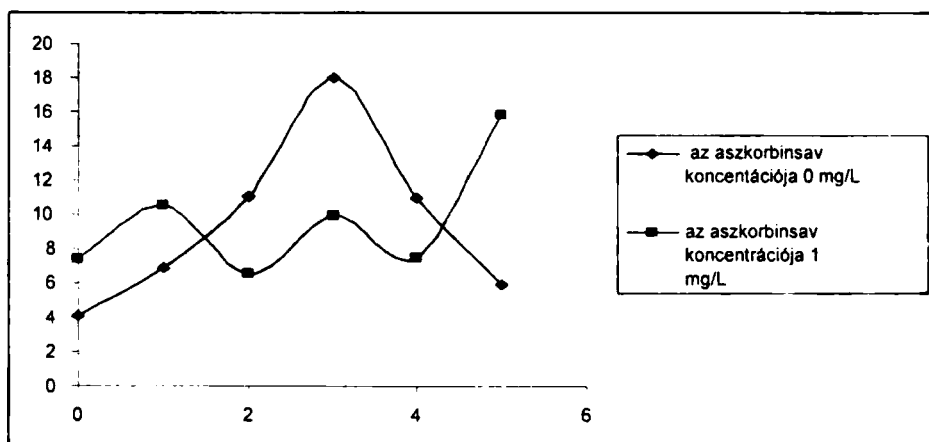
Kutatásaink során azt észleltük, hogy az auxin-hatás a „lág” IBS esetén nem halad át maximumon, hanem egy határérték elérése után, jó közelítéssel állandó marad, tehát az oxidatív bomlás kizárása a hatásgátlás megszűnésével jár együtt (5. ábra).



5. ábra. Az IBS és a megfelelő „lágy” észterek növekedés-serkentő hatása etiolált zabkoleoptilre

Ez az eredmény eredeti (szabadgyökös mechanizmusra vonatkozó) elképzelésünket igazolta. Logikus következtetésként feltételeztük, hogy minden szabadgyökfogó adaléknak az auxinok hatását hasonló módon kell befolyásolnia. Erre a célra elsősorban olyan anyagokra gondoltunk, amelyek a növényi szervezetek számára nem idegenek (pl. aszkorbinsav, polifenolok, nitronok stb.).

Az eredmények általában megfeleltek a várakozásnak, de a hatás a vártól sokkal komplexebb volt. Az éles maximumon való áthajlás nem jelentkezett, de – ezzel szemben – fellépett egy periodikus hatásingadozás, amelyet úgy értelmezünk, hogy a sorozatos serkentés-gátlás egy különleges esetének, mint oszcillációs jelenségnek, vagyunk a tanúi (6. ábra).



6. ábra. A csírák hosszának változása az auxinkoncentráció függvényében 120 óra után

Az egzotikus oszcillációs reakciók számos esete ismert mind a kémiában, mind pedig az élő szervezetekben, a fitobiológiában azonban hasonló jelenséget ritkán írtak le.

Ilyen jelenséget észlelt Degn [6] az auxin – peroxidáz – oxigén rendszerben. Azt tapasztalta, hogy in vitro oszcillációs reakciók lépnek fel, amit az oxigén-koncentráció változásának követésével mutattak ki. Mi ezt a jelenséget a rendszer redoxipotenciáljának a mérése útján tanulmányoztuk. Mivel az említett szerzők szerint egyes fenolok a reakciót fokozzák, megvizsgáltuk néhány növényi polifenol (morin, rutin) hatását is. Ezek a körülmények a növényi szervezetekben is kialakulhatnak. Bár a fellépő oszcillációs reakciók részletes mechanizmusa igen bonyolult, a megfigyelések alapján feltételezzük, hogy a növényélettanban ismert maximumon áthaladó auxin-hatás az oszcillációs folyamatok egyik természetes megnyilvánulási formája [7, 14].

Az auxinok szerkezetébe beépített oxiazometin csoportok ugyancsak csökkentették a hatás visszaesését. Az ezzel párhuzamosan elvégzett fitobiológiai vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a szintetizált vegyületek nem genotoxikusak (nem módosítják a növényi kromoszómák szerkezetét), a növekedésserkentő hatásmechanizmusuk pedig megfelel azoknak a kísérleteknek, amelyekben a gyökfogót az auxin oldatához adtuk.

b) Biológiai lebomló komplexképzők vizsgálata

Mivel a proton (hidróniumion) a komplexképző fémion-sorozat sajátos tagjának tekinthető, a modellek összehasonlításában a protonált ligandumok is szerepelnek, aminek indokoltsága a Larsson-szabályból is levezethető [2]. A szabálytól való eltérés sztérikus okokkal is magyarázható. A modellek ennek megértéséhez is segítséget nyújthatnak. Természetes, hogy elsőként az energetikai tényezőket vizsgáltuk meg. A kép teljességéhez az entrópikus jellemzők figyelembe vétele is egyaránt fontos. Maga a gyűrűzárás is ilyen hatás.

A modelleket jellemző sztérikus energiák a következő összetevőkből állnak: nyújtási, deformációs, torziós, nem-van der Waals-, van der Waals-, ion/dipólus, dipólus/dipólus-típusú kölcsönhatások energiái.

A rendszeres tanulmányozás érdekében, összefoglaló táblázatban (II. táblázat) bemutatjuk az össz-sztérikus energia-értékeket minden ligandum-fémion komplex esetében. Ezt követően statisztikailag feldolgozzuk az energiák és a fémionok főbb paraméterei közötti összefüggéseket.

II. táblázat. EDTA-analóg komplexek sztérikus energiái (E, kcal/mol)

Ionok	EDTA	MDTA	HEMDTA	HEDTTA	METPA
	4,788	7,494	10,412	12,697	11,252
Na ⁺	-24,800	-13,719	-12,899	-6,800	-17,751
K ⁺	-19,529	-9,596	-8,868	-1,510	-10,913
Mg ²⁺	-86,975	-58,498	-74,518	-59,963	-84,850
Ca ²⁺	-78,753	-52,341	-63,876	-52,693	-76,224
Sr ²⁺	-68,040	-43,281	-51,398	-42,081	-63,354
Ba ²⁺	-56,383	-37,463	-42,989	-35,356	-55,330
Mn ²⁺	-77,065	-52,342	-63,876	-52,693	-76,225
Cu ²⁺	-69,530	-47,082	-54,951	-46,830	-68,427
Fe ³⁺	-132,183	-93,029	-115,268	-99,738	-134,526
Fe ²⁺	-69,530	-47,082	-56,755	-47,035	-68,427
Zn ²⁺	-79,273	-52,342	-65,647	-52,954	-76,225

A vegyületek összehasonlításából látható, hogy bármelyik ionnal képzett komplexüket tekintve, azoknak össz-sztérikus energiája magasabb, mint a megfelelő EDTA-komplexeké. Ezt úgy értelmezzük, hogy reakcióképességük nagyobb, tehát biológiai lebonthatóságuk kedvezőbb, mint az EDTA-é. Ez az eredmény megfelel a szerkezetbeli módosításoknak, az alapvegyülethez képest. Látható, ugyanakkor, hogy a fémion-komplexek energiája kisebb, mint a megfelelő ligandumé, vagyis a komplexek biológiailag kevésbé bonthatók le. Így módon, az energiakülönbségek a biodegradabilitás közelítő mennyiségi mértékének is tekinthetők. Érdekes megemlíteni, hogy a Fe(III)-komplexek összenergiája a legalacsonyabb, ami nagyfokú stabilitásukkal összhangban van. Továbbá, a kétvegyértékű fémionokkal képezett komplexek össz-sztérikus energiája, az ún. *természetes somak* megfelelően, a réznél szélső értéket ér el.

Az összefüggéseket keresve kitűnt, hogy az össz-sztérikus energiák - bár külön-külön nem adnak elfogadható lineáris korrelációt az ionok valamely, adott paraméterével - szoros kapcsolatot mutatnak, ha néhány paraméterrel a megfelelő többváltozós korrelációt számítjuk ki. A legjobb eredményeket akkor kaptuk, amikor a sztérikus energiákat az ionsugarak, az ionizációs potenciálok, az iontöltések és a rendszámok négyváltozós regressziós egyenletével fejeztük ki. A következőkben rendre bemutatjuk mindenik poliamino-polikarbonsav típusú ligandum (az EDTA kivételével mindenik biológiailag lebontható) komplexekinek statisztikai tárgyalását.

Az EDTA 11 ionnal képzett négyváltozós regressziós egyenlete a következő:

$$E = 22,243 + 0,403 \cdot I_p + 4,996 \cdot R - 61,840 \cdot T + 0,604 \cdot Z$$

A korrelációs együttható $r^2 = 0,984$, a variációs együttható $V = -0,058$, a közepes négyzetes hiba $S = 4,02$, az F-teszt értéke pedig $F = 139,6$.

A biodegradábilis komplexek esetén, a hasonló statisztikai feldolgozással nyert eredmények a következők:

MDTA

$$E = 19,872 + 0,156 \cdot I_p + 4,050 \cdot R - 43,465 \cdot T + 0,413 \cdot Z$$

$$r^2 = 0,993; \quad V = -0,053; \quad S = 2,428; \quad F = 207,9$$

HEMDTA

$$E = 27,661 + 0,410 \cdot I_p + 6,982 \cdot R - 58,330 \cdot T + 0,590 \cdot Z$$

$$r^2 = 0,986; \quad V = -0,078; \quad S = 4,345; \quad F = 108,9$$

HEDTTA

$$E = 30,152 + 0,276 \cdot I_p + 7,068 \cdot R - 51,323 \cdot T + 0,450 \cdot Z$$

$$r^2 = 0,994 \quad V = -0,060 \quad S = 2,731 \quad F = 228,5$$

METPA

$$E = 28,534 + 0,485 \cdot I_p + 9,953 \cdot R - 65,773 \cdot T + 0,531 \cdot Z$$

$$r^2 = 0,993 \quad V = -0,053 \quad S = 3,50 \quad F = 219,4$$

A regressziós egyenletekből látható, hogy a legnagyobb súlya az iontöltéseknek és az ionrádiuszoknak van. Hatásuk ellentétes, ami az ionpotenciálok ismert szerepét sugalmazza hasonló esetekben. A többi paraméter hatása gyakran elhanyagolható. A korrelációs együtthatók szoros összefüggésre utalnak.

A komplexek stabilitási állandói az említett változókkal ugyancsak lineárisan korreláltak. Az EDTA esetén:

$$\log K_{st} = 3,4873 + 1,2148 \cdot I_p + 1,2699 \cdot R - 5,9774 \cdot T + 5,5134 \cdot 10^{-2} \cdot Z$$

$$r^2 = 0,946 \quad F = 17,40$$

Érdekes, de megmagyarázható az a tény, hogy míg az össz-sztérikus energia ugyancsak lineárisan korrelálható az említett változokkal, a stabilitási állandó logaritmusa és a sztérikus energia kapcsolata sokkal kevésbé szoros. A paradoxon szerkezeti – matematikai magyarázatához látnunk kell, hogy a két regressziós egyenlet megfelelő együtthatói lenyegesen eltérnek egymástól, ami ugyanazoknak a változóknak eltérő súlyát emeli ki. Az egymástól eltérő függések, érthető módon, a molekulák szerkezeti sajátosságait tükrözik.

Bebizonyítottuk, hogy a biológiaiilag lebontható ligandumok protonálódási állandóinak a logaritmusai mind egymás között, mind pedig az EDTA megfelelő állandóival lineárisan korrelálhatók (a linearitás a DMTPA esetén kevésbé látványos), bár az egymás közötti regressziós egyenletek meredekségei kisebbek, mint az EDTA – val szemben. Az eltérések sajátos sztereokémiai okokra vezethetők vissza: a legkisebb iránytangens a DMTETA esetén észlelhető, amelyben a karboxil-csoportok egymáshoz viszonyított távolságai a legnagyobbak, a DMTPA esetén viszont a szomszédos csoportok szerkezete változott meg.

$$pK_{a(DMTETA)} = (0,45 \pm 0,05) pK_{a(EDTA)} + (3,02 \pm 0,26) \\ n = 4; \quad r = 0,988; \quad s_0 = 0,44$$

$$pK_{a(DMTPA)} = (0,90 \pm 0,26) pK_{a(EDTA)} + (2,12 \pm 1,64) \\ n = 4; \quad r = 0,925; \quad s_0 = 1,73$$

$$pK_{a(META)} = (0,785 \pm 0,021) pK_{a(EDTA)} + (1,60 \pm 1,34) \\ n = 4; \quad r = 0,992; \quad s_0 = 0,14$$

$$pK_{a(MDTA)} = (0,760 \pm 0,86) pK_{a(EDTA)} + (1,15 \pm 0,53) \\ n = 4; \quad r = 0,988; \quad s_0 = 0,12$$

$$pK_{a(HEMDTA)} = (0,829 \pm 0,037) pK_{a(EDTA)} + (1,46 \pm 0,15) \\ n = 3; \quad r = 0,990; \quad s_0 = 0,12$$

Bebizonyítottuk, hogy Irving és Rosotti megfigyeléseinek megfelelően [2], a tanulmányozott sorozatban, a stabilitási állandók logaritmusai között jellemző, sőt, kitűnő lineáris korreláció lép fel. Ez a megállapítás érvényes mind arra az esetre, amikor adott fémion-pár különböző ligandumokkal képez komplexet, mind pedig a fordított esetben, ha adott ligandum-pár különböző kationokhoz koordinálódik. Ez a megállapítás csak azonos vegyértékű kationok reakciói esetén érvényes. Pl.:

$$\lg K_{st(Cu)} = (1,50 \pm 0,26) \lg K_{st(Zn)} - (1,65 \pm 4,06) \\ n = 5; \quad r = 0,981; \quad s_0 = 0,88$$

de

$$\lg K_{st(Cu)} = (0,55 \pm 0,16) \lg K_{st(FeII)} + (6,80 \pm 2,99) \\ n = 5; \quad r = 0,86; \quad s_0 = 1,35$$

Az eredmények összehasonlításából kitűnik, hogy a különböző ligandumokkal létrehozott komplexek sztérikus energiái és stabilitási állandói tükrözik az elektronszerkezetből következő ún. *természetes stabilitási sort*:

Mn < Fe(II) < Co(II) < Ni < Cu < Zn. Néhány példa a rendelkezésünkre álló adatokból:

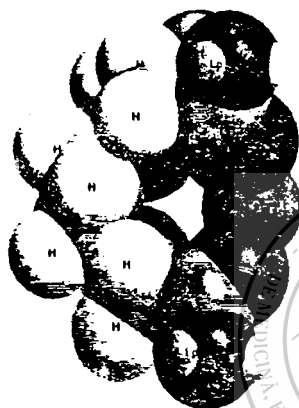
EDTA

Ion:	Mn(II)	Fe(II)	Co(II)	Ni(II)	Cu(II)	Zn(II)
Ig K_{st} :	13,47	14,45	16,10	18,45	18,80	16,50
E (kcal/mol):	-77,07	-69,53	?	?	-69,53	-79,27

METTA

Ig K_{st}	9,0	10,6	?	?	16,0	12,6
E (kcal/mol)	-76,22	-68,43	?	?	-68,43	-76,22

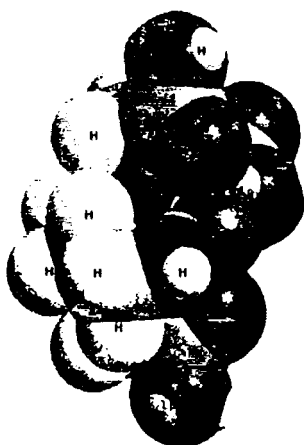
A tanulmányozott komplexképzők és komplexek sajátosságait modell-szerkesztéssel tettük szemléletessé. Néhányat a modellek közül (EDTA, MDTA és HEMDTA) a 7. - 10. ábrákon mutatunk be.



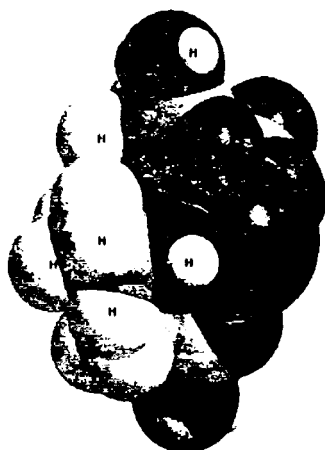
7. ábra. EDTA + Ca^{2+}



8. ábra. MDTA + Ca^{2+}



9. ábra. HEMDTA + Ca^{2+}



10. ábra. HEMDTA + Fe^{2+}

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy az auxinok lebomlása a növényi szervezetben, természetes körülmények között gyökös mechanizmus szerint megy végbe. Az auxin „meglágýtása” során a gyökös lebomlás helyett a hidrolitikus reakcióút válik valószínűbbé, nem jelentkezik tehát a keletkező szabadgyökök gátló hatása. Hasonló eredményhez jutunk, ha az auxin oldatához természetes gyökfogókat (aszorbinsavat, polifenolokat) adunk, vagy a gyökfogót (esetünkben nitroncsoportot) beépítjük az auxin szerkezetébe. A beépített nitroncsoportot tartalmazó auxinok genotoxicitására vonatkozó vizsgálatok eredményei negatívak.

A fitobiológiában igen ritkán tapasztalt oszcillációs jelenséget is megfigyelhettünk az auxin hatásmechanizmusában az auxinkoncentráció, valamint az idő függvényében.

2. Elkészítettük az EDTA és néhány analógja fitobiológiai szempontból fontos komplexek a sztereokémiai modelljét. Bebizonyítottuk, hogy a ligandumok és a fémionok összsztérikus energiái és a komplexképzők, valamint a komplexek biológiai lebonthatósága között szoros kapcsolat van, ami a bidegradabilitás szerinti rangsorolásukat is lehetővé teszi.

Következtetéseket vontunk le a korrelációs paraméterek és a komplexek sztereokémiai jellemzői között. Ezek az összefüggések felhasználhatók a komplexek sztérikus energiái, entrópia-változásai, stabilitása és várható biodegradabilitása közötti minőségi és mennyiségi viszonyok felderítésében.

IRODALOM

1. ANTOLIĆ S, SALOPEK B, KOJIĆ-PRODIĆ B et al – *Structural characterization and auxin properties of dichlorinated indole-3-acetic acids*, Plant Growth Regulation, 1999, 27: 21 - 31.
2. BECK M – *Komplex egyensúlyok kémiája*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1965.
3. BODOR N – *Design of biologically safer chemicals based on retrometabolic concepts*, in De Vito SC, Garrett RL (eds.): *Designing safer chemicals. Green chemistry for pollution prevention*, Amer. Chem. Soc., Washington, 1996, 84-115.
4. BOETHLING R – in De Vito SC, Garrett RL (eds.): *Designing safer chemicals. Green chemistry for pollution prevention*, Amer. Chem. Soc., Washington 1996, 157-171.
5. Chem Office 2005, Chem 3D Ultra 9.0.1.
6. DEGN H – *Chemiluminescence in oscillatory oxidation reactions catalyzed by horseradish peroxidase*, in: Chance B, Pye EK, Ghosh AK, Hess B (eds.): *Biological and biochemical Oscillators*, Academic Press, New York-London, 1973, p. 97-108
7. DONÁTH-NAGY G, TÖKÉS B., SZILÁGYI E – *Studiul unor oscilatori fitobiologici*, Revista de Medicină și Farmacie – Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle, 2004, 50:17-20
8. LABÁDI I, J. SZÁVA – *Új biológiailag könnyen lebontható szerves komplexképző anyagok kifejlesztése és laboratóriumi vizsgálata*, XXXVI. Komplexkémiái Kollokvium, Pécs, 2001.
9. PETTIT D, POWELL KK – *Stability constants database*. Academic Software, IUPAC, Othey, UK, 1997, 25-30.
10. PETTIT D, POWELL KK – *Stability constants database*. Academic Software, IUPAC, Othey, UK, 1997, 132-139.
11. SCHOWANEK D, FEJTEL TCJ, PERKINS CHM et al. – *Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), a transition metal chelator*, Chemosphere, 1997, 34: 2375-2391
12. SZÁVA E – *Introduction of a new multipurpose chelating agent and its recommended field of application*. 8th International Trace Element Symposium, Budapest, 1999.
13. SZÁVA E – *Új környezetbarát ipari komplexképzők előállítása és vizsgálata*, Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság, VII. Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2001

14. SZILÁGYI E – *Reacții oscilante. Aplicații fitobiologice*, Lucrare de diplomă, Universitatea de Medicină și Farmacie, Tg. Mureș
15. TÖKÉS B, FERENCZ L, SZAKÁCS J, KELEMEN L et al – *Retrometabolic approaches in phytochemistry*, Pharmazie, 2000, 55:244-245.
16. TÖKÉS B, SZÁVA J, DUŠA S, VINTILĂ A, DONÁTH-NAGY G, GÁL GY – *Szerkezet - tulajdonság összefüggések biológiailag lebontható komplexképzők fitokémiájában*. Környezettudományi Konferencia, Kolozsvár, 2005. március 17-18.
17. TÖKÉS B, SZÁVA J, DUŠA S, VINTILĂ A, DONÁTH-NAGY G, GÁL GY – *Soft ligands – biodegradable complexants in plant cultivation and environmental protection*, Pharmazie, 2006, 61:166-170.



Plante medicinale din flora spontană a județului Mureș

Silvia Oroian

Universitatea de Medicină și Farmacie Targu-Mures, Str.Gh.Marinescu nr. 38 Targu-Mures, Romania

Plantele medicinale constituie o importantă bogăție naturală a județului Mureș. Stabilirea rezervelor de genofond vegetal de interes terapeutic se poate realiza prin inventarierea plantelor pe localități, deoarece acest lucru redă răspândirea corectă teritorială a plantelor medicinale, în strânsă legătură cu diversele fitocenoze în care se găsesc și cu factorii ecologici. Deoarece inventarierea plantelor medicinale a devenit o tradiție a disciplinelor de Botanică farmaceutică și Farmacognozie din cadrul Facultății de Farmacie din Tg-Mureș, am inițiat un astfel de studiu în județul Mureș. Au fost inventariate 304 specii de plante medicinale. Cele mai numeroase plante conțin: uleiuri volatile (14,14%), taninuri (12,82%), alcaloizi (12,17%), flavonoide (10,52%), saponine și mucilagii (7,89% fiecare), iridoide și cumarine (4,27% fiecare) etc.

Cuvinte cheie: plante medicinale, principii active, județul Mureș

The medicinal plants constitute an important natural richness of the Mures County. The establish of the vegetal genofond reserves with therapeutic interest can be realize through the plants inventory taking on counties, because these reproduce the correct territorial distribution of the medicinal plants according with diverse phytocoenosis and with ecological factors. It was initiated these study in the Mures County, because the plants inventory taking became a tradition of the Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy fields from Faculty of Pharmacy Targu-Mures. It has been inventoried 304 species of the medicinal plants. The most numerous plants contain: volatile oils (14.14%), tannins (12.82%), alkaloids (12.17%), flavonols (10.52%), saponins and mucilages (7.89% each), iridoïdes and cumarines (4.27% each).

Key words: medicinal plants, active principles, Mures County

Înzestrat generos cu frumuseți naturale, județul Mureș prezintă un remarcabil interes științific, deoarece nu a beneficiat până în prezent de o prezentare mai cuprinzătoare a plantelor medicinale de pe teritoriul său.

Pentru înțelegerea modului de inserare a covorului vegetal pe substratul pedografic, este necesar să cunoaștem principalele trăsături fizico-geografice ale județului (relief, climă, ape, soluri), a relațiilor dintre ele și a modului în care ele participă la realizarea ambianței ecologice și cenotice a plantelor.

Județul Mureș este situat în zona central-nordică a României, având o suprafață de 6696 km², ce coboară ușor în trepte de pe vârfurile vulcanice ale Munților Călimani și Gurghiu, până spre mijlocul Câmpiei Transilvaniei, fiind brăzdată de Valea Mureșului și fragmentată de afluenții acestuia.

Relieful este variat, cu climă diferențiată pe scara altitudinală, de la abundența precipitațiilor din zona montană până la ariditatea stepică a Câmpiei Transilvaniei. În marele complex natural diversitatea plantelor este explicabilă, și nu întâmplător dispunem de adevărate stațiuni sălbatice, unde s-a menținut peisajul natural, deținătoare a unor bogate și valoroase flore medicinale.

Gezaa munților vulcanici Călimani și Gurghiu, situați pe bordura vestică a Carpaților Orientali centrali, este puternic legată de erupțiile vulcanice. Conurile muntoase ale Călimanilor, de pe rama vestică, sunt alcătuite din andezite, iar platourile vulcanice, formate din aglomerate, sunt acoperite de pășuni montane cu mici suprafețe mlăștinoase. În munții Gurghiuului conurile vulcanice apar îngemănate, platourile sunt mai largi și mai domoale. Defileul Mureșului, îngust, cu versanții foarte apropiați, reprezintă cea mai mare secțiune prim lanțul vulcanic din răsăritul bazinului ardelean. Trecerea dinspre zona

muntoasă spre Podișul Transilvaniei se face prin intermediul unor regiuni deluroase și depresionare.

Podișul Târnavelor este un ținut deluros ușor ondulat, relief de cueste și cu versanți asimetrici afectați de alunecări de teren, caracterizat prin prezența domurilor gazeifere. Câmpia Transilvaniei, situată la nord de Mureș, apare ca o regiune geografică cu trăsături originale ce-i conferă o notă de distincție. Relieful se caracterizează printr-un ansamblu de coline rânduie în interfluvii prelungi și foarte ramificate, cu altitudini mai mici, media fiind 400 m, cu denivelări care ajung la peste 200 m la nivelul de bază local, văi săpate în argile, marne și nisipuri sarmațiene, rar tufuri vulcanice, cu flancuri erodate și curgeri noroioase, alunecări de teren care pe alocuri au barat râurile, formând lacuri, care astăzi sunt amenajate în mari eleștee. Versanții de coastă au de obicei orientare vestică sau sudică.

Din punct de vedere hidrografic, județul Mureș are o rețea bogată de ape curgătoare, de lacuri și eleștee, dar un volum mai redus de ape subterane, freatice și de adâncime. Apele subterane de medie și mare adâncime au o mineralizare foarte puternică, cu conținut ridicat de Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , SO_4^- , Cl^- , Br^- , I^- . Mineralizarea este caracteristică zonelor cu domuri gazeifere. Teritoriului județului Mureș îi aparține bazinul hidrografic Mureș, pe suprafața lui fiind 214 cursuri de ape, ceea ce corespunde unei densități de 0,40 km/km².

Din punct de vedere climatic, teritoriul județului Mureș se situează în sectorul cu climă temperat continentală, de interferență între clima de deal și cea a munților. Temperaturile medii anuale au valori de 8°-9°C în partea de vest și între 2°- 4°C în est. Precipitațiile atmosferice reflectă factura climatului temperat, în care zonalitatea și orientarea reliefului se impune cu precădere. Mediile multianuale de precipitații variază între 550 mm/an și 1000 - 1200 mm/an. Vânturile predominante sunt cele din vest și nord-vest, cu intensitate și frecvență mijlocie.

De pe crestele înalte ale munților și până în luncile joase ale râurilor, întâlnim o gamă largă de soluri zonale, intrazonale și azonale.

În zona de munte sunt specifice solurile montane brune, brune gălbui podzolite sau brune acide de pajiști alpine, brune de pădure acide și podzolice feriluviale, iar pe versanți soluri tinere de grohotișuri, precum și soluri scheletice.

În zona de deal și podiș, mai frecvente sunt solurile silvestre, brune închise de pădure, pe alocuri argiloiluviale, podzolice argiloiluviale pseudogleizate, brune de pădure cernoziomice, soluri erodate și coluviale la baza versanților.

În regiunea Câmpiei Transilvaniei predomină solurile silvestre brune și mai ales cernoziomurile levigate, soluri negre de fânață umedă, bălane de coastă și soluri erodate, cernoziomurile levigate freatic umede și izolat gleice și humicogleice.

MATERIAL ȘI METODĂ

Lista plantelor medicinale vasculare din județul Mureș a fost elaborată pe baza cercetărilor efectuate în perioada 1995-2006, precum și a informațiilor bibliografice. La acestea se mai adaugă informațiile cuprinse în Herbarul Muzeului de Științele Naturii din Târgu Mureș. În acest studiu am adoptat soluțiile nomenclaturale care sunt considerate corecte în conformitate cu Codul Internațional de Nomenclatură Botanică (Code de Tokyo, 1993).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din studiile efectuate reiese că inventarul floristic al plantelor medicinale cuprinde 304 specii cu conținut cert în compuși chimici terapeutici. Plantele medicinale au fost grupate în funcție de principiile active dominante pentru care ele sunt utilizate în medicina tradițională, respectiv în fitoterapie (tabelul 1). Astfel observăm că cele mai numeroase plante conțin: uleiuri volatile (14,14%), taninuri (12,82%), alcaloizi (12,17%), flavonoide (10,52%), saponine și mucilagii (7,89% fiecare), iridoide și cumarine (4,27% fiecare) etc.

Interesul deosebit manifestat astăzi, pe plan mondial, pentru medicina naturistă, în cadrul căreia fitoterapia ocupă un loc privilegiat, poate avea uneori repercursiuni negative pentru conservarea unor specii vegetale din flora spontană, așa cum sunt: *Achillea ptarmica*, *Aconitum firmum*, *Aconitum moldavicum*, *Acorus calamus*, *Adonis vernalis*, *Agrostema githago*, *Alcea pallida*, *Angelica archangelica*, *Arnica montana*, *Dictamnus albus*, *Galanthus nivalis*, *Leucojum vernum*, *Lycopodium clavatum*, *Orchis militaris*, *Orchis morio*, *Orchis purpurea*, *Polemonium caeruleum*, *Prunus tenella* etc.

Deoarece recoltarea plantelor va continua să prezinte o necesitate economică și în deceniile următoare, se impune inițierea unor experiențe de introducere în cultură a lor, pentru dăinuirea acestor plante pe meleagurile noastre.



Tabel 1 – Principiile active dominante ale plantelor medicinale din flora spontană a județului Mureș și localizarea lor

PRINCIPIILE ACTIVE DOMINANTE	SPECIA	LOCALITATEA
SPECII CU ACȚIUNE FIZICĂ	<i>Lycopodium clavatum</i>	Gurghiu, Lăpușna, Răstolița, Săcădat, între Săcădat și Sovata, Valea Bătrâna, Valea Gurghiului-Măgura
HOMOGLICANI	<i>Arctium lappa</i>	Aluniș, Band, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Chibed, Cloașterf, Dubiște, Ghindari, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Ibănești, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Răstolița, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Sântana de Mureș, Târgu-Mureș, Valea Isticeu
	<i>Bryonia alba</i>	Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Cașva, Cornești, Crăiești, Fântânele, Gălăoaia, Idrifaia, Răstolița, Reghin, Sălard, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara
	<i>Elymus repens</i>	Abuș, Band, Bălăușeri, Cașva, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Daia, Jabenita, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șarpotoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Inula helenium</i>	Adrian, Aluniș, Archita, Band, Beica, Daia, Gurghiu, Jabenita, Mihai Viteazu, Saschiz, Sighișoara
MUCILAGII	<i>Alcea pallida</i>	Bahnea, Cund, Daia, Mihai Viteazu, Mureni, Târgu-Mureș
	<i>Athaea officinalis</i>	Bahnea, Band, Cund, Daia, Mihai Viteazu, Târgu-Mureș
	<i>Anchusa officinalis</i>	Band, Băgaciu, Gănești, Mihai Viteazu, Mureni, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Antennaria dioica</i>	Bălăușeri, între Sovata și Săcădat, Târgu-Mureș
	<i>Hibiscus trionum</i>	Bahnea, Band, Bălăușeri, Călimănești, între Cornești și Crăiești, Fântânele, Găești, Herghelia, Idrifaia, Reghin, Săbed, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara
	<i>Lavatera thuringiaca</i>	Apold, Archita, Band, Bălăușeri, Daia, Daneș, Mureni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Șarpotoc, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Linum catharticum</i>	Apold, Archita, Bahnea, Band, Băgaciu, între Băla și Ercea, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Daia, Daneș, Herghelia, Mihai Viteazu, Saschiz, Săbed, Sântana de Mureș, Stejărenii, Șaeș, Șarpotoc, Târgu-Mureș, Tirimia, lângă Viforoasa, Vulcan
	<i>Linum flavum</i>	Apold, Archita, Band, Bălăușeri, Cloașterf, Daia, Herepea, Mihai Viteazu, Mureni, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șaeș, Târgu-Mureș, Vulcan, Zau de Câmpie

MUCILAGII	<i>Linum hirsutum</i>	Cloașterf, Criș, Daia, Lechința, Mihai Viteazu, Stejărenii, Târgu-Mureș
	<i>Malva neglecta</i>	Band, Cornești, Crăiești, Dulcea, Lunca Bradului, Răstolița, Reghin, Șăulia de Câmpie, Târnăveni
	<i>Malva sylvestris</i>	Aluniș, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Fărăgău, Gurghiu, Herghelia, Lacul Fărăgău, Răstolița, Reghin, Săbed, Târgu-Mureș
	<i>Orchis militaris</i>	Gurghiu, Răstolița, Sovata
	<i>Orchis morio</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Bistra Mureșului, Scaunul Domnului, Călimănești, Chibed, Criș, Daneș, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Idrifaia, Jabenita, între Mureni și Archita, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Valea Sălardului, Vălenii de Mureș, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Orchis purpurea</i>	Gurghiu
	<i>Plantago lanceolata</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica, Bezid, Călimănești, Chibed, Cerghid, Cloașterf, Cornești, Daia, Daneș, Dulcea, Fărăgău, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Jabenita, Lăpușna, Mica, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Porumbeni, între Răzoare și Șăulia, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Stănceni-Meștera, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Vișoara, Valea Bătrâna, Valea Creanga Albă, Valea Secuieu, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Plantago major</i>	Aluniș, Apold, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Cornești, Criș, Daia, Dubiște, Dulcea, Fărăgău, Fântânele, Ghindari, Idrifaia, Jabenita, Lacul Fărăgău, Laslăul Mare, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Răstolița-Iod, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Ilvei, Vișoara, Vulcan
	<i>Plantago media</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Călimănești, Chibed, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Cornești, Criș, Daia, Daneș, între Deda și Bistra Mureșului, Dulcea, Fărăgău, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lăpușna, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Stănceni-Meștera, Șaeș, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Tussilago farfara</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, între Cerghid și Mica, Chibed, Cornești, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Mihai Viteazu, M-ții Călimani (văile: Ilvei, Valea de Mijloc, Răchitiș, Sălardului), Orșova, Răstolița, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sălard, Sângiorgiu de Pădure,

MUCILAGII		Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vaidacuta, Vișoara, Valea Secuiei, Zau de Câmpie
	<i>Verbascum densiflorum</i>	Valea Gurghiului la Sirod, Valea Secuiei
	<i>Verbascum lychnitis</i>	Aluniș, Androneasa, Gălăoaia, Ibănești, Lunca Bradului, Mureni, Răstolița, Reghin, Stănceni-Meștera
	<i>Verbascum nigrum</i>	Lăpușna, Pădurea Mociar-Gurghiu, pădurea de lângă Poiana Narciselor Gurghiu, Răstolița, Reghin
	<i>Verbascum phlomoides</i>	Bahnea, Band, Bălăușeri, Beica, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Criș, Fântânele, Ghindari, Ibănești Pădure, Idnfaia, Porumbeni, Răstolița, Saschiz, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vișoara, Zau de Câmpie
	<i>Verbascum phoeniceum</i>	Band, Criș, Cloașterf, Jabenita, între Mureni și Archita, Reghin, Târgu-Mureș
	<i>Verbascum thapsus</i>	Adrian, Bălăușeri, Reghin
GLICOZIDE SENEVOLICE	<i>Brassica nigra</i>	Bălăușeri, între Ibănești și Gurghiu, Sovata
	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Band, Cașva, Răstolița, Reghin, Săbed, Târgu-Mureș
	<i>Sisymbrium officinale</i>	Aluniș, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Reghin, Săbed, Sovata, Târgu-Mureș-Beș, Valea Ilvei
GLICOZIDE FENOLICE	<i>Calluna vulgaris</i>	M-ții Gurghiului pe Valea Fâncelului, M-ții Călimani (pădurile de pe Valea Bistrei: Stegii, Valea de Mijloc, Cofu)
	<i>Filipendula ulmaria</i>	Aluniș, Chibed, Ciobotani, Deda, Dubiște, Dulcea, Herghelia, Ibănești, Lunca Bradului, Lăpușna, M-ții Gurghiului (pe văile: Lăpușna, Secuiei, Sirod), Orșova, Păuloaia, Poiana Narciselor-Gurghiu, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Solovăstru, Sovata, Stănceni-Meștera, Valea Ilvei, Valea Iodului, Valea Răchitiș, Valea Sălardului, Valea Secului, Valea Tihului, Zau de Câmpie
	<i>Populus nigra</i>	Adămuș, Bălăușeri, Bezid, Chibed, Ghindari, Gurghiu, Idrifaia, Lunca Bradului, Răstolița, Reghin, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Târgu-Mureș, Valea Gurghiului
	<i>Populus tremula</i>	Aluniș, Androneasa, Bălăușeri, Cașva, Criș, Dubiște, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Mihai Viteazu, Orșova-cătunul Seci, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș
	<i>Pyrus pyraeaster</i>	Aluniș, Cloașterf, Crăiești, Criș, Herepea, Daia, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, între Mureni și Archita, Răstolița-Iod, Reghin, Saschiz, Săbed, Solovăstru, Stejărenii, Șarpacoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, cursul superior al Târnaviei Mici, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Salix alba</i>	Albești, Aluniș, Band, Cașva, Cloașterf, Deda, Dubiște, Dulcea, Fărăgău, Ibănești, Lăpușna, Răstolița-Iod, Reghin, Păuloaia, Saschiz, Săbed, Sighișoara Solovăstru, Târgu-Mureș, Valea

GLICOZIDE FENOLICE		Sălardului
	<i>Salix caprea</i>	Aluniș, Androneasa, Band, Bălăușeri, Beica, Gălăoaia, Gurghiu, Iod, M-ții Gurghiuului (văile Glăjărie, Lăpușna, Pietroasa, Secuieu, Sirod), Orșova Pădure, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, cursul superior al Târnavei Mici, Valea din Mijloc, Valea Sălardului, Valea Tihului
	<i>Salix cinerea</i>	Abuș, Adămuș, Aluniș, Cașva, Dubiște, Dulcea, Gurghiu-Poiana Narciselor, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Orșova Pădure, Piatra Orșova, Reghin, Saschiz, Săbed, Sighișoara, între Stânceni și Ciobotani, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Valea Sălardului, Valea Secului
	<i>Salix fragilis</i>	Adămuș, Band, Bălăușeri, Cloașterf, Dulcea, Gurghiu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sighișoara, Solovăstru, Târgu-Mureș, Valea Sălardului
	<i>Salix purpurea</i>	Band, Bălăușeri, Cașva, Cloașterf, Dubiște, Ibănești Pădure, Lunca Bradului, Răstolița-Iod, Saschiz, Sighișoara, între Stânceni și Ciobotani, Valea Ilvei, Valea Sălardului
	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Glăjărie, Lăpușna, Lunca Bradului, Răstolița, între Săcădat și Sovata, Valea Bătrâna, Valea Sirodului, Vârful Seaca Mică, Valea Bistrei (pădurile Stegii, Valea de Mijloc), Valea Sălardului, Gălăoaia
	<i>Viburnum opulus</i>	Aluniș, Apold, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, între Cornești și Crăiești, între Deda și Bistra Mureșului, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești Pădure, Idrifaia, Lunca Bradului-Neagra, Răstolița, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara
DERIVAȚI ANTRACHINONICI	<i>Frangula alnus</i>	Adrian, Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, între Deda și Bistra Mureșului, Dubiște, Fântânele, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Idrifaia, Lunca Bradului-Neagra, Miercurea Niraj, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, cursul mijlociu al Târnavei Mici, Vaidacuta, Vișoara
	<i>Rhamnus cathartica</i>	Band, Bălăușeri, Beica, Budiu, Gurghiu, Herghelia, Saschiz, Săbed, Zau de Câmpie, Valea Bistrei: După Bistra, Zăpodea Ursului, Blidăreasa
	<i>Rumex acetosa</i>	Adrian, Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Beica de Sus, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, între Cerghid și Mica, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Ibănești, Ibănești Pădure, Idrifaia, Jabenita, Lăpușna, Mihai Viteazu, Orșova-cătunul Seci, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sângiorgiu de Mureș, Sângiorgiu de Pădure, Sântana de Mureș, Stânceni-Meștera, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Secuieu, Vișoara, Zau de Câmpie
	<i>Rumex acetosella</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Beica, Bezid, între Bistra Mureșului și Răstolița, Cașva, Călimănești, Chibed, Cornești, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Glăjărie,

DERIVAȚI ANTRACHINONICI		Gurghiu, Ibănești, Idrifaia, Jabeșița, Lăpușna, Mihai Viteazu, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Stânceni, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Rumex alpinus</i>	între Deda și Bistra Mureșului, Gălăoia, Gurghiu, M-ții Gurghiuului (văile: Creanga Albă, Lăpușna, Secuieu, Sirod, Saca), Răstolița, cursul superior al Târnaviei Mici, între Săcădat și Sovata, Valea Sălărdului, Valea Secuiei
	<i>Rumex conglomeratus</i>	Dulcea, Glăjărie, Gurghiu, Ibănești, Ibănești Pădure, Lăpușna, Reghin, Sovata, Târgu-Mureș, Valea Creanga Albă, Valea Secuieu
	<i>Rumex crispus</i>	Abuș, Aluniș, Archita, Band, Bălăușeri, Fărăgău, Bistra Mureșului, între Călimănești și Sângiorgiu de Pădure, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Coroisânmartin, Daia, Daneș, Dubiște, Dulcea, Gurghiu, Ibănești, Idrifaia, Mihai Viteazu, Saschiz, Săbed, Sărățeni, Sighișoara, Sântana de Mureș, Sovata, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Târnăveni, Trei Sate
NAFTODIANTRONE	<i>Hypericum maculatum</i>	Aluniș, Bahnea, Bălăușeri, Călimănești, Fântânele, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lăpușna, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiuului (Brădețel, Lăpușna, Saca, Valea Bătrâna, Valea Creanga Albă, Valea Secuieu, Valea Sirodului), Orșova Pădure, Răstolița, între Săcădat și Sovata, Săbed, Valea Sălărdului, Valea Secuiei, Vișoara, Zau de Câmpie
	<i>Hypericum perforatum</i>	Adrian, Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica de Jos, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gălăoia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Hodac, Idrifaia, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Păuloaia, Răstolița-Viș, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Stânceni-Meștera, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Valea Bătrâna, Valea Sălărdului, Valea Secuieu, Vulcan, Zau de Câmpie
GLICOZIDE CARDIOTONICE	<i>Adonis vernalis</i>	Band, Băgaciu, între Băla și Lefaia, Bălăușeri, Beica de Sus, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Herepea, între Herepea și Crăiești, Herghelia, Mihai Viteazu, Porumbeni, Saschiz, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Vaidacuta, Valea Izvoarelor, Zau de Câmpie
	<i>Asparagus officinalis</i>	Abuș, Adrian, Aluniș, Archita, Band, Cloașterf, Criș, Daia, Mihai Viteazu, Reghin, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Convallaria majalis</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Călimănești, Cloașterf, Cornești, Crăiești, Fântânele, Glodeni, Gurghiu, Herghelia, Idrifaia, Saschiz, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Bistrei, Vișoara
	<i>Digitalis grandiflora</i>	Androneasa, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Crăiești, Dubiște, Fântânele, Gălăoia, Ghindari, Gurghiu, Idrifaia, Lăpușna, Lunca Bradului, Răstolița, Reghin, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stânceni, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia,

GLICOZIDE CARDIOTONICE		Valea Sălardului, Vișoara, Zau de Câmpie
	<i>Erysimum cheiranthoides</i>	Răstolița, Reghin, Săbed, Stânceni-Ciobotani
	<i>Erysimum odoratum</i>	Între Băla și Ercea, Band, Herghelia, Saschiz, Săbed, Stânceni, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Euonymus europaea</i>	Aluniș, Band, Cloașterf, Gurghiu, Herghelia, Lunca Bradului-Neagra, Orșova, Răstolița, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, cursul mijlociu al Târnavei Mici, Valea Ilvei, Valea Pietroasa, Zau de Câmpie
	<i>Euonymus verrucosa</i>	Bălăușeri, Gurghiu, Herghelia, Lunca Bradului-Neagra, Răstolița, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Sălardului
	<i>Helleborus purpurascens</i>	Aluniș, Apold, Bahnea, Băgaciu, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Între Crăiești și Herepea, Criș, Deda, Fărâgău, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Idrifaia, Lăpușna, Mihai Viteazu, Mureni, Reghin, Saschiz, Săbed, Săcădat, Sângiorgiu de Pădure, Sovata, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Sălardului, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Leonurus cardiaca</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Ghindari, Fântânele, Ibănești Pădure, Idrifaia, Lacul Fărâgău, Lunca Bradului, Orșova, Răstolița, Saschiz, Între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnaveni, Valea Sălardului, Vișoara, Zau de Câmpie
SAPONINE	<i>Agrostema githago</i>	Adrian, Band, Bălăușeri, Lunca Bradului, Târgu-Mureș
	<i>Anagallis arvensis</i>	Adrian, Aluniș, Androneasa, Band, Bălăușeri, Între Băla și Ercea, Beica de Jos, Cașva, Dubiște, Jăbenița, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Păuloaia, Răstolița, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Bellis perennis</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Fântânele, Ghindari, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Mihai Viteazu, Răstolița, Săbed, Între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Târnaveni, Vișoara, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Bupleurum falcatum</i>	Adrian, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, Beica de Sus, Cașva, Cloașterf, Criș, Daia, Între Deda și Toplița, Gurghiu, Ibănești, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Reghin, Saschiz, Săbed, Sovata, Stejărenii, Șaeș, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Eryngium campestre</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, Între Băla și Ercea, Beica de Sus, Cașva, Între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Gălăoia, Gurghiu, Herghelia, Lăpușna, Mihai Viteazu, Mureni, Porumbeni, Reghin, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șaeș, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, lângă Viforoasa, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Eryngium planum</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Bălăușeri, Între Băla și Ercea, Beica de Sus, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Crăiești, Criș, Daia, Daneș, Fântânele,

SAPONINE

	Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Idrifaia, Jabenita, Mihai Viteazu, Mureni, Reghin, Saschiz, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Sovata, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Equisetum arvense</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Comești, Criș, Deleni, Dubiște, Dulcea, Fântănele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lacul Fărăgău, Laslăul Mare, Lăpușna, Mihai Viteazu, Orșova Pădure, Orșova cătunul Seci, Răstolița, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sălard, Sângiorgiu de Pădure, Sânpaul, Sântana de Mureș, Stejărenii, între Stânceni și Ciobotani, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Ilvei, Vișoara, Zau de Câmpie
<i>Hedera helix</i>	Aluniș, Bălăușeri, Dubiște, Gălăoia, Herghelia, Ibănești, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Târgu-Mureș, Valea Sălardului, Zau de Câmpie
<i>Herniaria glabra</i>	Orșova, Răstolița-Valea Iodului, Reghin, Sărățeni
<i>Mercurialis annua</i>	Șăulia de Câmpie
<i>Mercurialis perennis</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Cloașterf, Herghelia, Lăpușna, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (văile: Creanga Albă, Glăjărie, Bătrâna, Saca, Secuieu), Orșova, Orșova Pădure, Răstolița, Reghin, Saschiz, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Iodului
<i>Ononis arvensis</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, Beica de Sus, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Jabenita, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Păuloaia, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sântana de Mureș, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Ononis spinosa</i>	Zau de Câmpie
<i>Polemonium caeruleum</i>	Gurghiu, M-ții Gurghiului (Valea Bătrâna, Valea Secuieu), M-ții Călimani (pe pârâul Voivodesei), Stânceni-Ciobotani
<i>Polygala comosa</i>	Adrian, Aluniș, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, Beica de Jos, Bezid, Cașva, Călimănești, între Cerghid și Mica, Chibed, Ciobotani, Daia, Daneș, între Deda și Bistra Mureșului, Dubiște, Fântănele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Jabenita, Lăpușna, Mihai Viteazu, Răstolița, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Stânceni, Șaeș, Târgu-Mureș, Valea Sălardului, Valea Secuieu, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Polygala major</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Beica de Sus, Bezid, Călimănești, între Cerghid și Mica, Chibed, Cloașterf, Comești, Criș, Daneș, Fântănele, Ghindari, Herghelia, Idrifaia, Mihai Viteazu, între Mureni și Archita, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Valea Sălardului, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie

SAPONINE	<i>Polygala vulgaris</i>	Aluniș, Bălăușeni, Bistra Mureșului, Cașva, Ciobotani, Gurghiu, Ibănești, Lăpușna, Mihai Viteazu, Păuloaia, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Stejărenii, Valea Bătrâna, Valea Sălardului
	<i>Primula elatior</i>	Bălăușeni, Herghelia, între Răstolița și Bistra Mureșului, Valea Iodului
	<i>Primula veris</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Călimănești, Cloașterf, Cornești, Daia, Daneș, Fântânele, Herghelia, Idrifaia, Mihai Viteazu, Răstolița, Saschiz, Stejărenii, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Iodului, Viișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Ranunculus ficaria</i>	Aluniș, Band, Bălăușeri, Deda, Fărăgău, Gura Fâncel, Gurghiu, Herghelia, Isticeu, Laslăul Mare, Orșova, Orșova Pădure, Reghin, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Tisieu, Zau de Câmpie
	<i>Saponaria officinalis</i>	Band, Bălăușeri, Dubiște, Herghelia, Păuloaia, Răstolița-Iod, Reghin, Solovăstru, Târgu-Mureș
	<i>Solidago virgaurea</i>	Androneasa, Bălăușeri, Gălăoia, Gurghiu, Iod, Lunca Bradului, M-ții Gurghiului, Răstolița, Reghin, Saschiz, Târgu-Mureș, Valea Ilvei, Zau de Câmpie
	<i>Viola arvensis</i>	Acățari, Band, Dulcea, Gurghiu, Ibănești Pădure, Lăpușna, Mihai Viteazu, Răstolița, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Târgu-Mureș, Valea Sebișului
	<i>Viola odorata</i>	Band, Băgaciu, Gurghiu, Reghin, Saschiz, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
FLAVONOIDE	<i>Anthriscus cerefolium</i>	Băgaciu, Gurghiu, Herghelia, Răstolița, Târgu-Mureș, Valea Sălardului
	<i>Anthriscus sylvestris</i>	Archita, Band, Bălăușeri, Cloașterf, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Lăpușna, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, Păuloaia, Saschiz, Sovata, Târgu-Mureș, Valea Ilvei, Valea Sirodului, Valea Secuiei
	<i>Betula pendula</i>	Aluniș, Bistra Mureșului, Gălăoia, Gurghiu, Lăpușna, Lunca Bradului, Răstolița, Reghin, între Săcădat și Sovata, Stânceni, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Valea Secuiei, Zau de Câmpie
	<i>Bidens tripartita</i>	Aluniș, Bălăușeri, Dubiște, Gălăoia, Herghelia, Ibănești, Iod, Lăpușna, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sovata, Târgu-Mureș
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Bezid, Bistra Mureșului, Călimănești, Chibed, Cloașterf, între Cornești și Crăiești, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Jăbenița, Lacul Fărăgău, Laslăul Mare, Lunca Bradului-Sălard, Mihai Viteazu, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Viișoara, Zau de Câmpie
	<i>Crataegus laevigata</i>	Reghin
	<i>Crataegus monogyna</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, între Băla și Ercea, Bezid, Bălăușeri, între Cerghid și

FLAVONOIDE

	Mica, Chibed, Cloașterf, Crăiești, Criș, Daia, Dubiște, Fărăgău, Fântănele, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Piatra Orșovei, Răstolița, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Sovata, Șarpator, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Viforoasa, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Dictamnus albus</i>	Bahnea, Band, Criș, Herghelia, Mihai Viteazu, Saschiz, Târgu-Mureș, Toldal, Vaidacuta, Zau de Câmpie
<i>Eupatorium cannabinum</i>	Aluniș, Bălăușeri, Cloașterf, Dubiște, Gălăoaia, Iod, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului (văile: Lăpușna, Secuieu, Sirod), Răstolița, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Stejărenii, Șaeș, cursul superior al Târnavi Mici, Valea din Mijloc
<i>Hieracium pilosella</i>	Adrian, Aluniș, Band, Bălăușeri, Beica de Sus, între Cerghid și Mica, Criș, Daia, Dulcea, Herghelia, Ibănești, Jăbenița, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, între Mureni și Archita, Reghin, Saschiz, Săbed, Sovata, Șaeș, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Linaria vulgaris</i>	Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Cuieșd, Dubiște, Fântănele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Ibănești, Idrifaia, Jăbenița, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara, Zau de Câmpie
<i>Morus alba</i>	Bălăușeri, Cașva, Cerghid, Gălăoaia, Glăjărie, Lunca Bradului-Neagra, Răstolița, Săbed
<i>Polygonum hydropiper</i>	Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Brădețel, Călimănești, Chibed, Cornești, Dubiște, Dulcea, Fântănele, Ghindari, Ibănești, Idrifaia, Iod, Gurghiu, Lăpușna, Lunca Bradului-Sălard, Răstolița, Saschiz, între Sovata și Săcădat, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Târnăveni, Vișoara
<i>Polygonum persicaria</i>	Daneș, Gurghiu, Lacul Fărăgău, Reghin, Sighișoara, Solovăstru, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vălenii de Mureș
<i>Prunus avium</i>	Aluniș, Androneasa, Band, Bălăușeri, Cloașterf, Dubiște, Fărăgău, Gălăoaia, Gurghiu, Herghelia, Orșova, Orșova Pădure, Păuloaia, Răstolița, Saschiz, Șăulia de Câmpie, Sighișoara, Zau de Câmpie
<i>Robinia pseudacacia</i>	Adămuș, Aluniș, Androneasa, Band, Bistra Mureșului, Cloașterf, Deda, Dubiște, Gălăoaia, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Ibănești, Iod, Lunca Bradului-Sălard, Răstolița, Săbed, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
<i>Sambucus racemosa</i>	Gurghiu, Lunca Bradului-Neagra, Orșova, Răstolița, cursul superior al Târnavi Mici, Valea Bătrâna
<i>Sambucus nigra</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Dulcea, Fântănele, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Idrifaia, Laslăul Mare, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (văile: Glăjărie, Lăpușna, Secuieu, Sirod, Saca), M-ții Călimani (Valea

FLAVONOIDE

	din Mijloc), Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vișoara, Zau de Câmpie
<i>Trifolium medium</i>	Apold, între Băla și Ercea, Cloașterf, Daia, Gurghiu, Herghelia. Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sovata, Șaeș, Șarpatoc, Valea Sălardului, Zau de Câmpie
<i>Trifolium montanum</i>	Androneasa, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Cloașterf, Criș, Daia, Gurghiu, Herghelia, Jăbenița, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sălard, Stânceni-Meștera, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Valea Sălardului, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Trifolium pratense</i>	Abuș, Adămuș, Androneasa, Apold, Archita, Bahnea, Band, între Băla și Ercea, Bezid, Budiu, Călimănești, Cerghid, Chibed, Ciobotani, Cornești, Coroisânmartin, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Fărăgău-lac, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Hodac, Ibănești, Idrifaia, Isticeu, Lăpușna, Mica, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Stânceni-Meștera, Șaeș, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Ilvei, Vălenii de Mureș, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Trifolium repens</i>	Abuș, Apold, Archita, Band, între Băla și Ercea, Brădețel, Cașva, Daia, Daneș, Dubiște, Dulcea, Gura Fâncel, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Iod, Lacul Fărăgău, Laslăul Mare, Lăpușna, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Stânceni-Meștera, Șaeș, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Ilvei, Valea din Mijloc, Valea Secuieu, Valea Sirodului, Vălenii de Mureș, Vulcan
<i>Veronica anagallis-aquatica</i>	între Abuș și Adămuș, între Cerghid și Mica, Chibed, Ciobotani, Jăbenița, Sărățeni, Sighișoara
<i>Veronica arvensis</i>	Band, Ciobotani, Gurghiu, Reghin, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș
<i>Veronica beccabunga</i>	Aluniș, Cornești, Cloașterf, Gurghiu, Ibănești, Lăpușna, Lunca Bradului, M-ții Călimani-Răchitiș, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Sovata, Târgu-Mureș, cursul superior al Târnavei Mici, Valea Bătrâna, Valea Creanga Albă, Valea Secuieu, Valea Sălardului
<i>Veronica chamaedrys</i>	Aluniș, Apold, Band, Băgaciu, Bălăușeri, între Băla și Ercea, între Cerghid și Mica, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Lăpușna, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Stejărenii, Târgu-Mureș, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Veronica officinalis</i>	Aluniș, Bălăușeri, Gurghiu, M-ții Călimani (Valea Ilvei, Valea din Mijloc), M-ții Gurghiului (Lăpușna, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Fâncelului, Găti, Saca, Sălardului, Secuieu, Sirodului), Răstolița, Reghin, Târgu-Mureș
<i>Veronica persica</i>	Băgaciu, Gurghiu, Lunca Bradului, Răstolița, Reghin, Târgu-Mureș
<i>Veronica spicata</i> ssp. <i>orchidea</i>	Archita, Bălăușeri, Band, între Băla și Ercea, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Gurghiu, Herghelia, Mihai Viteazu, Morești, Mureni, Piatra Orșovei, Porumbeni, Saschiz, Săbed,

FLAVONOIDE		Sântana de Mureș, Șarpotoc, Târgu-Mureș, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Veronica teucrium</i>	Band, Băgaciu, între Băla și Ercea, Criș, Fărăgău, Herghelia, Jabenita, Reghin, Saschiz, Târgu-Mureș
	<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bălăușeri, Bistra Mureșului, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Gălăoaia, Herghelia, Lacul Fărăgău, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Saschiz, Săbed, Sălard, Târgu-Mureș, Tirimia, Zau de Câmpie
	<i>Viola tricolor</i>	Adrian, Aluniș, Bahnea, Băgaciu, Bălăușeri, Beica de Jos, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cornești, Criș, Dubiște, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lăpușna, Lunca Bradului, Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sângiorgiu de Pădure, Șarpotoc, Șăulia de Câmpie, Târnăveni, Valea Sirodului, Vișoara
ANTOCIANINE	<i>Centaurea cyanus</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Beica de Sus, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Crăiești, Dubiște, Fântânele, Ghindari, Ibănești, Idrifaia, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Bistrei, Vișoara
	<i>Consolida regalis</i>	Aluniș, Apold, Band, Băgaciu, între Băla și Ercea, Cerghid, Gurghiu, Morești, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sântana de Mureș, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Papaver rhoeas</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Idrifaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara
	<i>Ribes nigrum</i>	Bistra Mureșului, Orșova Pădure, Solovăstru
	<i>Rosa gallica</i>	Aluniș, Band, între Băla și Ercea, Bălăușeri, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Daneș, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Mihai Viteazu, Reghin, Saschiz, Șarpotoc, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Glăjărie, Lunca Bradului, M-ții Călimani (Valea din Mijloc, Țiganca, Valea Bistrei: la limita superioară a pădurilor: Stegii, Cofu, Donca), M-ții Gurghiului (Lăpușna, Saca, Valea Bătrâna, Valea Sălărdului, Secuieu, Sirodului), Răstolița, între Săcădat și Sovata
CUMARINE	<i>Cruciata laevipez</i>	Aluniș, Băgaciu, între Băla și Ercea, Cloașterf, Daia, Daneș, Dulcea, Fărăgău, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Stejărenii, Târgu-Mureș, Tirimia, Zau de Câmpie
	<i>Fraxinus excelsior</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, între Cornești și Crăiești, Dubiște, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, M-ții Gurghiului (văile: Gătii, Lăpușna, Secuieu, Sirod), Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sighișoara, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Ilvei, Vișoara
	<i>Galium aparine</i>	Band, Bălăușeri, Cașva, Cloașterf, între Cornești și Crăiești, Criș, Fărăgău, Gurghiu, Ibănești,

CUMARINE		Lăpușna, Orșova, Păuloaia, Piatra Orșovei, Reghin, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia
	<i>Galium mollugo</i>	Androneasa, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica de Sus, Cașva, între Cerghid și Mica, Ciobotani, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Gălăoaia, Herghelia, Ibănești, Iod, Jabenita, Lunca Bradului-Sălard, Mihai Viteazu, Mureni, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Stejărenii, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Valea Secului, Vulcan
	<i>Galium odoratum</i>	Aluniș, Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, între Cornești și Crăiești, Dubiște, Dulcea, Fărăgău, Fântănele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Idrifaia, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Morești, M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Lăpușna, Secuieu, Sirod), Neagra, Orșova Pădure, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Sălardului, Vișoara
	<i>Galium verum</i>	Abuș, Aluniș, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Borzia, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dulcea, Gălăoaia, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Jabenita, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sovata, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Vălenii de Mureș, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Heracleum sphondylium</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Bălăușeri, Cașva, Călimănești, între Cornești și Crăiești, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântănele, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Mihai Viteazu, Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Șaeș, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Secuieu, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Medicago falcata</i>	Aluniș, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, între Cerghid și Mica, Criș, Daia, Daneș, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița-Iod, între Răzoare și Șăulia, Reghin, Saschiz, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Medicago lupulina</i>	Aluniș, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Daia, Dulcea, Herghelia, Ibănești, Jabenita, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Neagra, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Medicago sativa</i>	Aluniș, Band, Bălăușeri, între Cerghid și Mica, Ibănești, Porumbeni, Reghin, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Melilotus officinalis</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica de Sus, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Daia, Dubiște, Fântănele, Ghindari, Ibănești, Idrifaia, Iod, Jabenita, Lacul Fărăgău, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Orșova, Păuloaia, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Solovăstru, Stejărenii, Șaeș, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vaidacuta, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Pastinaca sativa</i>	Archita, Band, Bălăușeri, Bistra Mureșului, între Cerghid și Mica, Deda, Gălăoaia, Herghelia, Mihai Viteazu, Reghin, Săbed, Sovata

CUMARINE	<i>Pimpinella saxifraga</i>	Adrian, Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bălăușeri, Bezid, Chibed, Cloașterf, Daia, Dulcea, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Jabenita, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Neagra, Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sălard, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Tirimia, Viforoasa, Zau de Câmpie
	<i>Agnomonium eupatoria</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, între Băla și Ercea, Beica, Bezid, Bălăușeri, Cașva, Călimănești, Cerghid, Chendu, Chibed, Cloașterf, Crăiești, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Herepea, Herghelia, Idrifaia, Mica, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Stănceni, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, lângă Viforoasa, Viișoara, Vișa, Vulcan, Zau de Câmpie
TANINURI	<i>Alchemilla xanthochlora</i>	Adrian, Bălăușeri, Beica, Cașva, Dulcea, Gurghiu, Ibănești Pădure, Isticel, Lăpușna, Mihai Viteazu, Păuloaia, Reghin, între Săcădat și Sovata, Valea Sălardului, Valea Secuiei, Valea Sirodului
	<i>Alnus glutinosa</i>	Abuș, Bălăușeri, Bistra Mureșului, Chibed, Deda, Dulcea, Gălăoaia, Glăjărie, Ibănești, Lăpușna, Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Târgu-Mureș, Valea Ilvei, Valea Iodului, Valea Sălardului, Valea Tihului, Zau de Câmpie
	<i>Alnus incana</i>	Androneasa, Dubiște, Dulcea, Ibănești, Iod, Lunca Bradului, M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Brădețel, Creanga Albă, Lăpușna, Secuiei, Sirod), Neagra, Orșova, Răstolița, Valea Ilvei, Valea Sălardului
	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Band, între Băla și Ercea, Beica, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Dubiște, Herepea, Herghelia, Jabenita, Mihai Viteazu, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Castanea sativa</i> (subspont.)	Gurghiu, Herghelia, Săbed
	<i>Cornus mas</i>	Band, Băgaciu, Bălăușeri, Cașva, Cloașterf, Dubiște, Gurghiu, Herghelia, Laslăul Mare, Saschiz, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Bistrei: pădurea Zăpodea Ursului, Blidăreasa, Pleșă, Fundături
	<i>Cornus sanguinea</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Cașva, Călimănești, Cloașterf, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova Pădure, Reghin, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, Valea Pietroasa, Viișoara, Zau de Câmpie
	<i>Corylus avellana</i>	Aluniș, Androneasa, Bahnea, Band, Bezid, Bălăușeri, Bistra Mureșului, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (Lăpușna, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Secuiei), Orșova-cătunul Seci, Răstolița, Saschiz, Săbed, între

TANINURI		Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stânceni-poalele Muntelui Leu, Șăulia de Câmpie, Sighișoara, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Ilvei, Valea Secului, Zau de Câmpie
	<i>Cuscuta europaea</i>	Aluniș, Apold, Band, Cloașterf, Criș, Daneș, Jăbenița, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Șaeș, Solovăstru, Târgu-Mureș
	<i>Epilobium angustifolium</i>	Aluniș, Bahnea, Bălăușeri, Călimănești, Cornești, Crăiești, Fântânele, Gurghiu, Idrifaia, Iod, Lunca Bradului, M-ții Gurghiului (Piatra Orșovei, Saca, Valea Secuieului, Valea Sirodului), Reghin, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea din Mijloc, Valea Sălardului, Valea Tihului, Viișoara
	<i>Epilobium hirsutum</i>	Aluniș, Apold, Bălăușeri, Iod, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Solovăstru, Târgu-Mureș
	<i>Epilobium montanum</i>	Androneasa, Gălăoia, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Lunca Bradului, M-ții Gurghiului (Lăpușna, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Secuieul, Sirodului, Saca), Orșova, Orșova Pădure, Păuloaia, Răstolița, Săbed, Stânceni, Târgu-Mureș, cursul superior al Târnavei Mici, Valea din Mijloc, Valea Sălardului, Valea Tihului
	<i>Epilobium parviflorum</i>	Aluniș, Apold, Ciobotani, Cloașterf, Gurghiu, M-ții Gurghiului (Lăpușna, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Secuieul, Sirod), Orșova Pădure, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Târgu-Mureș, Valea Sălardului
	<i>Erigeron acris</i>	Archita, Band, Bălăușeri, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Daia, Dulcea, Gălăoia, Gurghiu, Herghelia, Jăbenița, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Saschiz, Sovata, Stejărenii, Stânceni, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Vaidacuta, lângă Viforoasa
	<i>Erodium cicutarium</i>	Band, Ciobotani, Lăpușna, Lunca Bradului, Neagra, Porumbeni, Săbed, Stânceni, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Valea Bătrâna
	<i>Fragaria vesca</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica de Sus, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Crăiești, Daia, Dubiște, Fărăgău, Fântânele, Gălăoia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului (văile: Glăjărie, Lăpușna, Saca, Secuieul, Sirod), Mureni, Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Sântana de Mureș, Șaeș, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Sighișoara, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Ilvei, Valea Tihului, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Fragaria viridis</i>	Aluniș, Apold, Archita, Band, între Băla și Ercea, Beica de Sus, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Herghelia, Ibănești, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Saschiz, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Geranium robertianum</i>	Adrian, Aluniș, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica, Bistra Mureșului-Scaunul Domnului, Cloașterf, Dulcea, Gălăoia, Gurghiu, Herghelia, Ibănești Pădure, Iod, Lunca Bradului, M-ții

TANINURI

	Gurghiului (văile: Brădețel, Lăpușna, Saca, Secuieu, Sirod), Neagra, Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Ilvei, Valea Sălărdului, Zau de Câmpie
<i>Geum urbanum</i>	Adrian, Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica de Sus, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Crăiești, Dubiște, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului (Gura Fâncel, văile: Lăpușna, Secuieu, Sirod), Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Viișoara, Zau de Câmpie
<i>Juglans regia</i> (subspont.)	Aluniș, Băgaciu, Bistra Mureșului, Deda, Glăjărie, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Stânceni, Târgu-Mureș
<i>Limonium gmelini</i>	Jabenița, Orșova, Sovata, Târgu-Mureș
<i>Lysimachia nummularia</i>	Abuș, Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Bistra Mureșului, Călimănești, Chibed, Ciobotani, Cloașterf, Comești, Daneș, Deda, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lacul Fărăgău, M-ții Gurghiului (văile: Lăpușna, Secuieu, Sirod), Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sărățeni, Sighișoara, Solovăstru, Sovata, Stânceni, Șaeș, Târgu-Mureș, Târnăveni, Trei Sate, Valea Ilvei, Valea Răchitiș, Valea Sălărdului, Valea Secului, Vălenii de Mureș
<i>Lysimachia punctata</i>	Band, Bălăușeri, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Târgu-Mureș, Valea Sălărdului
<i>Lysimachia vulgaris</i>	Abuș, Albești, Aluniș, Apold, Band, Bălăușeri, Cașva, între Chibed și Sărățeni, Ciobotani, Cloașterf, Deda, Dubiște, Gălăoia, Gurghiu, Jabenița, Lacul Fărăgău, Lunca Bradului-Sălărd, M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Creanga Albă, Secuieu), Mureni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Solovăstru, Stânceni-Meștera, Șaeș, Târgu-Mureș, Valea Tihului
<i>Lythrum salicaria</i>	Adămuș, Abuș, Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, Beica, Cașva, Călimănești, Cerghid, Chibed, Ciobotani, Cloașterf, Comești, Deda, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Ibănești Pădure, Idrifaia, Iod, Jabenița, Lacul Fărăgău, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului (văile: Lăpușna, Secuieu, Sirod), Orșova, Orșova Pădure, Piatra Orșova, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Săcădat, Sărățeni, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Solovăstru, Stejărenii, Stânceni-Meștera, Șaeș, Târgu-Mureș, Târnăveni, Trei Sate, Valea Sălărdului
<i>Polygonum aviculare</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Beica, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Comești, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Glăjărie, Herghelia, Ibănești Pădure, Idrifaia, Jabenița, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stânceni, Târgu-Mureș, Târnăveni, Viișoara
<i>Polygonum bistorta</i>	Bahnea, Bălăușeri, Bistra Mureșului, Ciobotani, Călimănești, Fântânele, Gurghiu, Idrifaia, Lăpușna, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sărățeni, Sighișoara, Stânceni-Meștera, Târgu-

TANINURI		Mureș, Vălenii de Mureș, Vișoara
	<i>Potentilla anserina</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Dulcea, Fântănele, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Lacul Fărăgău, Lasiăul Mare, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Săcădat, Sângiorgiu de Pădure, între Sovata și Sărățeni, Stănceni-Meștera, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Vișoara
	<i>Potentilla arenaria</i>	Aluniș, Apold, Archita, Band, Băgaciu, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Cloașterf, Daia, Gurghiu, Mihai Viteazu, Mureni, între Răzoare și Șăulia, Saschiz, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Potentilla argentea</i>	Aluniș, Band, Băgaciu, între Băla și Ercea, Cloașterf, Dulcea, Herghelia, Jabenita, Lunca Bradului, Meștera, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Stănceni, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Zau de Câmpie
	<i>Potentilla erecta</i>	Aluniș, Androneasa, Apold, Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Ciobotani, Cloașterf, Dubiște, Fântănele, Ghindari, Gurghiu, Ibănești Pădure, Idrifaia, Jabenita, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stănceni-Meștera, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Vălenii de Mureș, Vișoara
	<i>Potentilla recta</i>	Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Herghelia, Ibănești, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița-Viș, Reghin, Saschiz, Săbed, Sântana de Mureș, Stejărenii, Stănceni-Meștera, Șaeș, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Vaidacuta, Valea Sălardului, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Potentilla reptans</i>	Abuș, Band, Băgaciu, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Dulcea, Ghindari, Ibănești, Lacul Fărăgău, Răstolița-Iod, Reghin, Saschiz, Sărățeni, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Sovata, Șaeș, Târgu-Mureș, Tirimia, Trei Sate, Vălenii de Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Prunus spinosa</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica, Bezid, Cașva, Călimănești, între Cerghid și Mica, Chibed, Cloașterf, Cornești, Criș, Daia, Dubiște, Fărăgău, Fântănele, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Idrifaia, Jabenita, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Păuloaia, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Solovăstru, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Sirodului, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Prunus tenella</i>	Aluniș, Band, Bahnea, Cloașterf, Mihai Viteazu, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vaidacuta, Zau de Câmpie
	<i>Quercus petraea</i>	Band, Bălăușeri, Cloașterf, Gălăoaia, Glăjărie, Herghelia, Jabenita, Lunca Bradului, Orșova Pădure, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sighișoara, Șăulia de Câmpie, cursul

TANINURI		superior al Târnavei Mici, Zau de Câmpie
	<i>Quercus robur</i>	Aluniș, Archita, Band, Beica, Cloașterf, Deda, Dubiște, Gurghiu, Herghelia, Laslăul Mare, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Orșova, Orșova-cătunul Seci, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Solovăstru, Sovata, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Zau de Câmpie
	<i>Sanguisorba officinalis</i>	Aluniș, între Băla și Ercea, Mihai Viteazu, Saschiz, Săbed, Sighișoara, Stejărenii, Târgu-Mureș, Vălenii de Mureș
DEPSIDE	<i>Cichorium intybus</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Călimănești, între Cerghid și Mica, Chibed, Cloașterf, Cornești, Crăiești, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Jabenita, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, între Răzoare și Șăulia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sărățeni, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
ULEIURI GRASE	<i>Oenothera biennis</i>	Aluniș, Lunca Bradului, Răstolița, Reghin, Sovata, Saschiz, Târgu-Mureș
ULEIURI VOLATILE	<i>Angelica archangelica</i>	Glăjărie, Lăpușna, Păuloaia, Valea Bătrâna, Valea Sălărdului
	<i>Achillea millefolium</i>	Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Criș, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Lacul Fărăgău, Mihai Viteazu, Mureni, M-ții Gurghiului (Lăpușna, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Gătii, Secuieu), Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Săcădat, Sângiorgiu de Pădure, Sovata, Stejărenii, Stânceni-Meștera, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Sălărdului, Vălenii de Mureș, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Achillea ptarmica</i>	Dubiște, Eremitu pe valea Săcădatului, Gurghiu, Lăpușna, Lunca Bradului, Răstolița
	<i>Achillea setacea</i>	Daneș, Gurghiu, Herghelia, Lunca Bradului, Reghin, Săbed, Stânceni, Tirimia, Zau de Câmpie
	<i>Acorus calamus</i>	Daia, Albești
	<i>Anthemis tinctoria</i>	Androneasa, Band, Bălăușeri, Cloașterf, Deda, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, între Mureni și Archita, Săbed, între Sovata și Vf, Seaca, Stânceni-Meștera, Târgu-Mureș, Valea Bătrână, Zau de Câmpie
	<i>Arnica montana</i>	Răstolița, Valea Sirodului
	<i>Asarum europaeum</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Idrifaia, Herghelia, Lăpușna, Lunca Bradului-Neagra, Orșova, Orșova Pădure, Papiu Ilarian, Răstolița, Saschiz, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Iodului, Valea Secuieu, Vișoara, Zau de Câmpie

ULEIURI VOLATILE

<i>Carum carvi</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica de Jos, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Crăiești, Daia, Daneș, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Isticeu, Laslăul Mare, Livezeni, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova-cătunul Seci, Papiu Ilarian, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Sânpaul, Stejărenii, Șaeș, Șarpacot, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Sălardului, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Iris graminea</i>	Gurghiu, Saschiz, Zau de Câmpie
<i>Iris pseudacorus</i>	Abuș, Aluniș, Apold, Band, între Chibed și Sărăteni, Gurghiu, Lacul Fărăgău, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Șaeș, Sighișoara, Târgu-Mureș, Târnăveni, Trei Sate
<i>Iris sibirica</i>	Band, Gurghiu, Zau de Câmpie
<i>Juniperus communis</i>	Bezid, Chibed, Gurghiu, M-ții Gurghiului, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Valea Sălardului
<i>Matricaria recutita</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Dubiște, Fântânele, Ghindari, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Jabenita, Laslăul Mare, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stănceni, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara
<i>Melissa officinalis</i>	Orșova, Reghin, Târgu-Mureș, Valea Bistrei prin tufărișurile: Coastei, Pleșa și pădurile: Zăpodea Ursului și Blidăreasa
<i>Mentha aquatica</i>	Abuș, Adămuș, Apold, Archita, Band, Bezid, între Brădețel și Lăpușna, între Călimănești și Sângiorgiu de Pădure, între Cerghid și Mica, Chibed, Cornești, Gălăoaia, Gura Fâncel, Gurghiu, Lacul Fărăgău, Răstolița, Saschiz, Săbed, Sărăteni, Sighișoara, Stănceni-Meștera, Șaeș, Târgu-Mureș-Beșa, Târnăveni, Trei Sate, Vișoara, Valea Sălardului
<i>Mentha arvensis</i>	Archita, Bălăușeri, Ciobotani, Daia, Dubiște, Dulcea, Ibănești, Iod, Lacul Fărăgău, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, M-ții Călimani (văile: Ilvei, Răchitiș, Tihului), Răstolița, Saschiz, Sălard, Sighișoara, Sovata, Șarpacot, Târgu-Mureș
<i>Mentha longifolia</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Bistra Mureșului, Călimănești, între Cerghid și Mica, Chibed, Cloașterf, Daia, Daneș, Deda, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Idrifaia, Iod, Laslăul Mare, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului (văile: Lăpușna, Pietroasa, Secuieu, Sirod), Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Stejărenii, Șaeș, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Ilvei, Valea Sălardului, Valea Secului, Valea Tihului, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Mentha pulegium</i>	Albești, Bălăușeri, Reghin, Sighișoara, Târgu-Mureș
<i>Mentha suaveolens</i>	Bălăușeri, Cașva, Daia, Daneș, Gurghiu, Jabenita, Lăpușna, Reghin, Sighișoara, Șaeș

ULEIURI VOLATILE

<i>Mentha verticillata</i>	Bahnea, Bistra Mureșului, Ciobotani, Saschiz
<i>Nasturtium officinale</i>	Reghin, Solovăstru
<i>Nepeta nuda</i>	Archita, Cloașterf, Daneș, Herghelia, Lechința de Mureș, Mureni, Reghin, Saschiz, Săbed, Solovăstru, Târgu-Mureș, versanții înșoriți de pe valea Târnavei Mici, Valea Sălardului, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Origanum vulgare</i>	Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Ciobotani, Cornești, Daia, Dubiște, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Idrifaia, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Reghin, Saschiz, Săbed, Sălard, între Sovata și Săcădat, Stejărenii, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara, valea pâraielor: Sovata, Sebiș, Valea Bătrână, Valea Secuieu, Valea Sirodului, Vișa, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Petasites hybridus</i>	Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Ibănești, Idrifaia, Iod, M-ții Călimani (văile: Ilvei, Răchitiș, Secului, Tihului), M-ții Gurghiuului (văile: Bătrâna, Lăpușna, Sălard, Secuieu, Sirod), Orșova, Orșova Pădure, Răstolița, Reghin, între Săcădat și Sovata, Sălard, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Vișoara
<i>Peucedanum officinale</i>	Boiu Mare, Reghin, Sighișoara
<i>Peucedanum oreoselinum</i>	Archita, Criș, Cloașterf, Jabeșița, Mihai Viteazu, Mureni, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Șaeș, Târgu-Mureș
<i>Pimpinella saxifraga</i>	Adrian, Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Chibed, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dulcea, Fărăgău, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Jabeșița, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sălard, Sângiorgiu de Pădure, Sovata, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Tirimia, Târgu-Mureș, Viforoasa, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Pinus sylvestris</i>	Acățari, Band, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Fântânele, Ghindari, Orșova, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stănceni-Muntele Leu, Târgu-Mureș
<i>Pinus nigra</i>	Săbed
<i>Telekia speciosa</i>	Borzia, Dubiște, Gălăoaia, Ibănești, Iod, M-ții Gurghiuului (văile: Bătrâna, Gătii, Lăpușna, Secuieu, Sirod), Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sighișoara, cursul superior al Târnavei Mici, văile: Ilvei, Răchitiș, Sălardului, Secului, Tihului
<i>Thymus x dacicus</i>	Gurghiu, Răstolița, Reghin, Valea pâraului Sebeș
<i>Thymus glabrescens</i>	Apold, Archita, Band, Băgaci, Bistra Mureșului, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Daia, Dulcea, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, între Răzoare și Șăulia, Saschiz, valea pâraului Sebeș, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, lângă Viforoasa, Vulcan, Zau de Câmpie

ULEIURI VOLATILE	<i>Thymus pannonicus</i>	Adrian, Archita, între Băla și Ercea, Band, Fărăgău, Herghelia, Mihai Viteazu, Mureni, Saschiz, Săbed, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Thymus pulegioides</i>	Aluniș, Apold, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dulcea, Herghelia, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șaeș, văile Sovata și Sebeș, Sovata, Stejărenii, Șaeș, Șarpacoc, Târgu-Mureș, Valea Sălărdului
	<i>Thymus serpyllum</i>	Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Fântânele, Ghindari, Idrifaia, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Viișoara
	<i>Tilia cordata</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Idrifaia, Lăpușna, Lunca Bradului, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Tirimia, Viișoara, Zau de Câmpie
	<i>Tilia plathyphyllos</i>	Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Fântânele, Ghindari, Herghelia, Idrifaia, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Saschiz, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Viișoara
	<i>Tilia tomentosa</i> (cultivat)	Târgu-Mureș
	<i>Valeriana officinalis</i>	Albești, Aluniș, Androneasa, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Chibed, Ciobotani, Cloașterf, Deda, Dubiște, Dulcea, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Lunca Bradului, Meștera, M-ții Gurghiului (văile: Lăpușna, Secuieu, Sirod), Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sălărd, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Solovăstru, Stănceni, Șaeș, Târgu-Mureș, Vișa, Zau de Câmpie
	<i>Valeriana sambucifolia</i>	M-ții Gurghiului pe Buneasa, Lăpușna, Lunca Bradului-Neagra, Răstolița, cursul superior al Târnavei Mici, Valea Sălărdului
	<i>Xanthium spinosum</i>	Band, Bălăușeri, Porumbeni, Reghin, Săbed, Zau de Câmpie
ALANTOINĂ	<i>Xanthium strumarium</i>	Aluniș, Bălăușeri, Gălăoaia, Jabenita, Lacul Fărăgău, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș
	<i>Symphytum officinale</i>	Abuș, Adămuș, Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Beica de Jos, Bezid, Bistra Mureșului, Cașva, Călimănești, Cerghid, Chibed, Ciobotani, Cloașterf, Cornești, Coroișânmartin, Crăiești, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Lacul Fărăgău, Laslăul Mare, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (Valea Bătrână, Valea Creanga Albă, Lăpușna, Secuieu), Mihai Viteazu, Păuloaia, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sălărd, Sângiorgiu de Pădure, Sighișoara, Șaeș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Trei Sate, Viișoara
RĂȘINI	<i>Humulus lupulus</i>	Abuș, Adămuș, Aluniș, Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești,

RĂȘINI	<i>Humulus lupulus</i>	Coroianmărtin, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sărățeni, Sighișoara, Sângiorgiu de Pădure, Solovăstru, Târgu-Mureș, Târnăveni, Trei Sate, Vișoara
GLICOREZINE	<i>Calystegia sepium</i>	Abuș, Aluniș, Band, Bălăușeri, Cașva, Cloașterf, Deda, Dubiște, Gălăoaia, Gurghiu, Herghelia, Ibănești Pădure, Iod, Jabenita, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Lunca Bradului, Orșova Pădure, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sălard, Sighișoara, Sîngiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Pietroasa
	<i>Convolvulus arvensis</i>	Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bahnea, Band, Băgaci, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica, Bezid, Bistra Mureșului, Brădețel, Cașva, Călimănești, între Cerghid și Mica, Chibed, Cloașterf, între Comești și Crăiești, Daia, Daneș, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Herepea, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Jabenita, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Mihai Viteazu, Orșova, Răstolița, între Răzoare și Șăulia, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sălard, Sângiorgiu de Pădure, Sântana de Mureș, Stejărenii, Șaeș, Șarpotoc, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
COMPUȘI SULFURAȚI	<i>Allium ursinum</i>	Băgaci, Glăjărie, Gurghiu, Orșova, Orșova Pădure, Răstolița pârâul Porcului și pârâul Vișă, Seleuș, Sovata, Șăulia de Câmpie
	<i>Alliaria petiolata</i>	Aluniș, Band, Băgaci, Bălăușeri, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Lăpușna, M-ții Gurghiului, Orșova, Răstolița, Reghin, Săbed, Sovata, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Zau de Câmpie
	<i>Armoracia rusticana</i>	Aluniș, Band, Filitelnic, Ibănești, Răstolița
IRIDOIDE	<i>Ajuga genevensis</i>	Aluniș, Band, Băgaci, Bălăușeri, între Băla și Ercea, între Cerghid și Mica, Dulcea, Fărăgău, Herghelia, Ibănești, Lăpușna, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Stânceni, Târgu-Mureș, Vălenii de Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Ajuga reptans</i>	Aluniș, Archita, Băgaci, Band, Bălăușeri, Beica de Sus, Bistra Mureșului, Cloașterf, Dulcea, Fărăgău, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Lăpușna, Secuieu, Sirod), Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Șăulia de Câmpie, Sighișoara, Târgu-Mureș, Tirimia, Zau de Câmpie, Valea Ilvei, Valea Sălardului
	<i>Euphrasia rostkoviana</i>	Adrian, Aluniș, Androneasa, Apold, Bălăușeri, Beica de Sus, Gălăoaia, Gurghiu, Ibănești, Iod, Mihai Viteazu, Păuloaia, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sovata, Stejărenii, Stânceni-Meștera, Șaeș, Șarpotoc, cursul superior al Târnavei Mici, Valea Ilvei
	<i>Euphrasia stricta</i>	Archita, Bălăușeri, Cloașterf, Daia, Herghelia, Ibănești, Mihai Viteazu, Păuloaia, Târgu-Mureș, Valea Ilvei, Valea Sălardului, Vulcan
	<i>Lamium album</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaci, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Comești, Dubiște, Dulcea, Fărăgău-lac, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Herghelia, Ibănești, Ibănești

IRIDOIDE		Pădure, Idrifaia, Lăslăul Mare, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stânceni, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara, Zau de Câmpie
	<i>Mycelis muralis</i>	Bălăușeri, Gurghiu, Dubiște, Gălăoia, Herghelia, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Călimani (văile: Ilvei, din Mijloc, Tihului), M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Creanga Albă, Gătii, Lăpușna, Saca, Sălard, Secuieu, Sirod), Răstolița, Sighișoara
	<i>Sambucus ebulus</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cornești, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herepea, Idrifaia, Lacul Fărăgău, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Valea Bătrâna, Vișoara, Zau de Câmpie
	<i>Scrophularia nodosa</i>	Band, Cloașterf, Dubiște, Gurghiu, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (văile: Glăjărie, Lăpușna, Saca, Secuieu), Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
	<i>Scrophularia scopoli</i>	Band, Beica de Sus, Răstolița, Zau de Câmpie
	<i>Stachys germanica</i>	Adrian, Apold, Archita, Band, Băgaci, între Băla și Ercea, Bălăușeri, Beica, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Daia, Daneș, Herghelia, Mihai Viteazu, Mureni, Saschiz, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vulcan
	<i>Stachys officinalis</i>	Aluniș, Apold, Archita, Bălăușeri, Cașva, Chibed, Cloașterf, Daia, Daneș, Gurghiu, Herghelia, Jăbenița, Lăpușna, Mihai Viteazu, Mureni, Piatra Orșova, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, cursul superior și mijlociu al Târnavi Mici, Valea Pietroasa, Vălenii de Mureș, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Stachys recta</i>	Aluniș, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Herghelia, Mihai Viteazu, Mureni, Reghin, Saschiz, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, lângă Viforoasa, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Verbena officinalis</i>	Bălăușeri, Cașva, Daia, Herghelia, Jăbenița, Lăslăul Mare, Mihai Viteazu, Răstolița, Reghin, Săbed, Târgu-Mureș
ALCALOIZI	<i>Aconitum firmum</i>	Sălard-valea Mureșului, Valea Ilvei, Valea Sălardului
	<i>Aconitum moldavicum</i>	Bahnea, Deda, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (Fâncelul de Sus, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Gătii, Lăpușna, Sălardului, Secuieu, Sirod), Răstolița, Sovata, Vârful Seaca Mică
	<i>Aconitum napellus</i>	M-ții Gurghiului (văile: Lăpușna, Secuieu, Sirod)
	<i>Aristolochia clematitis</i>	Bălăușeri, M-ții Gurghiului (Valea Creanga Albă, Valea Meșterita), Reghin, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Valea Izvoarelor, Vidrasău
	<i>Arum maculatum</i>	Glăjărie, Gurghiu, Valea Sălardului

ALCALOIZI

<i>Atropa bella-donna</i>	Bechechi (pâraieie Ruginei, Botoș, Sec, Bezid), Deda (Poiana Ursului, Poiana Rusului), M-ții Gurghiului (Valea Glăjărie, Saca), Orșova Pădure, Piatra Orșova, Răstolița, Sovata, Târgu-Mureș, valea superioară a Târnavei Mici, Vișoara, Valea Sălardului
<i>Berberis vulgaris</i>	Band, Reghin, Șăulia de Câmpie
<i>Chamaespartium sagittale</i>	Bahnea, Band, Băgaci, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Fântânele, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Idrifaia, Lăpușna, Mihai Viteazu, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Vișoara
<i>Chelidonium majus</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaci, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cînta, Cloașterf, Cornești, Crăiești, Dulcea, Fântânele, Gălăoia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești Pădure, Idrifaia, Leordeni, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului, Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vișoara
<i>Clematis recta</i>	Daia, Gurghiu, Herepea, Mihai Viteazu, Reghin, Săbed, Târgu-Mureș
<i>Clematis vitalba</i>	Aluniș, Apold, Band, Bălăușeri, Bistra Mureșului, Cașva, Cloașterf, Criș, Dubiște, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Iod, Mihai Viteazu, Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sâncrai, Sântana de Mureș, Sighișoara, Târgu-Mureș, Tirimia, Zau de Câmpie
<i>Colchicum autumnale</i>	Aluniș, Archita, Bahnea, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Bezid, Borzia, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dămieni, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Ibănești, Idrifaia, Lăpușna, Mihai Viteazu, Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Stânceni-Meștera, Târgu-Mureș, Valea Pietroasa, Vișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Conium maculatum</i>	Aluniș, Band, Ciobotani, Cașva, Cloașterf, Gurghiu, Lacul Fărăgău, Reghin, Saschiz, Șaeș, Târgu-Mureș
<i>Corydalis cava</i>	Ibănești, Lăpușna, Orșova Pădure, Răstolița, Reghin, Sovata, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș
<i>Corydalis solida</i>	Band, Băgaci, Bălăușeri, Gura Fâncel, Herghelia, Lăpușna, Răstolița, Săbed, Sântana de Mureș, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Tirimia, Valea Grapini, Zau de Câmpie
<i>Cynoglossum officinale</i>	Band, Târgu-Mureș, Valea Bistrei: fânațele Minteu, După Bistra
<i>Datura stramonium</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Bălăușeri, Călimănești, între Cornești și Crăiești, Fântânele, Idrifaia, Reghin, Saschiz, Săbed, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara
<i>Echinops sphaerocephalus</i>	Apold, Archita, Cașva, Cloașterf, Daia, Mihai Viteazu, M-ții Călimani (Valea Bistrei, Zăpodea Ursului), Mureni, Reghin, Vulcan
<i>Echium vulgare</i>	Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bahnea, Band, Băgaci, Bălăușeri, între Băla și Ercea,

ALCALOIZI

	Bezid, Bistra Mureșului-Scaunul Domnului, Cașva, Călimănești, Chibed, Ciobotani, Cloașterf, între Cornești și Crăiești, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Idrifaia, Jabeșița, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Morești, Mureni, Păuloaia, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stejărenii, Stânceni, Șaeș, Șarpatoș, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vaidacuta, Valea Secuiei, Vișoara, Vișa, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Fumaria officinalis</i>	Herghelia, Reghin, Saschiz, Săbed, Șăulia de Câmpie
<i>Fumaria schleicheri</i>	Band, Băgaci, Bălăușeri, Șăulia de Câmpie
<i>Fumaria vaillantii</i>	Răstolița, Săbed, Sovata, Târgu-Mureș
<i>Galanthus nivalis</i>	Androneasa, Band, Băgaci, Bălăușeri, Brădețel, Gura Fâncel, Herghelia, Ibănești, Laslăul Mare, Lăpușna, Orșova, Orșova Pădure, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Zau de Câmpie
<i>Galega officinalis</i>	Bălăușeri, Mihai Viteazu, Saschiz, Târgu-Mureș
<i>Genista tinctoria</i>	Adrian, Androneasa, Apold, Archita, Bălăușeri, Beica, Cloașterf, Criș, Daneș, Gurghiu, Herghelia, Jabeșița, Lăpușna, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova Pădure, Păuloaia, Reghin, Saschiz, Săbed, Sălărd, Șaeș, Șarpatoș, Târgu-Mureș, cursul superior al Târnavii Mici, Valea Pietroasa, Vălenii de Mureș, Zau de Câmpie
<i>Hyoscyamus niger</i>	Band, Bălăușeri, Reghin, Saschiz, Târgu-Mureș
<i>Leucojum vernum</i>	Androneasa, Dubiște, Gurghiu, Ibănești Pădure, Lăpușna, Reghin, Sovata, Sirod
<i>Scopolia carniolica</i>	Borzia, Deda, Gurghiu, Iod, Lăpușna, Lunca Bradului, Răstolița, Tirimia, Valea Sălărdului
<i>Senecio jacobaea</i>	Apold, Archita, Band, Bălăușeri, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Gurghiu, Jabeșița, Mihai Viteazu, Mureni, Reghin, Saschiz, Șaeș, Șarpatoș, Târgu-Mureș, Valea Tihului, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Senecio vulgaris</i>	Band, Bălăușeri, Lăpușna, Răstolița, Reghin, Târgu-Mureș
<i>Solanum dulcamara</i>	Abuș, Adămuș, Apold, Band, Bălăușeri, Dubiște, Gălăoaia, Herghelia, Ibănești, Lacul Fărăgău, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Creanga Albă, Lăpușna, Sălărdului, Secuiei, Sirod), Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Sighișoara, Solovăstru, Șaeș, Târgu-Mureș
<i>Thalictrum aquilegifolium</i>	Band, Băgaci, Cloașterf, Criș, Lacul Fărăgău, Gurghiu, Herghelia, Mihai Viteazu, M-ții Călimani (văile: Ilvei, Secului, Tihului), M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Lăpușna, Sălărdului, Secuiei, Sirod), Mureni, Reghin, Saschiz, Sighișoara, Târgu-Mureș, cursul superior al Târnavii Mici, Zau de Câmpie
<i>Thalictrum minus</i>	Apold, Archita, Ciobotani, Cloașterf, Herepea, Mihai Viteazu, Mureni, Piatra Orșova, Saschiz,

ALCALOIZI		Săbed, Stejărenii, Șaeș, Tirimia, Vaidacuta, Zau de Câmpie
	<i>Veratrum album</i>	Cașva, Ciobotani, culmea Becheci, Bistra Mureșului, Bistra Mureșului-Scaunul Domnului, Deda, Dulcea, Gălăoaia, Glăjărie, Gurghiu, Lunca Bradului, M-ții Gurghiului (Saca, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Lăpușna, Sălardului, Secuieu, Sirod), Orșova, Valea Nirajului Mare, Poiana Brădețel, între Niraje-Poiana Avașu, între Eremitu și Săcădat, Răstolița, Reghin, între Săcădat și Sovata, Sighișoara
	<i>Vinca herbacea</i>	Band, Daia, Porumbeni, Reghin, Săbed, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Zau de Câmpie
	<i>Vinca minor</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Băgaciu, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Idrifaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Valea Sălardului, Vișoara
	<i>Viscum album</i>	Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Idrifaia, Jabenita, Mihai Viteazu, Orșova, Saschiz, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Vișoara
PRINCIPII AMARE	<i>Ballota nigra</i>	Aluniș, Band, Bălăușeri, Curteni, Dubiște, Gălăoaia, Târgu-Mureș
	<i>Centaurium erythraea</i>	Aluniș, Archita, Band, Bălăușeri, Cloașterf, Crăiești, Daia, Daneș, Deda, Dubiște, Glăjărie, Herghelia, Mihai Viteazu, Orșova, Piatra Orșova, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șarpacot, Târgu-Mureș, Vulcan
	<i>Gentiana asclepiadea</i>	Bezid, Chibed, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (Saca, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Gâtii, Lăpușna, Secuieu), Piatra Orșova, Răstolița, Reghin, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Valea Sălardului
	<i>Gentiana cruciata</i>	Aluniș, Archita, Apold, Beica de Sus, Cloașterf, Daia, Daneș, Mihai Viteazu, Mureni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sovata, Valea Sălardului, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Glechoma hederacea</i>	Aluniș, Band, Beica de Sus, Cloașterf, Dubiște, Dulcea, Gurghiu, Herghelia, Ibănești Pădure, Lunca Bradului-Neagra, M-ții Gurghiului (văile: Bătrână, Creanga Albă, Lăpușna, Secuieu, Sirod), Orșova, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, cursul mijlociu al Târnavei Mici, Valea Ilvei, Valea Sălardului
	<i>Glechoma hirsuta</i>	Band, Bălăușeri, Dubiște, Herghelia, Lăpușna, M-ții Gurghiului (văile: Bătrâna, Creanga Albă, Secuieu, Sirod), Orșova Pădure, Piatra Orșova, Răstolița, Saschiz, Zau de Câmpie
	<i>Marrubium vulgare</i>	Bălăușeri, Cornești, Târnăveni, M-ții Călimani: Valea Bistrei
	<i>Menyanthes trifoliata</i>	M-ții Călimani: Valea Tihului

PRINCIPII AMARE	<i>Taraxacum officinale</i>	Aluniș, Archita, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Borzia, Călimănești, Chibed, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Cornești, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Jabenita, Laslăul Mare, Mihai Viteazu, Orșova, Răstolița, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Vălenii de Mureș, lângă Viforoasa, Vișoara, Zau de Câmpie
PRINCIPII AMAR – AROMATICE	<i>Artemisia absinthium</i>	Aluniș, Archita, Band, Băgaci, Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cornești, Crăiești, Daia, Dulcea, Fântânele, Ghindari, Gurghiu, Hodac, Ibănești, Idrifaia, Iod, Lunca Bradului, Reghin, Saschiz, Săbed, Sângiorgiu de Pădure, Stânceni-Meștera, Târnăveni, Vișoara, Zau de Câmpie
	<i>Artemisia campestris</i>	Cloașterf, Daia, Herghelia, Mihai Viteazu, între Răzoare și Șăulia, Saschiz, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, Zau de Câmpie
	<i>Artemisia pontica</i>	Daia, Mihai Viteazu, Saschiz, Tirimia, Vaidacuta
	<i>Artemisia vulgaris</i>	Aluniș, Apold, Bahnea, Band, Bălăușeri, Bezid, Cașva, Călimănești, Chibed, Cornești, Crăiești, Dubiște, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Ibănești, Idrifaia, Iod, Lacul Fărăgău, Lăpușna, Lunca Bradului, Porumbeni, Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Solovăstru, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vișoara
	<i>Teucrium chamaedrys</i>	Aluniș, Androneasa, Apold, Archita, Bălăușeri, între Băla și Ercea, între Cerghid și Mica, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Porumbeni, Reghin, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
	<i>Tanacetum corymbosum</i>	Archita, Cașva, Cloașterf, Gurghiu, Ibănești, Lăpușna, Mihai Viteazu, Păuloaia, Răstolița, Reghin, Saschiz, Sovata, Stânceni, Târgu-Mureș, cursul superior al Târnavii Mici, Valea Sălardului, Zau de Câmpie
	<i>Tanacetum vulgare</i>	Aluniș, Apold, Band, Bălăușeri, Cașva, Dubiște, Gănești, Ibănești Pădure, Iod, Lacul Fărăgău, Mica, Orșova, Păuloaia, Răstolița, Reghin, M-ții Călimani (Valea din Mijloc), M-ții Gurghiului (Valea Bătrâna, Valea Secuieu), Târgu-Mureș
FLOROGLUCINE	<i>Dryopteris filix-mas</i>	Aluniș, Androneasa, Bahnea, Băgaci, Bălăușeri, Călimănești, Ciobotani, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Jabenita, Lăpușna, M-ții Călimani (Valea Ilvei, Valea Răchitiș), Neagra, Orșova, Orșova-cătunul Seci, Răstolița, Saca, Săbed, Stânceni-Muntele Leu, Târgu-Mureș, Valea Izvoarelor, Vișoara
ACIZI ORGANICI, VITAMINE ȘI PROVITAMINE	<i>Daucus carota</i>	Adrian, Aluniș, Apold, Archita, Band, Bălăușeri, între Băla și Ercea, Beica, Cașva, între Cerghid și Mica, Ciobotani, Cloașterf, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Dulcea, Gălăoaia, Gurghiu, Herghelia, Ibănești Pădure, Jabenita, Laslăul Mare, Mihai Viteazu, între Mureni și Archita, Păuloaia,

**ACIZI ORGANICI,
VITAMINE ȘI
PROVITAMINE**

	Răstolița, Reghin, Saschiz, Săbed, Stejărenii, Șaeș, Șarpatoc, Târgu-Mureș, Tirimia, Vaidacuta, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Bălăușeri, Herghelia, Mihai Viteazu, Orșova Pădure, Răstolița, Săbed
<i>Physalis alkekengi</i>	Aluniș, Bahnea, Band, Dubiște, Herghelia, Răstolița, Reghin, Săbed, Sântana de Mureș, Târgu-Mureș, Viișoara
<i>Rosa canina</i>	Adămuș, Aluniș, Apold, Archita, Bahnea, Band, Bezid, Bălăușeri, Bistra Mureșului, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Criș, Daia, Daneș, Dubiște, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herepea, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Jabenita, Lunca Bradului, Mihai Viteazu, Mureni, Orșova, Păuloaia, Piatra Orșova, Reghin, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șarpatoc, Șăulia de Câmpie, Sighișoara, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Vaidacuta, Vălenii de Mureș, Viișoara, Vulcan, Zau de Câmpie
<i>Rosa pendulina</i>	M-ții Călimani (Lunca Bradului, Neagra, Răstolița, Stânceni), M-ții Gurghiului (Lăpușna, între Deda și Bistra Mureșului, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Fâncelului, Sălardului, Secuieu, Sirodului), Orșova Pădure
<i>Rubus idaeus</i>	Apold, Archita, Bahnea, Bălăușeri, Bezid, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Daia, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Ibănești, Iod, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, M-ții Călimani (văile: Ilvei, din Mijloc, Răchitiș, Răstoliței, Tihului), M-ții Gurghiului (Saca, văile: Bătrâna, Lăpușna, Sălardului, Secuieu, Sirod), Răstolița, Reghin, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Stânceni, Târnăveni, Viișoara
<i>Sorbus aucuparia</i>	Dubiște, Gălăoaia, Gurghiu, Iod, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, M-ții Gurghiului (Saca, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Glăjărie, Lăpușna, Secuieu, Sirod), Răstolița, Reghin, Saschiz, între Săcădat și Sovata, Târgu-Mureș, Valea Ilvei, Valea Sălardului
<i>Urtica dioica</i>	Adrian, Aluniș, Bahnea, Band, Beica, Bezid, Bălăușeri, Cașva, Călimănești, Chibed, Cloașterf, Cornești, Daia, Dubiște, Dulcea, Fântânele, Gălăoaia, Ghindari, Glăjărie, Gurghiu, Herghelia, Ibănești, Idrifaia, Iod, Lunca Bradului-Neagra, Mihai Viteazu, M-ții Călimani (văile: Ilvei, Secului, Tihului), M-ții Gurghiului (Saca, văile: Bătrâna, Creanga Albă, Gâtii, Lăpușna, Meșterița, Secuieu, Sirod), Orșova, Păuloaia, Răstolița, Saschiz, Săbed, între Săcădat și Sovata, Sângiorgiu de Pădure, Șăulia de Câmpie, Târgu-Mureș, Târnăveni, Tirimia, Viișoara, Zau de Câmpie

CONCLUZII

În cursul cercetărilor efectuate în județul Mureș au fost identificate 304 specii de plante medicinale, frecvente în numeroase localități.

Cele mai răspândite plante medicinale sunt: *Achillea millefolium*, *Agrimonia eupatoria*, *Arctium lappa*, *Carum carvi*, *Colchicum autumnale*, *Crataegus monogyna*, *Filipendula ulmaria*, *Frangula alnus*, *Fraxinus excelsior*, *Galium* sp., *Helleborus purpurascens*, *Hypericum perforatum*, *Plantago* sp., *Primula veris*, *Rosa canina*, *Tussilago farfara*, *Salix* sp., *Veronica* sp.

Există pete albe pe harta județului Mureș, în care nu s-au efectuat până în prezent cercetări floristice, așa cum este zona de câmpie (Iernut, Luduș, Râciu, Sărmaș etc.).

Valorificarea plantelor medicinale din unele zone ale județului Mureș este deficitară din lipsa căilor de acces pentru vehicule precum și din lipsa centrelor de recoltare a plantelor medicinale.

BIBLIOGRAFIE

1. BAUMGARTEN J.C.G - *Enumeratio stirpium Magno Transsilvaniae Principatui*, 1-3 (4), Vindobonae, Libraria Comesinae, 1816.
2. BORZA AL - *Botanic excursion through „The Câmpia”*. Guide de la sixieme excursion phytogeographique internationale. Roumaine, Institutul de Literatură și Tipografie „Minerva” S.A. Cluj, 1931.
3. BORZA AL - *Câmpia Ardealului. Studiu geobotanic*, Tipografia cărților bisericești, București, 1936.
4. BORZA AL - *Vegetația și flora Ardealului, Schiță geobotanică*, Atelierele grafice „Cultura Națională”, București, 1929.
5. CHIRIȚĂ C.D - *Solurile României*, Ed.Agro-Silvică, București, 1967.
6. CIULEI I, GRIGORESCU E, STANESCU U - *Plante medicinale, Fitochimie și fitoterapie*, vol. 1-2, Ed. Medicală București, 1993.
7. CSEDŐ C. (red.) - *Plantele medicinale și condimentare din județul Harghita*, UCCOOP, Miercurea Ciuc, 1980.
8. CSÜRÖS ȘT, CSÜRÖS-KAPTALAN M - *Caracterizarea unor asociații de plante din Transilvania*, Contrib. Bot. Cluj-Napoca, 1966.
9. CSÜRÖS-KAPTALAN M - *Studiul actual al cercetărilor fitocenologice din Transilvania*, Contrib. Bot., 1970, Cluj-Napoca.
10. ESIANU S, CSEDŐ C - *Curs de farmacognozie*, vol. 1-2, Litografia U.M.F. Tg-Mureș, 1999.
11. Flora României, vol. I-XIII, Ed. Acad., București, 1952-1969.
12. FUSS M - *Flora Transsilvaniae Excursoria*, Sibiu, 1866.
13. HALTRICH I - *Contribuții la cunoașterea florei din Valea Sălardului (Munții Ghiurghiului)*, Studii și Comunicări, 1982, 2:205-218.
14. ISTUDOR V - *Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie*, vol. 1-2, Ed. Medicală București, 1998, 2001.
15. KACSO A - *Plantele medicinale și aromatice din Valea Târnavei Mici*, Teza de doctorat U.M.F. - Târgu-Mureș, 1978.
16. OROIAN S - *Aspecte din flora și vegetația pădurii Săbed (jud.Mureș)*, Ocrot.nat.și med.inconj., București, 1991, 35, (1-2): 35-41.
17. OROIAN S - *Cercetări fitotaxonomice pe dealul Corhan Săbed, jud.Mureș și posibilitățile de valorificare a florei*, Marisia XI-XII, Tg-Mureș, 1983, (1): 47-74.
18. OROIAN S - *Conspectul plantelor medicinale spontane din zona de câmpie a județului Mureș*, Marisia XXVI, Tg-Mureș, 2000, 15-25.
19. OROIAN S - *Flora și Vegetația Defileului Mureșului între Toplița și Deda*, Casa de Editură Mureș, 1998.
20. OROIAN S - *Flora Târgu-Mureșului oglindită în colecția botanică Nagy Ödön*, Marisia XXIII-XXIV, Târgu-Mureș, 1995: 197-234.
21. OROIAN S - *Plantele medicinale spontane din Valea Târnavei Mici*, Note Botanice XXVII, U.M.F. - Tg-Mureș, 2001: 59-69.

22. OROIAN S, CHEȘA C – *Flora și vegetația pădurii din preajma Centrului de Sănătate de Medicină Preventivă Mureș-Herghelia*, Note Botanice XXVIII, Târgu-Mureș, 2002, 65-76.
23. OROIAN S, GIURGIU M – *Plantele medicinale spontane din Valea Nirajului*, Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști Iași, 2003, (2), supl. 1. 124-130.
24. OROIAN S, OROIAN F - *The medicinal plants of spontaneous flora in Săbed village (Mureș county)*, Analele Universității Ovidius, seria Științe Medicale-Farmacie, Constanța, 2003, 1 (2):78-83.
25. OROIAN S, SĂMĂRGIȚAN M – *Dry grasslands of the Corhan Hill-Săbed village (Mureș County)*, Nature Conservation, Concepts and Practice, Ed. Springer, 2006:181-195.
26. OROIAN S, SĂMĂRGIȚAN M - *Flora din Poiana Narciselor-Gurghiu, jud. Mureș*, Marisia XXV, Tg-Mureș, 1997, (3): 319-336.
27. OROIAN S, ȘTEFĂNESCU D, SĂMĂRGIȚAN M – *Ariile protejate din județul Mureș*, Ed. University Press Târgu-Mureș, 2005.
28. PITEA E.D – *Cercetări fitotaxonomice și fitocenologice din jurul localității Band, județul Mureș, cu posibilități de valorificare economică a florei spontane*, Marisia XXIII-XXIV, Târgu-Mureș, 1995: 107-196.
29. RÁCZ G, LAZA A, COICIU A - *Plante medicinale și aromatice*, Ed. Ceres, București, 1970.
30. RÁCZ G, VOIK W - *Flora Reghinului în literatura botanică din secolul XIX*, St. și Com.Soc. de Șt.Biologice din R.S.R. Filiala Reghin, 1982.
31. Roșu AI - *Geografia fizică a României*, Ed.Didactică și Pedagogică, București, 1980.
32. SĂMĂRGIȚAN M – *Flora și vegetația Văii Gurghiuului*, University Press, Tg-Mureș, 2005.
33. SĂMĂRGIȚAN M, OROIAN S – *Caracterizarea generală a florei din rezervația botanică Zau de Câmpie - jud. Mureș*, Marisia XXV, Târgu-Mureș, 1997: 249-278.
34. SĂMĂRGIȚAN M, OROIAN S – *Inventarierea plantelor medicinale din Valea Gurghiuului*, Note Botanice XXV, U.M.F.-Târgu-Mureș, 1999:43-60.
35. SOÓ R - *Podromus Florae Terrae Siculorum*, Cluj, 1940.
36. ȘUTEU ȘT – *Vegetația xerofilă de pe pantele din dreapta Văii Vaidacutei*, Contrib.Bot., Cluj-Napoca, 1975, 95-104.
37. ȘUTEU ȘT – *Cercetări de vegetație pe coasta Alunașului (Tirimia – jud. Mureș)*; Contrib.Bot., Cluj-Napoca, 1979, 143-154.
38. ȘUTEU ȘT - *Stejereto-cărpinetele din împrejurimile localității Tirimia (jud. Mureș)*, Contrib.Bot., Cluj-Napoca, 1983, 111-115.
39. TUTIN T.G - *Flora Europaea*, vol.I, edi.II, Cambridge University Press, 1991.
40. Tutin T.G et al - *Flora Europaea*, 1-5, Cambridge University Press, 1964-1980.
41. UJVÁRI I – *Geografia apelor României*, Ed. Șt. București, 1972.
42. URZICĂ S.M – *Studiul populațiilor speciilor prevernale și vernale din împrejurimile comunei Șăulia de Câmpie, județul Mureș*, lucrare gradul I, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, 1997.

Studii botanice și fitochimice asupra speciei *Aesculus x carnea* hayne (*Hippocastanaceae*)

Mariana Pavel, Maria Voicu

U.M.F. Carol Davila, București, Facultatea de Farmacie, Disciplina de Farmacognozie Fitochimie Fitoterapie
Adresa de corespondență: mariana_pavel2003@yahoo.com

Aesculus x carnea Hayne este un arbore obținut prin încrucișarea speciilor *Aesculus hippocastanum* L. și *Aesculus pavia* L. Florile speciei *Aesculus x carnea* au fost analizate din punct de vedere morfo-anatomic și fitochimic. S-au identificat următoarele principii active: carotenoide, flavonozide, proantociani, antocianozide, cumarine, ODP-uri, compuși reducători, tanin și poliholozide. S-a determinat cantitativ conținutul de flavonozide, ODP-uri, antociani și proantociani.

Cuvinte cheie: *Aesculus x carnea*, flavone, cumarine, proantociani

Aesculus x carnea Hayne is a tree obtained by hybridisation between *Aesculus hippocastanum* L. și *Aesculus pavia* L. The flowers of *Aesculus x carnea* were analysed from morpho-anatomic and phytochemical point of view. The following active substances were identified: carotenoides, flavones, proanthocyanins, anthocyanins, coumarins, caffeic acid derivates, reducing compounds, tannin și polysaccharides. The content of flavones, caffeic acid derivates, anthocyanins and proanthocyanins has been determined.

Key words: *Aesculus x carnea*, flavones, coumarines, proanthocyanins

Aesculus x carnea Hayne este un arbore ornamental obținut prin încrucișarea speciilor *Aesculus hippocastanum* L. (castan porcesc) și *Aesculus pavia* L. (castan roșu). Prezintă o tulpină înaltă de până la 25 m, frunze palmat-compuse, cu câte cinci foliole cuneat-ovate. Florile, de o frumusețe deosebită, sunt colorate în roșu-carneu sau roșu-stacojiu și sunt dispuse în inflorescențe mari, de tip panicul [8].

Specia *Aesculus hippocastanum* L. este o sursă importantă de principii active, cu importanță terapeutică. Scoarța, *Hippocastani cortex*, conține cumarine (esculozidă, esculetol, fraxozidă, fraxetol), proantocianidoli, saponozide, amidon și tanin catehic și se folosește în terapie ca vasoprotector [3,10]. Semintele, *Hippocastani semen*, conțin saponozide triterpenice de tip β -amirinic (escină), flavonoide și tanin catehic (proantocianidol-epicatehină). Extractul obținut din semintele de castan se folosește în tratamentul insuficienței venoase cronice, datorită acțiunii antiedematoase și vasoprotectoare [4,10].

Din fructele speciei *Aesculus pavia* L. au fost izolate saponozide triterpenice de tip pentaciclic, denumite esculozide și esterii ai acidului 3-indolilacetic [9].

Lucrarea de față a avut ca scop o analiză botanică și fitochimică asupra florilor speciei *Aesculus x carnea* Hayne, mai puțin studiată din acest punct de vedere.

MATERIAL ȘI METODE

Materialul vegetal analizat a fost constituit din inflorescențele speciei *Aesculus x carnea* Hayne, recoltate în anul 2006, dintr-un parc bucureștean.

Într-o primă etapă produsul vegetal a fost analizat din punct de vedere macroscopic, conform Farmacopeei Române ed. a X-a, apoi microscopic, folosind preparate superficiale clarificate cu hidroxid de sodiu 100 g/L [11]. S-a efectuat o analiză calitativă asupra soluțiilor extractive obținute cu solvenți de polarități diferite (eter, alcool și apă), cu scopul

identificării, prin reacții specifice, a principalelor grupe de constituenți chimici [2]. Asupra unor principii active au fost efectuate analize cromatografice și determinări cantitative:

1) Flavonozidele au fost analizate calitativ prin cromatografie în strat subțire (CSS), pe silicagel 60 F254 (Merck), folosind faza mobilă acetat de etil-apă-acid formic-acid acetic (72:14:7:7) și reactivul NEU/PEG pentru identificare; pentru analiza agliconilor flavonici faza mobilă a fost toluen-acetat de etil-acid formic (5:3:1) [5]. Determinarea cantitativă s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică cu $AlCl_3$ indicată de FR X pentru *Cynarae folium* și exprimarea conținutului în rutozidă g% [11].

2) Cumarinele au fost identificate prin CSS, pe silicagel 60 F254 (Merck), cu faza mobilă acid acetic diluat-eter-toluen (10:50:50) și identificare cu soluție alcoolică 2M de hidroxid de potasiu [12].

3) Compușii fenil-propanici (orto-dihidroxifenolii-ODP) au fost analizați calitativ prin CSS după tehnica prevăzută la analiza flavonozidelor [5]. ODP-urile au fost dozate prin metoda prevăzută de Farmacopeea Europeană ediția a 5-a, la monografia *Fraxini folium*, cu exprimare în acid clorogenic [12].

4) Proantocianii au fost analizați cantitativ după o tehnică elaborată de Lebreton, după transformarea lor în antocianii corespunzători și extracția în n-butanol, exprimarea fiind efectuată în procianidol g% [6].

5) Antocianii au fost determinați cantitativ după tehnica Markakis, exprimând conținutul în cianidină g% [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin examenul macroscopic efectuat asupra florilor speciei *Aesculus x camea* au fost evidențiate următoarele caractere: floarea este formată din cinci sepale inegale, de culoare roz, patru petale cu margine ondulată, ușor crenat-ciliată, pubescente la bază, de culoare roz în partea superioară și galbenă în cea inferioară; staminele sunt în număr de șapte, dispuse pe două verticile (androceu diplostemon) cu filamente inegale; anterele sunt de două tipuri, medifixe, reniforme, portocalii și respectiv bazifixe, de culoare mai deschisă; gineceul este superior, tricarpelat, trilojat, biovulat, cu placentă axilară. Unele flori sunt unisexuate, masculine, prin atrofierea gineceului. Aceste date vin în completarea celor prevăzute în literatura de specialitate [8].

În urma examenului microscopic au fost identificate elementele anatomice specifice: peri glandulari cu picior pluricelular și glandă pluricelulară în formă de măciucă, laticifere (figura 1), peri tectori pluricelulari, lungi verucoși, granule de polen sferice, cu exina netedă (figura 2). Prezența laticiferelor este în conformitate cu literatura de specialitate, care prevede aceste elemente pentru speciile din ordinul *Sapindales* [1].



Figura 1. Laticifere și peri glandulari în preparat superficial



Figura 2. Peri tectori, peri glandulari și polen în preparat superficial

Prin analiza fitochimică au fost identificate următoarele clase de principii active: carotenoide, agliconi flavonici, cumarinici și triterpenici în soluția extractivă eterică; flavonozide, proantociani, antocianozide, cumarine, ODP-uri, compuși reducători și tanin în soluția extractivă alcoolică; poliholoze de tip mucilagii în soluția extractivă apoasă.

Din analiza cromatogramei pe strat subțire de silicagel a rezultat că în florile de *Aesculus x carnea* sunt prezente șapte fracțiuni flavonoidice, dintre care trei cu fluorescență portocalie și patru cu fluorescență galbenă. Una dintre fracțiuni a prezentat aceeași valoare Rf (0,35) și fluorescență portocalie cu rutozida. Dintre compușii fenil-propanici a fost prezent acidul cafeic (Rf = 0,95). Agliconii flavonoidici identificați au fost kemferolul (Rf = 0,55, fluorescență galben-verzuie) și cvercetulolul (Rf = 0,42, fluorescență portocalie). Din grupul cumarinelor a fost identificat scopoletolul (Rf = 0,25, fluorescență albastră). Rutozida, cvercetulolul și kemferolul se regăsesc în frunzele și semințele de *Aesculus hippocastanum*, cvercetulolul fiind menționat pentru scoarța aceleiași specii. Dintre cumarine, scopoletolul este caracteristic, conform literaturii de specialitate, pentru produsele vegetale *Hippocastani folium* și *cortex* [10].

Florile speciei *Aesculus x carnea* conțin un procent relativ mic de flavonozide totale (0,36 g%). Același procent de flavonozide este menționat de literatură pentru produsul vegetal *Hippocastani semen* [10]. Compușii fenil-propanici (ODP-urile) se găsesc în cantitate de 3,16%, rezultat care poate fi considerat ridicat în comparație cu alte produse vegetale. Conținutul în antociani este 0,12%, iar proantocianii se găsesc într-un procent ridicat, de 0,876 %.

Rezultatele determinărilor cantitative sunt redate în tabelul I.

Tabelul I. Conținutul în principii active al florilor speciei *Aesculus x carnea*

Principiile active	Conținut
Flavonozide (g% în rutozidă)	0,357
ODP-uri (g% în acid clorogenic)	3,160
Proantociani (g% în proantocianidol)	0,867
Antociani (g% în antocianidol)	0,116

CONCLUZII

S-a efectuat un studiu macroscopic și microscopic asupra florilor speciei *Aesculus x carnea* Hayne (*Hippocastanaceae*), cu evidențierea unor particularități morfologice și anatomice. S-a efectuat de asemenea un studiu fitochimic, identificând mai multe grupe de principii active, printre care flavonozide, ODP-uri, saponozide, proantociani, carotenoide. Cromatografic au fost identificați compușii rutozidă, cvercetulol, kemferol, acid cafeic și scopoletol.

Florile de *Aesculus x carnea* au un conținut de 0,36% flavonozide, 0,12% antocianozide, 0,87% proantociani și 3,16% ODP-uri.

BIBLIOGRAFIE

1. CRETE P – *Precis de Botanique Sistematique des Angiospermes*, Ed. Masson, 1962, vol. II, 229.
2. GÎRD CE, DUȚU LE, POPESCU M-L et al - *Analiza chimică calitativă a produselor vegetale* in Farmacognozie Baze practice vol II, Ed. Universitară „Carol Davila”, 2006, 274-278.
3. ISTUDOR V – *Cumarine* in Farmacognozie Fitochimie Fitoterapie vol. I, Ed. Medicală, 1998, 130.

4. ISTUDOR V - *Saponozide triterpenice* in Farmacognozie Fitochimie Fitoterapie vol. I, Ed. Medicală, 1998, 304-306.
5. JORK H, FUNK W, WIMMER H – *Thin-Layer Chromatography Reagents and Detection Methods* Vol. 1a, Weinheim Germany, 1990, 277-283.
6. LEBRETON P, JAY M, VOIRIN B – *Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides*, Chim. Anal. Fr., 1967, 49:375-383.
7. MARKAKIS P – *Anthocyanins as Food Colors*, New York London Academic Press, 1982, 191-193.
8. PÎRVU C – *Enciclopedia plantelor. Plante din flora României*, vol. I, Ed. Tehnică, 2002, 446-447.
9. ZHANG Z, LI S, ZHANG S et al - *Triterpenoid saponins from the fruits of Aesculus pavia*, Phytochemistry, 2006, 67, 8:784-794.
10. WICHTL M, ANTON R – *Plantes therapeutiques*, Ed. TEC&DOC Lavoisier Paris, 1999, 270-279.
11. xxx - *Farmacopeea Română* ediția a X-a, Ed. Medicală, 1993, 335, 1051-1055.
12. xxx – *European Pharmacopoeia 5.0*, Strasbourg, Council of Europe, 2005, 1027 2970.



Cercetări farmacologice privind acțiunea antiinflamatoare a uleiului gras de *Echium vulgare* L.

Simona Negreș¹, Oana Rebegea², Marilena-Viorica Codreanu², Mihaela Dinu²

Facultatea de Farmacie, UMF „Carol Davila”, Str. Traian Vuia nr.6, București

¹ Disciplina de Farmacologie și Farmacie clinică

² Disciplina de Botanică farmaceutică și Biologie celulară

E-mail corespondență: oanarb@yahoo.co.uk

Am investigat acțiunea antiinflamatoare a uleiului gras extras din semințele de *Echium vulgare* L. (boranță, *Borraginaceae*), pe șobolani albi, masculi, sușa Wistar. Am utilizat pentru determinare testul inducerii edemului labei de șobolan (inflamație acută) prin administrarea dextranului intraplanar. S-a utilizat ca substanță de referință fenilbutazona, antiinflamator nesteroidian, inhibitor al ciclooxigenazei de tip 1 și 2. Acțiunea antiinflamatoare a uleiului gras analizat a fost comparată atât cu lotul martor tratat cu apă distilată, cât și cu substanța de referință, fenilbutazona. Rezultatele cercetării au demonstrat că uleiul gras cercetat de noi, prezintă efect antiinflamator intens comparativ cu lotul martor. Intensitatea efectului este mai mare în primele 80 minute după administrarea intraplanară a dextranului.

Aceste date sunt concordante cu cele din literatură, care evidențiază efectul antiinflamator al acidului γ -linolenic prezent în compoziția uleiului gras extras din semințele de *Echium vulgare* L.

We have studied the anti-inflammatory action of the fatty oil obtained from the seeds of Echium vulgare L. (blueweed, Borraginaceae) on Wistar male rats. The induction edem of rat foot test (acute inflammation) by intraplantary administration of dextran was the pharmacological method. It was used as reference substance fenilbutasone, which is a nonsteroidian antiinflammator, inhibitor of type 1 and 2 cyclooxygenase.

The antiinflammatory action of the fatty oil we analysed was compared to both witness group, treated with distilled water and the reference substance, fenilbutasone. The results of this research demonstrated that this fatty oil had intense antiinflammatory effect compared to the witness group. The intensity of this effect is enhanced for the first 80 minutes after the administration of dextran into the rat foot.

These data were in accordance with the published data, which showed the antiinflammatory effect of γ -linolenic acid, a component of the Echium vulgare seed fatty oil.

Key words: blueweed, antiinflammatory action, seed fatty oil

Acizii grași esențiali au o importanță fundamentală în menținerea sănătății fiind componente ale membranelor celulare și precursori ai eicosanoizilor implicați în procesele biochimice din organism.

Numeroase studii farmacologice preclinice și clinice au adus în centrul atenției doi acizi grași polinesaturați cu proprietăți antiinflamatorii, acidul γ -linolenic (C18:3n-6) din familia omega-6 și stearidonic (C18:4n-3) din familia de acizi omega-3.

Acești acizi se formează în organism în cantități relativ reduse prin conversia acidului linoleic și respectiv alfa-linolenic sub acțiunea delta 6-desaturazei. Prin metabolii lor, acești compuși influențează balanța dintre eicosanoizii pro- și antiinflamatorii. Mecanismele de acțiune sunt complexe și neelucidate încă complet.

Prin suplimentarea dietei cu uleiuri vegetale bogate în acid γ -linolenic se constată o acumulare în țesuturi a metabolitului acestuia, acidul dihomogama-linolenic care este transformat pe calea ciclooxigenazei în prostaglandină PGE1, iar pe calea lipoxigenazei în acid 15-hidroxicicosatrienoic, doi compuși oxigenați cu proprietăți antiinflamatorii.

De asemenea prin creșterea aportului de acid stearidonic s-a constatat o reducere a inflamației acute și cronice, posibil prin inhibarea lipoxigenazei și scăderea sintezei leukotrienelor proinflamatorii [3,4,5,6,8,9].

Studii clinice placebo-controlate au demonstrat că terapia cu uleiuri bogate în acid γ -linolenic și stearidonic este eficientă în eczemă atopică și artrită reumatoidă, afecțiuni cronice cauzate probabil și de o deficiență în acizi grași esențiali [1,2,7].

Acizii γ -linolenic și stearidonic au o răspândire limitată în semințele unor specii vegetale, cele mai studiate surse fiind uleiul de luminiță de seară (*Oenothera biennis* L.) cu 8-15% acid γ -linolenic, limba-mielului (*Borago officinalis* L.) cu 14-25% acid γ -linolenic și coacăz negru (*Ribes nigrum* L.) cu 12-18% acid γ -linolenic. Singura sursa vegetală comercială de acid stearidonic este uleiul de *Ribes nigrum* L. (2-4%).

În acest studiu au fost realizate cercetări farmacologice privind o posibilă acțiune antiinflamatoare a uleiului gras extras din semințele de *Echium vulgare* L. (boranță), recoltată din flora spontană. Uleiul gras luat în studiu este foarte bogat în acid γ -linolenic (10,17%) și stearidonic (14,88%), nivelul ridicat al acestor compuși biologic activi motivând inițierea acestei cercetări.

MATERIALE ȘI METODĂ

A fost investigată prin testul inflamației acute induse de administrarea dextranului intraplantar la șobolan acțiunea antiinflamatoare a uleiului gras extras din semințele speciei *Echium vulgare* L. recoltată din Cheia (Prahova) în august 2004.

Pentru determinarea edemului labei de șobolan și cuantificarea efectului antiinflamator, s-a utilizat metoda pletismometrică, utilizând pletismometrul UGO BASILE 7140. Determinările au fost efectuate pe 12 șobolani albi, masculi, sușa Wistar (am utilizat 4 animale pe lot din considerente de bioetică a cercetării pe animale de laborator).

S-au alcătuit 3 loturi de șobolani care au fost tratate astfel:

Lot 1 - Ser fiziologic 1 ml / 100 g corp, p.o.

Lot 2 - Ulei gras extras din semințele de boranță, 1 ml / 100 g corp, p.o.

Lot 3 - Soluție apoasă de fenilbutazonă 100 mg/ kg corp, 1%, p.o.

S-a determinat pentru toate animalele luate în lucru volumul inițial al labei de șobolan. La o oră după administrarea substanțelor menționate mai sus, animalele au fost anesteziate cu uretan, 1,3 g/kg corp, soluție 10%.

După anestezie s-a administrat dextran intraplantar, 0,1 ml/labă. Apoi, a fost determinat volumul labei de șobolan din 20 în 20 minute, timp de 3 ore după administrarea dextranului.

REZULTATE

Rezultatele cercetării au fost interpretate statistic prin testele t Student și Anova.

Evoluția edemului inflamator față de volumul inițial al fiecărui animal pentru loturile martor, lotul tratat cu ulei gras extras din semințele de *Echium vulgare* și lotul tratat cu fenilbutazonă este redat în tabelele I-III și în figurile nr. 1-3.

Efectul antiinflamator (exprimat procentual) al uleiului gras extras din semințele de boranță și al fenilbutazonei este redat în tabelul IV și în figurile nr. 4-5.

Efectul antiinflamator al uleiului gras comparativ cu al fenilbutazonei este redat în tabelul V și în figura nr. 6.

DISCUȚII

Rezultatele cercetării au demonstrat faptul că edemul inflamator al labei de șobolan pentru animalele din lotul martor crește semnificativ statistic ($p < 0,0001$), pe toată durata determinărilor efectuate de noi (tabel I, figura 1).

Tabel I. Evoluția edemului labei de șobolan după administrarea dextranului la lotul martor (ser fiziologic, 1 ml/100 g corp, oral)

Nr.crt	Greutate	Vinit	V20'	V40'	V60'	V80'	V100'	V120'	V140'	V160'	V180'
1	120	0,91	1,62	1,78	1,74	1,88	1,85	1,54	1,39	1,37	1,29
2	120	0,82	1,53	1,67	1,50	1,74	1,33	1,34	1,38	1,34	1,26
3	138	0,81	1,66	1,62	1,77	1,77	1,53	1,38	1,41	1,34	1,25
4	124	0,77	1,46	1,43	1,36	1,36	1,24	1,26	1,35	1,4	1,32
5	122	0,67	1,42	1,42	1,57	1,57	1,25	1,15	1,06	1,2	1,17
Medie		0,80	1,542	1,584	1,506	1,664	1,44	1,334	1,318	1,33	1,258
EF% Vinit			93,71	98,95	89,16	109,05	80,96	67,58	65,58	67,05	58,00
t			12,8316	9,8485	6,8031	8,7852	5,1384	7,1185	6,8719	10,2845	9,9638
p			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F	11,6974										
p	<0,0001										

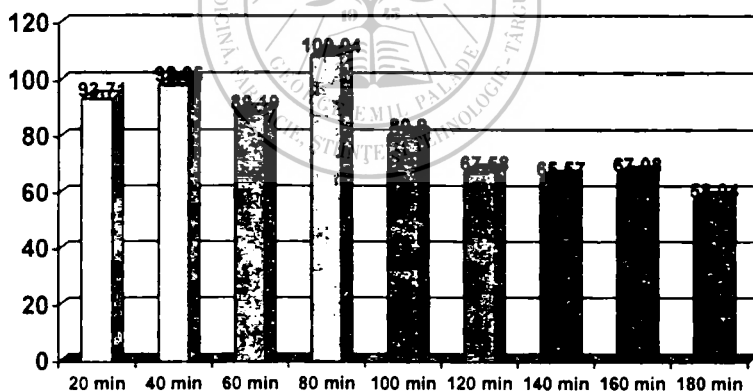


Figura nr. 1. Evoluția edemului labei de șobolan după administrarea dextranului la lotul martor (exprimare procentuală)

Substanța de referință, fenilbutazona, prezintă protecție față de inflamația indusă cu dextran administrat intraplantar, astfel că edemul labei nu este semnificativ statistic față de inițial ($p > 0,05$), în minutele 40-80 ale determinărilor (tabel III, figura 3 și 5).

Tabel III Evoluția edemului labei de șobolan după administrarea dextranului la lotul tratat cu fenilbutazonă (100 mg/kg corp oral)

Nr.	Greutate	Vinit	V20'	V40'	V60'	V80'	V100'	V120'	V140'	V160'	V180'
1	176	1,37	1,47	1,66	1,89	1,57	1,78	1,64	1,6	1,8	1,69
2	158	1,19	1,79	1,89	3,21	2,35	1,54	1,79	1,94	1,94	1,94
3	174	1,31	1,9	1,1	1,14	1,25	1,11	1,18	1,19	1,15	1,11
4	160	0,99	1,8	1,66	1,67	2,08	1,68	1,63	1,69	1,67	1,71
Medie		1,215	1,69	1,5775	1,6775	1,815	1,5525	1,56	1,605	1,59	1,6125
EP%			39,09	29,83	38,06	19,38	27,77	28,39	32,09	30,86	32,77
Vinit											
T			3,7272	1,92935	1,97664	2,2803	1,9601	2,20826	2,20324	2,03647	2,03119
p			<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
F	0,85103										
p	>0,05										

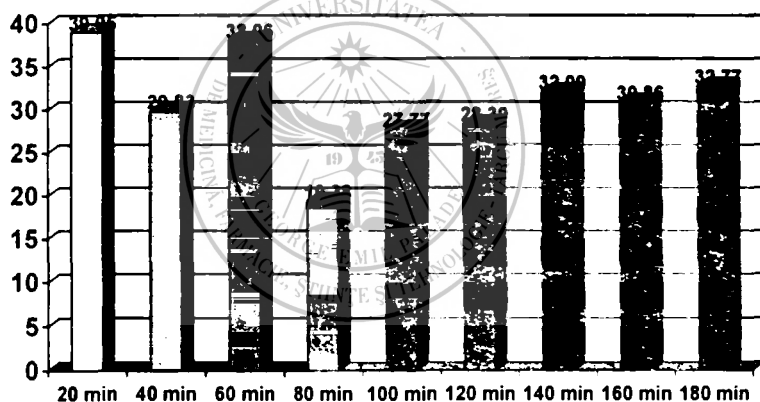


Figura 3. Evoluția edemului labei de șobolan după administrarea dextranului la lotul tratat cu fenilbutazonă (exprimare procentuală, efect%/ inițial)

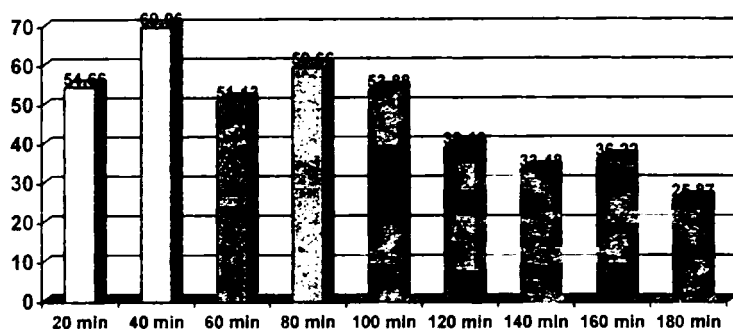


Figura 5. Efectul antiinflamator al fenilbutazonei față de lotul martor

Pentru uleiul gras extras din semințele de *Echium vulgare*, volumul labei crește de asemenea nesemnificativ statistic ($p > 0,05$), cu excepția determinărilor efectuate în minutele 80, 100 și 180 (tabel II, figura 2).

Tabelul II. Evoluția edemului labei de șobolan după administrarea dextranului la lotul tratat cu ulei gras de *Echium vulgare* (1 ml/100 g corp, oral)

Nr.	Greutate	Vinit	V20'	V40'	V60'	V80'	V100'	V120'	V140'	V160'	V180'
1	130	1,02	1,27	1,53	1,36	1,64	1,58	1,23	1,49	1,42	1,57
2	138	1,07	1,19	0,57	1,19	1,45	1,50	1,33	1,43	1,44	1,64
3	226	1,38	1,73	2,33	1,98	2,35	2,15	1,90	2,19	1,81	1,86
4	150	1,11	1,51	1,62	1,92	2,06	2,05	1,91	1,64	1,72	2,06
Medie		1,15	1,43	1,51	1,61	1,88	1,82	1,82	1,69	1,60	1,78
EF%			24,45	32,10	40,83	63,76	58,95	39,08	47,38	39,52	55,68
Vinit											
t			1,9126	0,9922	2,1845	3,3395	3,6994	2,2531	2,8403	3,5572	4,64353
p			>0,05	>0,05	>0,05	0,01	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05
F	1,32265										
p	>0,05										

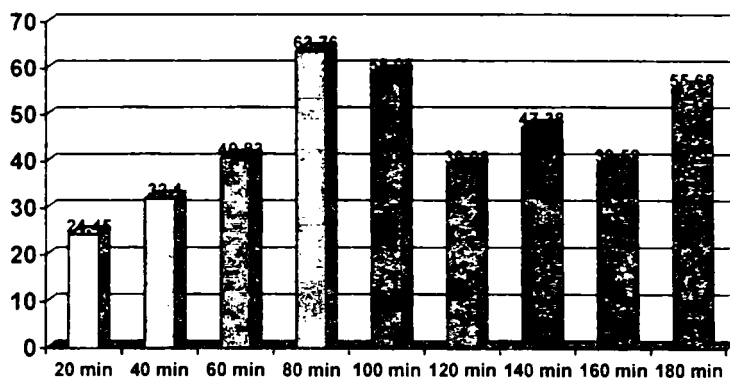


Figura 2. Evoluția edemului labei de șobolan după administrarea dextranului la lotul tratat cu ulei gras extras din *Echinium vulgare* (exprimare procentuală, efect% / inițial)

Se evidențiază efectul antiinflamator al uleiului gras extras din semințele de *Echinium vulgare* L., comparativ cu lotul martor la toate momentele determinărilor pletismometrice. Acest efect este mai intens în minutele 20-80 după administrarea dextranului și scade în intensitate în minutele 100-180. Pentru fenilbutazonă efectul antiinflamator comparativ cu lotul martor este mai intens în minutele 20-100 după administrarea dextranului și scade în intensitate până la sfârșitul determinărilor (tabel IV, figura 4).

Tabelul IV. Efectul antiinflamator al uleiului gras de *Echinium vulgare* și al fenilbutazonei comparativ cu lotul martor (exprimare procentuală)

Momentul determinării	Efectul antiinflamator % / martor	
	Ulei de <i>Echinium vulgare</i>	Fenilbutazonă
20'	69,3	54,66
40'	66,9	69,96
60'	48,36	51,13
80'	45,29	59,66
100'	22,7	53,88
120'	28,5	39,19
140'	18,19	33,48
160'	27,56	36,22
180'	2,37	25,87

Tabelul V - Efectul antiinflamator al uleiului gras de *Echium vulgare* comparativ cu lotul tratat cu fenilbutazonă

Momentul determinării	Efectul antiinflamator % față de fenilbutazonă al uleiului gras de <i>Echium vulgare</i>
20'	14,64
40'	-2,26
60'	-2,77
80'	-14,37
100'	-31,25
120'	-10,69
140'	-15,29
160'	-8,66
180'	-23,5

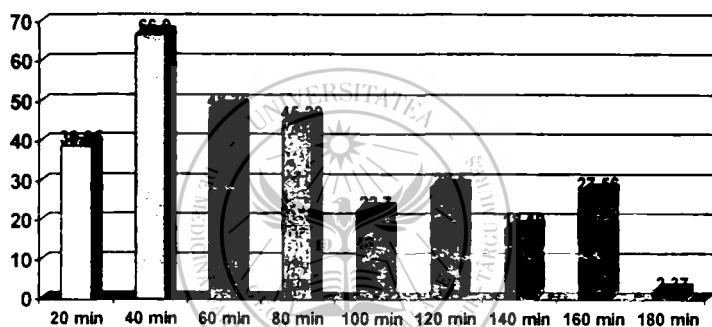


Figura nr. 4 - Efectul antiinflamator al uleiului extras din *Echium vulgare* față de lotul martor (efect%/inițial)

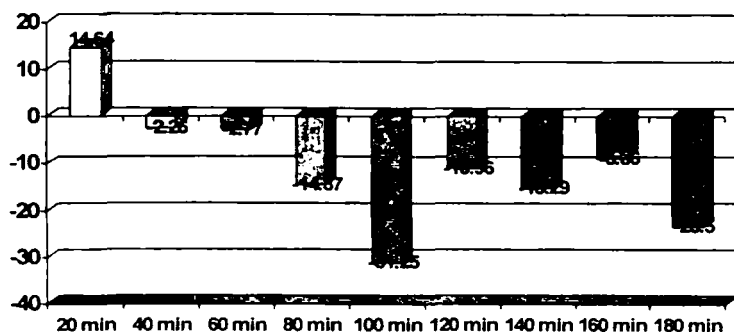


Figura nr. 6 - Efectul antiinflamator al uleiului gras extras din *Echium vulgare*, față de substanța de referință, fenilbutazona

Efectul antiinflamator al uleiului gras studiat de noi prezintă acțiune antiinflamatoare mai redusă comparativ cu substanța de referință, fenilbutazona (tabel V, figura 6).

CONCLUZII

Studiul farmacologic efectuat a demonstrat un efect antiinflamator al uleiului gras extras din semințele speciei *Echium vulgare* L., de intensitate comparabilă cu cea a lotului tratat cu substanța de referință, fenilbutazona. Acest efect se manifestă din primele 20 minute după administrarea dextranului, fiind de intensitate >40% comparativ cu matorul, în primele 80 minute ale determinărilor pletismometrice. Deși efectul antiinflamator al uleiului studiat de noi prezintă acțiune antiinflamatoare mai redusă comparativ cu substanța de referință, fenilbutazona, rezultate obținute susțin alte date din literatură care au evidențiat acțiunea antiinflamatoare a acidului γ -linolenic.

BIBLIOGRAFIE

1. BELCH JJ, HILL A - *Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions*, Am J Clin Nutr, 2000, 71:352S-6S.;
2. CALDER PC, ZURIER RB - *Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis*, Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2001, 4:115-21.
3. Das UN - *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*, Biotechnol J, 2006, 1:420-39.
4. DE LA PUERTA VÁZQUEZ R, MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ E, SANCHEZ PERONA J et al - *Effects of different dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils*, Metabolism, 2004, 53:59-65.
5. FURSE RK, ROSSETTI RG, SEILER CM et al - *Oral administration of gamma-linolenic acid, an unsaturated fatty acid with anti-inflammatory properties, modulates interleukin-1 beta production by human monocytes*, J Clin Immunol, 2002, 22:83-93.
6. FURSE RK, ROSSETTI RG, ZURIER RB - *Gamma-linolenic acid, an unsaturated fatty acid with anti-inflammatory properties blocks amplification of IL-1 beta production by human monocytes*, J Immunol, 2001, 167:490-6.
7. KITZ R, ROSE MA, SCHÖNBORN H et al - *Impact of early dietary gamma-linolenic acid supplementation on atopic eczema in infancy*, Pediatr Allergy Immunol, 2006, 17:112-7.
8. JOHNSON MM, SWAN DD, SURETTE ME - *Dietary supplementation with gamma-linolenic acid alters fatty acid content and eicosanoid production in healthy humans*, J Nutr, 1997, 127:1435-1444.
9. MELNIK BC, PLEWIG G - *Is the origin of atopy linked to deficient conversion of omega-6-fatty acids to prostaglandin E1?*, J Am Acad Dermatol, 1989, 21:557-563.

Studiul farmacognostic comparativ al produselor vegetale *Filipendulae hexapetalae flores* și *Filipendulae hexapetalae folium*

Maria - Lidia Popescu ¹, Mihaela Dinu ², Ioana Tudor ¹

UMF „Carol Davila”, Facultatea de Farmacie, str. Traian Vuia, nr. 6, București

¹Disciplina de Farmacognozie. Fitochimie. Fitoterapie

²Disciplina de Botanică farmaceutică și Biologie celulară

Adresă de corespondență: lidiapopescu24@yahoo.com

Obiectivele acestui studiu au constat în stabilirea caracterelor microscopice și a compoziției chimice a produselor vegetale de tip *flores* și de tip *folium* obținute de la *Filipendula hexapetala* Gilib., aglice, Rosaceae. Aceste produse au fost recoltate din flora spontană a României (județul Argeș), în iunie 2006.

Microscopic s-au identificat următoarele elemente anatomice specifice: peri tectori uniceulari, stomate de tip anomocitic, grăuncioare de polen cu trei pori germinativi și exină netedă, oxalat de calciu (druze și cristale).

Prin CSS s-a stabilit prezența în aceste produse vegetale a rutozidei, cvercitolului, hiperozidei, acidului cafeic și acidului clorogenic.

Conținutul în flavone (exprimate în rutozidă) este de $0,793 \pm 0,078$ % în flori și de $0,531 \pm 0,067$ % în frunze, iar cel de derivați ai acidului hidroxicinamic (exprimați în acid clorogenic) de $4,679 \pm 0,562$ % în flori și $4,262 \pm 0,664$ % în frunze. Diferențele observate sunt semnificative statistic în cazul flavonelor ($p = 0,0068$), respectiv nesemnificative statistic pentru derivații acidului hidroxicinamic ($p = 0,3912$).

Cuvinte cheie: *Filipendula hexapetala*, examination microscopic, analiză chimică

This study has as objectives to establish the microscopic characteristics of Filipendula hexapetala Gilib., meadowsweet, Rosaceae (flower and leaf) and to bring information about its chemical composition.

The raw material was harvested from the Romanian spontaneous flora (Arges County), in June 2006. Microscopically we identified the following specific anatomical elements: characteristics unicellular trichomes, anomocytic stomata, triporate pollen grains with smooth exine and calcium oxalate (cluster crystals and crystals).

Rutin, hyperoside, quercetin, caffeic acid and chlorogenic acid were identified in these plant products, using TLC.

A content of $0,793 \pm 0,078$ % of flavonoids (expressed as rutin) was found in flowers and of $0,531 \pm 0,067$ % in leaves. Total hydroxycinnamic acid derivatives (expressed as chlorogenic acid) were found to be $4,679 \pm 0,562$ % in flowers and $4,262 \pm 0,664$ % in leaves. The mean differences observed between flowers and leaves were statistically significant for flavonoids ($p = 0,0068$) and no statistically significant for total hydroxycinnamic acid derivatives ($p = 0,3912$).

Key words: *Filipendula hexapetala*, microscopically examination, chemical analysis

Filipendula hexapetala Gilib., aglice, Rosaceae este o specie larg răspândită în țara noastră, prin fânețe uscate, coaste însorite, luminișuri de păduri [13].

De remarcat că literatura consultată oferă puține date despre această specie, dar numeroase despre specia înrudită *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim (crețușcă). Experimental s-a demonstrat că fracțiunea polifenolică are acțiune antioxidantă asupra radicalilor superoxid și de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil superioară extractelor de *Vitis vinifera* [2], antibacteriană pe *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* și *S. epidermidis* prin naringenol și cvercitol [11], anticoagulantă și fibrinolică la administrare orală [8] efect explicat prin prezența unui

compus cu proprietăți electroforetice similare heparinei umane [5, 6], de prevenire a displaziilor cervicale uterine [10] etc.

În România, florile de aglice sunt utilizate tradițional în tratamentul eczemelor (uz extern) și pentru combaterea durerilor post - natale (uz intern) [1].

În această lucrare ne-am propus un studiu microscopic și chimic comparativ al florilor (*Filipendulae hexapetalae flores*) și frunzelor (*Filipendulae hexapetalae folium*) acestei specii.

MATERIAL ȘI METODE

Ca material de studiu s-au folosit florile și frunzele speciei *Filipendula hexapetala*, recoltate la începutul lunii iunie, 2006, din Morărești (județul Argeș) și uscate la temperatura camerei.

Identitatea produsului vegetal a fost stabilită prin:

- examen macroscopic (pentru verificarea caracterelor morfologice);
- examen microscopic al preparatelor superficiale clarificate cu hidroxid de sodiu 100 g/L, la microscopul Labophot 2-Nikon, cu ocular 10x și obiectivele 10x și 40x;
- examen chimic calitativ (screening fitochimic pentru identificarea principalelor grupe de principii active din soluțiile obținute prin extracții succesive cu eter etilic, etanol și apă). S-au efectuat reacții chimice specifice, citate în literatura de specialitate [3, 4].

Calitatea produsului vegetal a fost apreciată prin determinarea unor parametri convenționali („pierdere prin uscare” sau umiditatea produsului, conform metodei standard din FR X, cap. IX.C.15 – varianta încălzirii în etuvă, la 105°C) și prin dozarea unor principii active de tip polifenoli.

Pentru determinarea cantitativă a derivaților acidului hidroxicinamic s-a utilizat metoda spectrofotometrică citată de Farmacopeea Europeană ed. a 5-a (monografia *Ash folium*) și bazată pe formarea oximelor, în prezența acidului azotos și a molibdatului de sodiu, iar pentru flavone metoda spectrofotometrică citată de Farmacopeea Română ed. a X-a (monografia *Cynarae folium*) și bazată pe reacția de chelatare cu clorura de aluminiu [5, 6]. Citirile fotometrice s-au efectuat la un spectrofotometru UV-VIS Cecil series 2000. Pentru interpretarea statistică a rezultatelor s-a apelat la testul *t* (Microsoft Excel 2003; $\alpha = 0,05$).

Prin CSS (cromatografie pe strat subțire) s-a urmărit identificarea polifenolilor (acizi polifenolcarboxilici și flavone).

Condițiile analizei prin CSS [7]

- soluții de analizat: fracțiunile metanolice rezultate prin refluxarea cu metanol a celor două produse vegetale, timp de 10 – 15 minute;
- fază staționară: silicagel GF₂₅₄ Merck;
- fază mobilă: acetat de etil/ acid formic anhidru/ apă, 80/ 8/ 12 (v/v);
- substanțe de referință: soluții metanolice 0,1% de rutozidă, hiperozidă, cvercetinol, acid cafeic și acid clorogenic;
- reactivi de revelare: difenilboriloxietilamină 1% în metanol și propilenglicol 5%.

REZULTATE

La examinarea macroscopică s-a constatat că produsul *Filipendulae hexapetalae flores* (figura 1) este constituit din inflorescențe corimbiforme cu miros specific. Florile prezintă corolă dialipetală, formată din cinci petale spatulate, de culoare slab galbenă, caliciu dialisepal, cu cinci sepale mici, triunghiulare, pubescente, numeroase stamine cu filamente subțiri, ondulate și gineceu cu stiluri

îngroșate și stigmatate globuloase. *Filipendulae hexapetalae folium* (figura 2) se caracterizează prin numeroase perechi de foliole penatinerve, cu margini adânc serate, glabre sau slab pubescente.



Figura 1. Filipendulae hexapetalae flores



Figura 2. Filipendulae hexapetalae folium

Prin efectuarea examenului microscopic s-au evidențiat următoarele caractere histologice: peri tectori unicelulari (figura 3); fragmente de epidermă cu pereți sinuoși și stomate de tip anomocitic (figura 4); grăuncioare de polen cu exina netedă și trei pori germinativi (figura 5); papile; endoteciu cu aspect stelat (figura 6). În ambele produse vegetale oxalatul de calciu se găsește sub formă de druze (figura 7) sau cristale prismatice (figura 8).

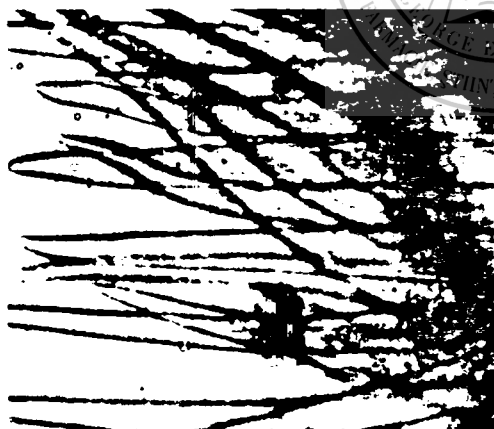


Figura 3. Peri tectori



Figura 4. Polen

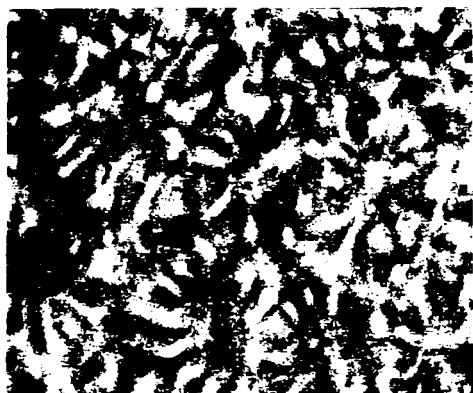


Figura 5. Endoteciu



Figura 6. Epiderma cu stomate



Figura 7. Druze

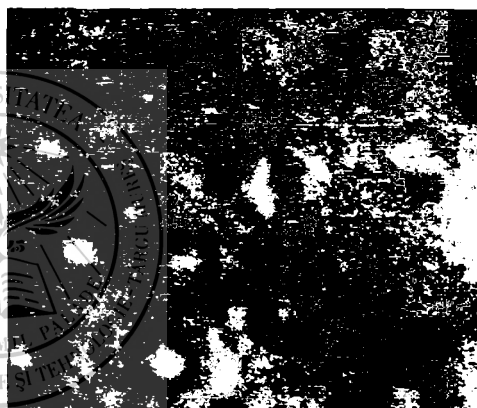


Figura 8. Cristale de oxalat de calciu

Prin examenul chimic calitativ s-au decelat următoarele grupe de principii active: flavone (libere și glicozidate), acizi polifenolcarboxilici, taninuri catechice, proantociani, oze, poliholozide și compuși azotați nealcaloidici. În aceste produse vegetale nu au fost identificați alcaloizi, emodoli, antracenozide și acizi rezinici.

Analiza prin CSS a polifenolilor (figura 9) a evidențiat prezența rutozidei ($R_f=0,33$), hiperozidei ($R_f=0,52$), cvercitolului ($R_f=0,92$), acidului cafeic ($R_f=0,46$) și acidului clorogenic ($R_f=0,90$) în florile (soluția 1), respectiv frunzele de aglice (soluția 3). Pe lângă acești compuși din soluția metanolică obținută din flori au mai separat trei compuși cu comportament de flavone (colorație și fluorescență galbenă; $R_f=0,30$, $R_f=0,56$ și $R_f=0,61$) și doi acizi polifenolcarboxilici (compuși cu fluorescență albastră, $R_f=0,37$ și $R_f=0,80$), iar în cazul produsului *Filipendulae hexapetalae folium* două spoturi de acizi polifenolcarboxilici ($R_f=0,57$ și $R_f=0,71$).



Figura 9. Cromatograma extractelor metanolice obținute din florile (1) și frunzele (3) de aglice

În urma determinărilor cantitative s-a constatat că *Filipendulae hexapetalae flores* conține $0,793 \pm 0,078$ % flavone (exprimate în rutozidă) și $4,679 \pm 0,562$ % derivați ai acidului hidroxicinamic (exprimați în acid clorogenic), iar *Filipendulae hexapetalae folium* $0,531 \pm 0,067$ % flavone și $4,262 \pm 0,664$ % derivați ai acidului hidroxicinamic.

DISCUȚII

Caracterele morfologice și organoleptice ale produselor luate în studiu coincid cu cele citate în literatura de specialitate [13].

Dintre elementele anatomice identificate microscopic, specifice pentru *Filipendulae hexapetalae flores* sunt peri tectori uniceulari, cu baza rotunjită și vârful ascuțit, cu aspect diferit de cei prezenți în *Filipendula ulmaria*, caracterizați prin cuticula ușor ondulată. De remarcat că celelalte elemente microscopice, inclusiv forma de cristalizare a oxalatului de calciu corespund celor descrise pentru specia înrudită [14].

Sreening-ul fitochimic a relevat prezența în florile și frunzele de aglice a principalelor grupe de principii active existente în reprezentanții familiei *Rosaceae*, inclusiv în specia înrudită, menționată anterior: flavone, acizi polifenolcarboxilici și taninuri [14]. Pe lângă acestea, în *Filipendula hexapetala* au mai fost identificați derivați salicilici, proantociani și compuși azotați nealcaloidici. Considerăm că derivații salicilici pot explica utilizarea tradițională în dureri post-natale și în unele afecțiuni dermice, în acest caz la acțiunea antiinflamatoare a salicilaților cumându-se efectul antimicrobian și cicatrizant al taninurilor. Este posibil ca taninurile din florile și frunzele de aglice să fie inhibitori enzimatici ai elastazei, proprietate demonstrată pentru taninul din alte *Rosaceae*, inclusiv *F. ulmaria* [7].

Existența unor derivați fenil-propanici de tipul acidului cafeic în produsul *Filipendulae hexapetalae flores* a fost menționată și de alți cercetători [12].

Coroborând rezultatele analizei prin CSS cu datele menționate în literatura de specialitate pentru *Filipendula ulmaria*, presupunem că flavona cu Rf superior hiperozidei este spireozida [14]. Prezența acestui polifenol în *F. hexapetala* este afirmată și de alți cercetători, fiind considerată principalul constituent responsabil de acțiunea antioxidantă a fracțiunii metanolice din florile de aglice [9].

În ceea ce privește conținutul în polifenoli, diferențele observate între florile și frunzele de *Filipendula hexapetala* sunt semnificative statistic ($p = 0,0068$) în cazul flavonelor, respectiv nesemnificative statistic pentru derivații acidului hidroxicinamic ($p = 0,3912$).

CONCLUZII

Filipendulae hexapetalae flores poate constitui o importantă sursă de polifenoli (flavone și derivați de acid hidroxicinamic)

BIBLIOGRAFIE

1. BUTURĂ V - *Enciclopedia de etnobotanică românească*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1979, 25.
2. CALLISTE CA, TROUILLAS P, ALLAIS DP et al. - *Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants*, J Agric Food Chem. 2001 Jul;49(7):3321-7.
3. GÎRD CE, DUȚU LE, POPESCU ML et al - *Farmacognozie. Baze practice*, vol. I. Ed. Universitară „Carol Davila”, București, 2005;
4. GÎRD CE, DUȚU LE, POPESCU ML, et al - *Farmacognozie. Baze practice*, vol. II. Ed. Universitară „Carol Davila”, București, 2006;
5. KUDRIASHOV BA, AMMOȘOVA IAM, LIAPINA LA et al. - *Heparin from the meadowsweet (Filipendula ulmaria) and its properties*, Izv Akad Nauk SSSR Biol. 1991 Nov-Dec;(6):939-43.
6. KUDRIASHOV BA, LIAPINA LA, AZIEVA LD - *The content of a heparin-like anticoagulant in the flowers of the meadowsweet (Filipendula ulmaria)*, Farmakol Toksikol., 1990, Jul-Aug, 53(4):39-41;
7. LAMAISON JL, CARNAT A, PETITJEAN-FREYET C - *Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae*, Ann Pharm Fr. 1990, 48(6):335-40.
8. LIAPINA LA, KOVAL'CHUK GA - *A comparative study of the action on the hemostatic system of extracts from the flowers and seeds of the meadowsweet (Filipendula ulmaria (L.) Maxim.)*, Izv Akad Nauk Ser Biol., 1993 Jul-Aug;(4):625-8.
9. MAKSIMOVIC Z, PETROVIC S, PAVLOVIC M et al. - *Antioxidant activity of Filipendula hexapetala flowers*, Fitoterapia, 2007 Feb 7;
10. PERESUN'KO AP, BESPALOV VG et al. - *Clinico-experimental study of using plant preparations from the flowers of Filipendula ulmaria (L.) Maxim for the treatment of precancerous changes and prevention of uterine cervical cancer*, Vopr Onkol. 1993, 39(7-12):291-5.
11. RAUHA JP, REMES S, HEINONEN M et al. - *Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds*, Int J Food Microbiol., 2000 May 25, 56(1):3-12.
12. TĂMAȘ M, ROȘCA M, SUCIU - IORGA I et al - *Cercetări fitochimice comparative asupra florilor de Filipendula ulmaria (L.) Maxim și F. hexapetala (L.) Gilib.*, Herba romanica, 1993, 12(12):89 – 96.
13. TODOR I - *Mic atlas de plante din flora RSR*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1968, 164.
14. WICHTL M, ANTON R - *Plantes therapeutiques*, Ed. TEC & DOC, Paris, 1999, 542.
15. xxx – *European Pharmacopoeia, 5 th edition*, Council of Europe, Strassbourg, 2006, 1027;
16. xxx - *Farmacopeea Română ediția a X-a*. Ed. Medicală, București, 1993, 335, 1016, 1053 - 1055, 1063.

Analiza gascromatografică a uleiurilor volatile de *Pelargonium roseum*

Carmen Gâlea¹, Katalin Veres², I. Máthé², C. Csödö¹

¹ Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu Mureș, Disciplina de Farmacognozie și Fitoterapie

² Universitatea de Medicină Szeged-HU, Institutul de Farmacognozie

Adresa de corespondență: Drd. Gâlea Carmen, str. 22 Decembrie 1989 nr. 22/11, Târgu Mureș,

e-mail: galeacarmen@orizont.net

Scopul studiului: Cunoașterea compoziției chimice a uleiurilor volatile de *Pelargonium roseum* provenite din diferite zone geografice.

Material și metodă: Au fost analizate 6 probe de uleiuri volatile de *Pelargonium roseum*, 3 obținute prin cultivare în Grădina de plante medicinale a U.M.F. Târgu Mureș, iar celelalte provenind din China, Franța și Réunion. Metodele folosite pentru analiza fitochimică a uleiurilor volatile au fost GC-FID pentru analiza calitativă, respectiv GC-MS pentru analiza cantitativă. Analiza uleiului volatil prin metoda GC-FID s-a efectuat la aparatul 8590 Series II cu detector FID la următorii parametri: coloana HP 30 m x 0,35 mm x 0,25 μm, temperatura injectorului și a detectorului 250°C, gazul purtător este azotul la o presiune de 50 kPa. În analiza cantitativă gascromatografică s-a cuplat cu spectrometrul de masă Finnigan GCQ, iar gazul purtător este heliu.

Rezultate: În structura uleiurilor volatile au fost puși în evidență un număr de 61 componenți, din care 43 au fost identificați. Citronelolul (39,97-43,67%), este componentul principal din toate uleiurile volatile cu excepția celui obținut în Réunion (20,46%). Citronelolul este urmat de geraniol (2,57-9,66%), linalool (1,41-4,77%), precum și esterii acestora: citronelil format (11,23-13,55%), geraniol format (1,15-2,21%), citronelil butirat (1,01-1,54%) și geraniol tiglat (1,22-1,75%). Trebuie menționat că uleiul volatil de proveniență din Réunion atinge cea mai mare concentrație în geraniol (22,27%). Concentrații însemnate înregistrează și izomentona (4,61-6,14%), 6,9 guadiena (1,06-7,06%) și γ-eudesmolul (3,28-5,62%).

Concluzii: 1. Componenții principali sunt alcooli terpenici: geraniol, citronelol și linalool în stare liberă sau ca esteri. 2. Uleiul volatil din Réunion se remarcă prin concentrații mari de geraniol. 3. Cultivarea speciei *Pelargonium roseum* în condițiile pedoclimatice de la Târgu Mureș, este favorabilă, fapt demonstrat și prin concentrațiile de peste 40% în citronelol.

Cuvinte cheie: Geranium, *Pelargonium roseum*, GC.

Purpose of the study: analysis of the chemical composition of essential oil yielded by *Pelargonium roseum* cultivars from different geographical areas.

Material and method: 6 samples of essential oil produced by *Pelargonium roseum* cultivars were analysed, 3 of which were cultivated in the medicinal plant garden of U.M.F. Tg-Mureș, and the others were brought from China, France and Reunion. Within the framework of phytochemical analysis of the essential oils, GC-FID method was used for the quality analysis and GC-MS method for the quantity analysis. The GC-FID analysis of essential oils was performed using an 8590 Series II apparatus equipped with a FID detector, at the following parameters: the HP column dimensions were 30 m x 0,35 mm x 0,25 μm, the injector and the detector were operated at 250°C, the carrier gas being nitrogen, at 50 kPa pressure. In the quantity analysis, the gas chromatograph was coupled with a Finnigan GCQ mass-spectrometer and the carrier gas was helium.

Results: In the essential oil structure, a number of 61 components were revealed, of which 43 were identified. Citronellol is the main component (39.97-43.67%) in all essential oil samples, except for the sample from Reunion (20.46%). Citronellol is followed by geraniol (2.57-9.66%), linalool (1.41-4.77%) as well as their esters: citronellyl formate (11.23-13.55%), geranyl formate (1.15-2.21%), citronellyl-n-butyrate (1.01-1.54%) and geranyl tiglate (1.22-1.75%). It is to be mentioned that the essential oil yielded by the Reunion cultivar has the highest concentration of geraniol (22.27%). Isomenthone (4.61-6.14%), 6,9-guadiene (1.06-7.06%) and γ-eudesmol (3.28-5.62%) have also significant concentrations.

Conclusions: 1. The main components are terpenic alcohols: geraniol, citronellol and linalool, both as free components and as esters. 2. The essential oil produced by the Reunion cultivar has high concentration of geraniol. 3. The pedoclimatic conditions in Tg-Mureș are favourable for the cultivation of the species *Pelargonium roseum*, which is also demonstrated by citronellol concentrations exceeding 40%.

Key words: Geranium, *Pelargonium roseum*, GC.

Planta luată în studiu, *Pelargonium roseum* Willd este o specie aparținând familiei Geraniaceae, genul *Pelargonium*. Habitatul de origine al speciei *Pelargonium roseum* este reprezentat geografic de sud-vestul Africii, zonă cu precipitații masive în timpul iernii. Începând cu secolul XVIII specia a fost cultivată și în Algeria și Maroc în scopul obținerii uleiului volatil de geraniu pentru casele de parfumerie franțuzești [3,14].

Spre sfârșitul secolului XVIII planta a fost aclimatizată și în insula Reunion, care a devenit astăzi cel mai mare producător de ulei volatil de geraniu comercializat și sub denumirea de geraniu de Bourbon [16]. Având în vedere calitățile deosebite ale uleiului volatil de geraniu, folosit ca înlocuitor al uleiului volatil de trandafir, cultivarea speciei s-a realizat ulterior și în: China, Algeria, sudul Franței, Ucraina.

Prima parte a acestui studiu s-a concentrat asupra cultivării speciei *Pelargonium roseum* Willd la Târgu Mureș în perioada 2003-2005. Obținerea uleiului volatil de geraniu s-a realizat prin distilare, conform FR. X, a tulpinilor și frunzelor de *Pelargonium roseum* [5,18].

A doua etapă a studiului se referă la analiza gazcromatografică a uleiului volatil de geraniu obținut la Târgu Mureș, respectiv ale uleiurilor volatile de geraniu provenite din China, Franța și Reunion, zone propice dezvoltării plantei.

În funcție de varietatea cultivată cât și de influența factorilor pedoclimatici, se înregistrează diferențe substanțiale în ceea ce privește calitatea uleiului volatil de geraniu [4,6].

Scopul acestui studiu a fost compararea calității uleiului volatil de geraniu obținut la Târgu Mureș și a valorilor constituentilor principali ai uleiului volatil de geraniu obținut de noi cu a celorlalte uleiuri de geraniu din China, Franța și Reunion.

MATERIAL ȘI METODĂ

Metodele folosite pentru analiza fitochimică a uleiurilor volatile de geraniu au fost gazcromatografia cu detector de ionizare în flacără (GC-FID) pentru analiza calitativă, respectiv gazcromatografia cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), pentru analiza cantitativă [10,11].

Au fost analizate 6 probe de uleiuri volatile de *Pelargonium roseum*: 3 obținute prin cultivare în Grădina de plante medicinale a U.M.F. Târgu Mureș, iar celelalte provenind din China, Franța și Reunion. Uleiurile volatile de geraniu au fost ferite de influențele mediului extern, fiind păstrate în fiole închise, la frigider (4°C).

Analizele gazcromatografice au fost efectuate la Institutul de Farmacognozie din cadrul Universității de Medicină Szeged prin amabilitatea domnului profesor Máthé I..

La analiza uleiurilor volatile de geraniu prin metoda GC-MS s-a folosit un aparat de tip 8590 Series II cu detector de ionizare în flacără la următorii parametri: coloana HP 30m x 0,35 mm x 0,25 μ m, temperatura injectorului și a detectorului 250°C, gazul purtător este azotul la o presiune de 50 kPa (Figura 1).

Pentru determinarea cantitativă, gazcromatograful s-a cuplat cu spectrometrul de masă Finnigan GCQ, iar gazul purtător folosit a fost heliu (Figura 2).

Datele au fost integrate și analizate cu ajutorul programului de calculator Chrom Card și a bibliotecii de spectre Wiley. Analiza calitativă se realizează pe baza indicelui Kováts, timpilor de retenție și a suprapunerii spectrelor cu cele aparținând bibliotecii de spectre Wiley, iar analiza cantitativă s-a realizat pe baza metodei normării ariilor, în lipsa unui standard intern [13,15].

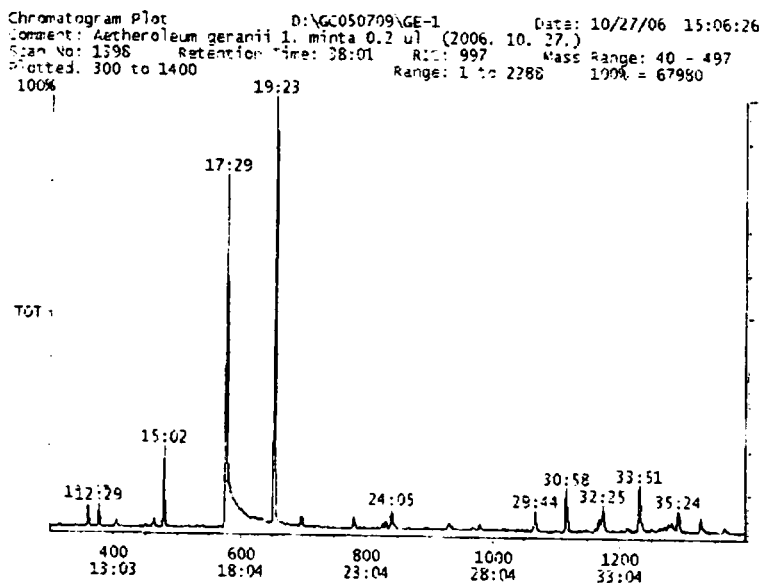


Figura 1. GC -FID Analiza uleiului volatil de *Pelargonium roseum*

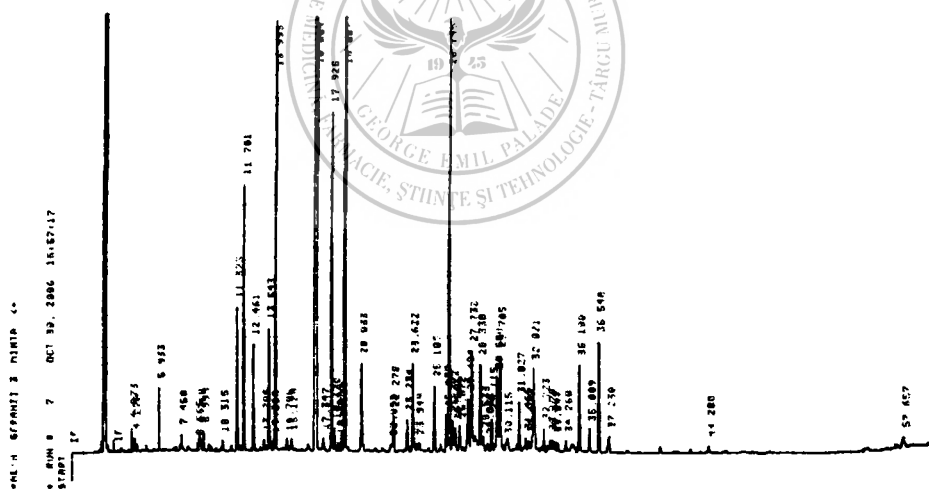


Figura 2. GC -MS Analiza uleiului volatil de *Pelargonium roseum*

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În urma analizei calitative a celor 6 tipuri de uleiuri volatile de geraniu au fost puși în evidență un număr de 61 componenți, dintre care 43 au fost identificați.

Componentii principali din uleiurile volatile de geraniu sunt citrionelul, geraniolul și linaloolul în stare liberă sau sub formă de esteri (Figura 3 și Tabelul I).

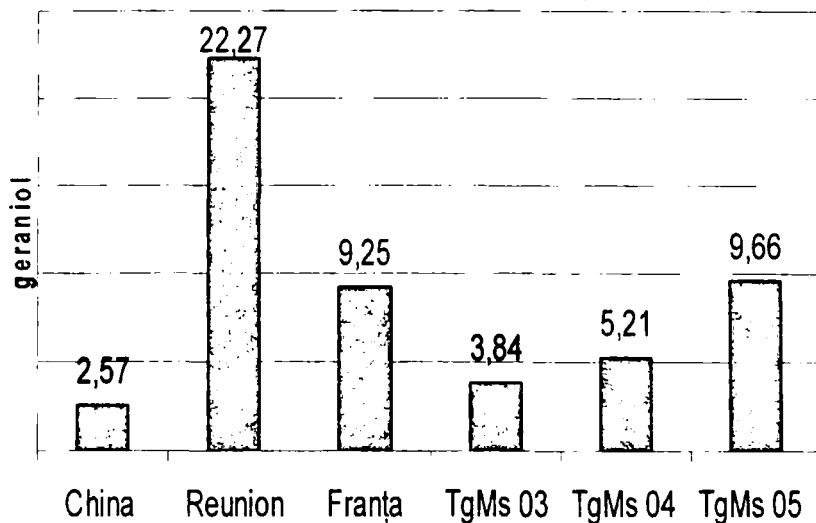


Figura 3. Concentrația în geraniol a uleiurilor volatile studiate

Tabelul I. Compoziția chimică a uleiurilor volatile de *Pelargonium roseum*

Component %	Ind. Kováts	Pelargonium roseum					
		China	Reunion	Franța	TgMs 03	TgMs 04	TgMs 05
trans-3-hexanol	858			0,14		0,28	
α -pinen	936-940		0,74	0,37	0,40	0,13	0,47
β -pinen	992-993		0,43		0,12		0,18
limonen	1034-1035		0,29	0,29	0,28		
cis-ocimen	1036-1039		0,24		0,17		0,19
trans- ocimen	1048-1049		0,21				
cis-linalool oxid	1077-1078	0,160	0,14		0,12	0,23	
trans-linalool oxid	1094-1095	0,150	0,11			3,78	
linalool	1106-1108	1,85	4,77	3,85	1,41	1,15	3,09
cis-rose oxid	1116-1118	1,67	0,74	1,40	2,67	0,49	1,15
trans-rose oxid	1132-1134	0,88	0,32	0,59	1,11	0,67	0,55
L-menthona	1168-1169	1,10	3,03	2,29	1,42	0,67	0,32
iso-menthona	1178-1179	5,58	5,96	5,46	4,61	6,38	6,14
α -terpineol	1208-1209	0,13	0,29	0,29	0,12	0,32	
citrionelol	1238-1240	42,02	20,46	39,97	42,68	43,21	43,67
geraniol	1262-1266	2,57	22,27	9,25	3,84	5,21	9,66
citrioneli formiat	1280-1283	13,14	7,06	11,23	13,55	12,99	11,57

geraniil formiat	1305-1308	0,80	7,28	2,21	1,15	1,49	1,64
α -cubebena	1352	1,50				0,50	
citronelil acetat	1355-1356	0,71	0,30	0,35	0,49	0,52	0,32
α -copaena	1381-1382	0,31	0,33	0,37	0,40	0,32	0,32
geraniil acetat	1385-1386	0,47				0,28	
β -buorbonen	1390-1391	1,62	1,67	1,35	1,17	1,57	1,54
β -elemenen	1394-1396	0,87				0,29	
β -cariophilena	1428-1429		1,13	1,24	0,86		0,45
citronelil propionat	1445-1446		0,63	0,47	0,48		
6,9 guaiadiena	1449-1450	6,67	6,94	7,06			
Seycelena	1457		0,29	0,40	0,30		
allo-aromadendrena	1469-1470	0,50	1,53	0,29	0,34		0,68
geraniil propanoat	1476-1477		1,03	1,04	0,95		1,71
Germacren D	1483-1484		0,26	0,90	1,40		
viridiflorena	1499-1500				1,29		0,91
trans- β -guaiena	1507-1508			1,09	0,23		
Germacren A	1512-1514		0,57		0,39	0,22	0,26
γ -cadinen	1523-1524					0,55	
δ -cadinen	1526-1527	0,93	0,73	0,37	1,04	1,00	0,55
citronelil butirat	1530-1531	1,54	0,43	0,96	1,12	0,96	0,74
geraniil butirat	1562-1563	1,25	1,25	0,79	0,57	1,00	1,16
Cariophilen oxid	1595-1597	0,81					
feniletil tiglat	1600-1601	2,18	1,39	1,27	1,55	2,37	1,75
γ -eudesmol	1640				3,28	4,42	5,62
citronelil tiglat	1670				1,92	1,06	0,43
geraniil tiglat	1706	1,37	1,75	1,36	1,22	1,29	1,44

Citronelolul (39,97-43,67%) este componentul principal din toate uleiurile volatile de geraniu, cu excepția celui obținut în Réunion (20,46%). Atingând concentrații atât de mari, citronelolul este izolat în China în urma unor operații de saponificare și recristalizare din uleiurile volatile de geraniu. Acest component se distinge prin activitatea sa antibacteriană, uleiul volatil de geraniu având efect antibacterian, demonstrat asupra *Sacharomyces ludwigii* și *Salmonella enteritidis* [1,2].

Geraniolul (2,57 - 9,66%) reprezintă componentul esențial al uleiului volatil de geraniu din Reunion, așa numitul ulei de geraniu "Bourbon", atingând concentrația de 22,27% (fig.2). Concentrațiile crescute în geraniol, respectiv în esterii acestuia, determină uleiuri volatile de geraniu de calitate superioară [7,16]. Stabilitatea scăzută a geraniolului se poate observa și urmărind variația concentrațiilor dintre ulei volatil proaspăt (2005) și cel mai vechi obținut (2003).

Linaloolul (1,41 - 4,77%) este un constituent foarte important în parfumerie fiind folosit în compoziții florale și fructate. E compatibil cu mirosul de ambră, pe care îl împropătează.

Concentrații însemnate înregistrează izomentona (4,61-6,38%), 6,9 guadiena (1,06-7,06%) și eudesmolul (3,28-5,62%).

Un rol deosebit de important în odorizarea uleiului volatil de geraniu îl determină esterii monoterpenelor mai sus menționate: citronelil formiat (7,06-13,55%, geranil formiat (0,80-1,49%), citronelil acetat (0,30-0,71%), citronelil butirat (0,43-1,54%), geranil butirat (0,57-1,25%), citronelil tiglat (0,43-1,92%), geranil tiglat (1,29-1,44%).

Uleiul de geraniu este folosit ca înlocuitor al uleiului de trandafir (*Rosae aetheroleum*), datorită unor constituenți comuni: geraniol, fenil etil tiglat și oxizii de roze (cis și trans). Concentrațiile în cis-roze oxid (0,74-2,67%), respectiv trans-roze oxid (0,32-1,11%), ating valori mai mari decât în orice tip de ulei volatil, în cazul uleiului volatil de geraniu [8,9]. Ținând cont de aceste argumente, uleiul de geraniu poate înlocui cu succes uleiul de trandafir în parfumerie și industria cosmetică, determinând obținerea unor produse cu prețuri de cost mult mai mici.

În urme s-au mai identificat și hidrocarburi sequiterpenice: β bourbonene (1,17-1,62%), germacrene, cadinene (0,55-1,01%).

CONCLUZII

Analiza fitochimică a uleiului volatil de geraniu obținut prin cultivarea specie *Pelargonium roseum* Willd la Târgu Mureș pune în evidență citronelolul, geraniolul și linaloolul ca fiind constituenți principali.

Calitativ din cei 61 de componenți identificați în uleiurile volatile de geraniu 19 componenți se regăsesc în toate cele 6 probe de uleiuri volatile de *Pelargonium roseum*, atingând concentrații între 84,70-87,55%.

Uleiul de geraniu obținut la Târgu Mureș prezintă compoziție asemănătoare cu a celorlalte uleiuri volatile de *Pelargonium roseum* atât din punct de vedere calitativ cât și cantitativ în cazul compușilor semnificativi.

Componenții specifici, denumiți și compuși cheie, folosiți pentru diferențierea tipurilor de ulei volatil, sunt 6,9 guadiena (în urme) și epi- ζ eudesmolul (3,28-5,62%), apropiate calitatea uleiului volatil obținut de noi cu cel nord african, obținut în Egipt.

Calitatea superioară a uleiului de geraniu din Réunion a fost probată și prin aceste analize gazcromatografice, în acest caz concentrația de geraniol, respectiv esterii ai geraniolului atingând concentrațiile cele mai mari.

Condițiile pedoclimatice de la Târgu Mureș sunt favorabile cultivării speciei *Pelargonium roseum*, fapt demonstrat pe baza calității uleiului volatil de geraniu analizat gazcromatografic

BIBLIOGRAFIE

1. BALCHIN LIS M, BUCHBAUER G, HIRTENLEHNER T et al.- *Antimicrobial activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system*, Letters in Applied Microbiology, 1998, 27:207-210.
2. BALCHIN LIS M, HART LS - *A pharmacological appraisal of the folk medicinal usage of Pelargonium grossularoides and Erodium cicutarium*, Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 1994, 3:41-48.
3. BALCHIN LIS M - *Essential oils from different Pelargonium species and cultivars: their chemical composition (using GC, GC/MS) and appearance of trichomes (under EM), Geranium and Pelargonium*, Ed. Taylor & Francis, London, 2002, 100-105.
4. FLETCHER R - *New Crops Potential of Queensland - grown Geranium (Pelargonium hybrid) for Essential Oil*, The Australian New crops Newsletter, 1999, 11:14-19.

5. GĂLEA CI - *Cultivarea speciei Pelargonium roseum Willd la Târgu Mureș*, Marisia, 2006, XXVIII, fascicola 6:16-21.
6. GAURI S, SUCHITRA B, RITIKA G - *Composition of the Essential Oil of a New Isomenthone - Rich Variant of Geranium obtained from Geraniol - Rich Cultivar of Pelargonium Species*, Journal of Essential Oil Research, 2004, 3:19-22.
7. GAUVIN A, LECOMTE H, SMADJA J - *Comparative investigation of the essential oil of two scented geranium (Pelargonium spp.) cultivars grown on Reunion Island*, Flavour and Fragrance Journal, 2004, 19:455-460.
8. GOMES PB, MATA VG, RODRIGUES A - *Characterization of Portuguese - Grown Geranium Oil (Pelargonium sp.)*, Journal of Essential Oil Research, 2004, 9-10:44-48.
9. GRIGORESCU E, SOMMER L - *Studiul farmacognostic al plantei Geranium phaeum*, Farmacia, 1957, 1:29-40.
10. HÉTHELY BE, KORÁNY K, DOMOKOS J - *Kanuka és monuka illóolajok GC, GC/MS vizsgálata*, Olaj, Szappan, Kozmetika, 2001, 50:149-157.
11. KAYSER O, LATTÉ K, KOLODZIEJ H et al - *Composition of the essential oils of Pelargonium sidoides DC. and Pelargonium reniforme Curt*, Flavour and Fragrance Journal, 1998, 13, Suppl.3:194-200.
12. MÖLLENBECK S, KÖNIG T, SCHREIRER P et al - *Chemical composition and analyses of enantiomers of essential oils from Madagascar*, Flavour and Fragrance Journal, 1997, 12:63-69.
13. NEETU J, AGGARWAL K, SYAMASUNDAR V, et.al - *Essential oil composition of geranium (Pelargonium sp.) from the plains of Northern India*, Flavour and Fragrance Journal, 2001, 16, Suppl.1:44-46.
14. RĂDOIAȘ G, BOSILCOV A, BĂTIU I - *Uleiuri volatile, Odorante naturale în parfumeria modernă*, Casa Cărții de Știință Cluj-Napoca, 2005, 244-250.
15. SCHELLIE AR, MARRIOT P - *Comprehensive two - dimensional gas chromatography - mass spectrometry analysis of Pelargonium graveolens essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry*, The Analyst, 2003, 128:879-883.
16. VERNIN GA, CHRAIB S, VERNIN GMF et.al - *Geranium (Pelargonium sp.) Essential Oil from Reunion. Minor Compounds: Acids, Phenols, Pyridines*, Journal of Essential Oil Research, 2004, 1-2:58-61.
17. WÜST M, MOSANDL A - *Important chiral monoterpenoid ethers in flavours and essential oils - enantioselective analysis and biogenesis*, European Food Research and Technology, 2004, 209:3-11.
18. XXX *Farmacopeea Română*, ediția a X-a, Ed.Medicală, București, 1993, 97-98

**Conținutul în polifenoli al frunzelor și tuplinilor de
Pelargonium roseum Willd. recoltate din Grădina de plante medicinale a
U.M.F. Târgu Mureș**

Carmen Gălea¹, Csedő C.¹, Vlase L.²

¹Disciplina de farmacognozie-fitoterapie, U.M.F. Târgu Mureș

²Disciplina de tehnologie și biofarmacie, U.M.F. Cluj-Napoca

Adresa de corespondență: Drd. Gălea Carmen, str. 22 Decembrie 1989 nr. 22/11, Târgu Mureș,

e-mail: galeacarmen@orizont.net

The study is focused on the analysis of the polyphenolic compounds in the alcoholic extract of stalks and leaves of Pelargonium roseum. The method used in the analysis of the polyphenolic compounds of the vegetal extract was based on high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. This method can be applied both to qualitative (18 compounds) and quantitative (14 compounds) analysis. The qualitative analysis can be achieved both through MS detection and in UV, whereas the quantitative determination was accomplished through UV detection in the interval between concentration values of 0.5-5 µg/ml.

Taking into account the fact that in chromatography two pairs of substances were incompletely separated (kahphtaric acid-gentisic acid, caffeic acid-chlorogenic acid, respectively), only a qualitative determination, based on MS information, was accomplished for these compounds.

Two samples from each alcoholic extract were analysed in parallel, one of them as such and the other one in the hydrolised state. The reason for which the hydrolisis was made is the presence of flavonic aglycones in the bonded form (glycosides, esters) and of some polyphenol-carboxylic acids. Acid hydrolisis leads to the release of these components from the bonded form and may offer more information as to the chemical polyphenolic composition of the product under examination.

From the qualitative point of view, we managed to identify 11 polyphenolic compounds in the alcoholic extract of both leaves and stalks of Pelargonium roseum: kahphtaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, paracoumaric acid, pterulic acid, hyperosid, isoquercetin, rutosid, myricethol, quercethol, kaempferol.

The concentration of polyphenols in the non-hydrolised extract of Pelargonium roseum leaves reaches values about three times bigger than those determined in its stalks: hyperosid (54.44 µg/ml: 19.12 µg/ml), isoquercetin (66.57 µg/ml: 16.83 µg/ml), rutosid (19.55 µg/ml: 8.92 µg/ml), quercethol (13.14 µg/ml : 3.29 µg/ml), kaempferol (3.82 µg/ml: 1.01 µg/ml).

After hydrolisis, in extracts of both leaves and stalks the following compounds can be identified: paracoumaric acid (2.66 µg/ml: 2.45 µg/ml), pterulic acid (4.45 µg/ml: 0.92 µg/ml) and myricethol (36.61 µg/ml: 27.95 µg/ml). Similarly, an increase of about four times in the concentration of quercethol and kaempferol can be recorded after hydrolisis, as the result of their release from the bonded forms.

The present study encourages research made in order to obtain products of dermatological utilization from parts of Pelargonium roseum, taking into account the presence of rutosid herein having significant concentration values, as well as the content of citronellol (acting as bactericide) in the structure of the geranium essential oil.

Key-words: *Pelargonium roseum*, polyphenolic compounds, HPLC.

Pelargonium roseum Willd (mușcata creată, fig.1) este o specie originară din Africa de Sud, cunoscută la noi mai mult ca plantă ornamentală.

Specia cultivată la Târgu Mureș provine de la Stațiunea Experimentală Cluj-Napoca și a fost obținută prin ameliorare de Péter Béla. Experiențele de cultivare au fost realizate în perioada 2003-2007, dar au la bază o serie de studii începute de profesorul E. Kopp încă din 1960.



Figura1. *Pelargonium roseum* Willd

În regiunile calde (Réunion, India, Algeria, sudul Franței) unde a fost introdusă în cultură, planta se dezvoltă foarte bine și este menținută 6-8 ani în culturi perene. La noi, datorită iernilor aspre, poate fi cultivată doar în cultură anuală cu înmulțire prin butași.

Speciile de *Pelargonium* sunt cultivate încă din 1850 în scopul obținerii uleiului volatil denumit ulei de geraniu, folosit în industria parfumeriei. Uleiul de geraniu este obținut prin hidrodistilarea frunzelor mai multor specii din genul *Pelargonium* și anume: *Pelargonium graveolens*, *Pelargonium capitatum* și *Pelargonium roseum*. Astfel, analiza genului *Pelargonium* și a speciei *Pelargonium roseum* s-a concentrat mai mult asupra compoziției chimice a uleiului volatil.

Referințele cu privire la conținutul în polifenoli din *Pelargonium roseum* sunt puține și disparate ceea ce ne-a încurajat să inițiem acest studiu.

Studiile fitochimice ale unor specii din genul *Pelargonium* și Hoarea au pus în evidență prezența cvercetinei și miricetinei (Bate-Smith, 1973). Studii mai recente (1997) ale lui Albers și Dreyer asupra *Pelargonium dichondrifolium* și *Pelargonium tetragonum* au pus în evidență alte două flavone: luteolina și apigenina. O analiză mai cuprinzătoare a 58 de specii din genul *Pelargonium*, întreprinsă de Williams (2000), a confirmat că flavonolii sunt principalii constituenți vacuolari de natură flavinică ai acestui gen.

Rezultatele sumare cu privire la conținutul în polifenoli ai speciei *Pelargonium roseum* precum și încercarea de a utiliza această plantă în fitoterapie au determinat acest studiu.

MATERIAL ȘI METODE

Materialul supus studiului a fost recoltat la 20.08.2006 din Grădina de plante medicinale a U.M.F. Târgu Mureș. Am preparat apoi din frunze și tulpini tincturi prin macerare conform FR X. Au fost analizate în paralel câte două probe din fiecare extract vegetal: una ca atare, iar cealaltă hidrolizată. Motivul pentru care s-a realizat hidroliza este faptul că, în general agliconii flavonici sau acizii polifenolcarboxilici nu se află în stare liberă, ci legați (glicozide, esteri). Realizarea unei hidrolize acide va duce la eliberarea

acestor compuși din forma legată, aducând astfel mai multe informații privitoare la compoziția chimică în polifenoli a produsului vegetal studiat.

Pentru analiza compușilor polifenolici din tincturile de *Pelargonium roseum* s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (LC/MS).

Metoda de analiză utilizată se bazează pe o metodă HPLC publicată în literatura de specialitate, la care s-au adus unele modificări. Analiza calitativă a pus în evidență 18 compuși, din care 14 compuși au fost analizați și sub aspect cantitativ. Analiza calitativă s-a realizat prin detecție UV și MS și cea cantitativă s-a realizat prin detecție UV.

Am folosit 18 standarde de compuși polifenolici: acid caftaric, acid gentisic, acid cafeic, acid clorogenic, acid para cumaric, acid ferulic, acid sinapic, hiperozid, izocvercetin, rutozid, miricetol, fisetina, cvercetina, cvercetol, patuletina, kâmpferol și apigenina (fig.2).

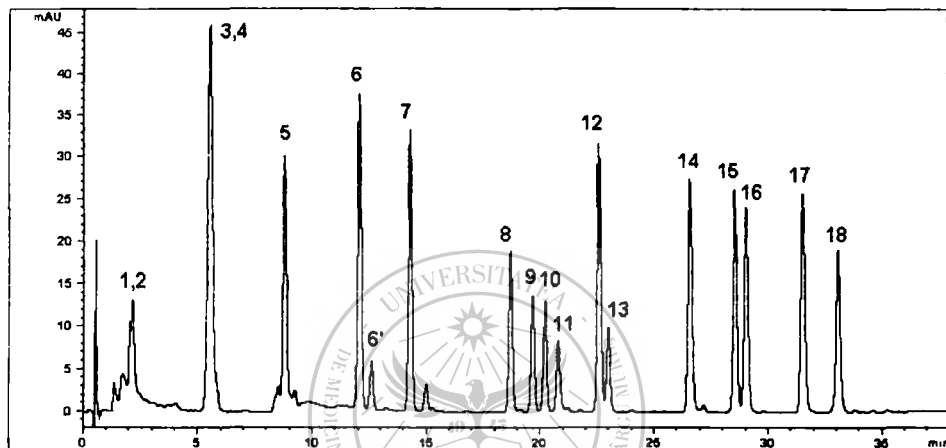


Figura 2. Cromatograma unui amestec de 18 polifenoli, detecție UV la 330 și 370 nm, notațiile conform tabelului 1

În UV acizii polifenolicarboxilici au fost detectați la lungimea de undă de 330 nm, iar flavonoidele și agliconii acestora la 370 nm. Pentru determinare cantitativă s-a realizat o curbă de calibrare pentru fiecare compus în intervalul de concentrații 0,5 - 5 µg/ml (tabelul 1).

Tabelul I. Curba de calibrare pentru cele 18 standarde

Nr.	Nume compus	Timp retenție (min)	Ecuatie dreapta calibrare
1	acid caftaric	2.10	Calitativ
2	acid gentisic	2.15	Calitativ
3	acid cafeic	5.6	Calitativ
4	acid clorogenic	5.6	Calitativ
5	acid p-cumaric	8.7	$A = - 0.325 + 33.23 x$
6	acid ferulic	12.2	$A = - 1.016 + 39.55 x$
7	acid sinapic	14.3	$A = - 0.236 + 37.10 x$
8	hiperozid	18.6	$A = 0.107 + 19.29 x$

9	izocvercitin	19.6	$A = -0.273 + 12.97 x$
10	rutin	20.2	$A = 0.226 + 13.47 x$
11	miricetol	20.7	$A = -0.544 + 26.45 x$
12	fisetina	22.6	$A = 0.241 + 19.19 x$
13	cvercitrin	23.0	$A = 0.047 + 10.69 x$
14	cvercetol	26.8	$A = -1.152 + 36.32 x$
15	patulelina	28.7	$A = -0.429 + 31.44 x$
16	luteolina	29.1	$A = -0.760 + 28.97 x$
17	kämpferol	31.6	$A = -1.270 + 30.15 x$
18	apigenina	33.1	$A = -0.908 + 20.40 x$

Deoarece în condițiile cromatografice utilizate există două perechi de substanțe incomplet separate (acid caftaric - acid gentisic respectiv acid cafeic - acid clorogenic), pentru acești compuși s-a realizat doar o determinare calitativă bazată pe informații MS.

Analiza polifenolilor prin detecție MS se bazează pe prezența unei funcții fenolice în moleculă (respectiv a unui carboxil în cazul acizilor polifenolici). Astfel toți compușii pot pierde un proton acid, transformându-se în ioni negativi de tipul M-H și pot fi în consecință analizați prin ionizare negativă.

În cazul probelor de extracte vegetale, compușii se pot identifica analizând spectrele MS. Inițial se verifică masa moleculară - 1 [M-H], iar dacă aceasta corespunde, se compară spectrul de masă al compusului necunoscut cu spectrul de masă al standardelor. În cazul în care ionii din spectrul de masă sunt aceiași, se poate considera identificat compusul respectiv.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza HPLC ne furnizează date referitoare la identificarea, cât și dozarea compușilor polifenolici din structura plantei *Pelargonium roseum*.

Metoda folosită a permis identificarea a 11 compuși polifenolici atât în tinctura de frunze cât și în cea obținută din tulpinile de *Pelargonium roseum*. Aceștia sunt: acid caftaric, acid cafeic, acid clorogenic, acid para cumaric, acid ferulic, hiperozid, izocvercetin, rutozid, miricetol, cvercetol, kämpferol.

Tabelul II. Polifenoli dozați în tinctura nehidrolizată de *Pelargonium roseum*

Nr. crt.	Compus polifenolic	Conc. în T-ra frunze μg/ml	Conc. în T-ra tulpini pg/ml
	hiperozid	54,44	19,12
	izocvercetina	66,57	16,83
	rutozid	19,55	8,92
	cvercetol	13,14	3,29
	kämpferol	3,82	1,01

Din punct de vedere cantitativ, metoda permite determinarea compușilor a căror concentrații depășesc valoarea de 0,5 μg/ml. Având în vedere această explicație, se observă o scădere a numărului compușilor polifenolici dozați în tinctura din frunze, respectiv tulpini de *Pelargonium roseum* (tabelul 2).

După hidroliză, atât din tincturile obținute din frunze cât și din tulpini, se poate doza acidul para cumaric, acidul ferulic și miricetolul. Se poate observa de asemenea o creștere de circa patru ori a concentrației de cvercetol și kămpferol după hidroliză, în urma eliberării acestora din formele legate (tabelul 3).

Tabelul III. Polifenoli dozați în tinctura hidrolizată de *Pelargonium roseum*

Nr. crt.	Compus polifenolic	Conc. în T-ra frunze μg/ml	Conc. în T-ra tulpini μg/ml
1.	acid p.cumaric	2,66	2,45
2.	ac.ferulic	4,45	0,92
3.	miricetol	36,61	27,95
4.	cvercetol	75,42	19,38
5.	kămpferol	13,64	4,32

Miricetolul, în forma nehidrolizată nu a putut fi identificat în tinctura obținută din tulpinile și frunzele de *Pelargonium roseum*, însă în forma hidrolizată poate fi determinat și cantitativ. Kămpferolul, compus polifenolic dozat și în forma nehidrolizată, înregistrează după hidroliză concentrații de circa trei ori mai mari (tabelul 4).

Tabelul IV. Concentrația de cvercetol și kămpferol înainte și după hidroliză

Compus polifenolic	Conc. în T-ra frunze f.h. μg/ml	Conc. în T-ra frunze d.h. μg/ml	Conc. în T-ra tulpini f.h. μg/ml	Conc. în T-ra tulpini d.h. μg/ml
cvercetol	13,49	75,42	3,29	19,38
kămpferol	3,82	13,64	1,01	4,32

f.h. = înainte de hidroliză

d.h. = după hidroliză

CONCLUZII

Analiza HPLC a permis identificarea unui număr de 11 compuși polifenolici în tincturile obținute din tulpini și frunze de *Pelargonium roseum*. Principalii compuși polifenolici înaintea hidrolizei, sunt hiperzoidul și rutozidul, cărora li se adaugă în concentrații mai mici cvercetolul și kămpferolul. Hidroliza oferă posibilitatea de a identifica și cuantifica a altor trei compuși: acid para cumaric, acid ferulic și miricetol.

Acțiunea antiinflamatoare și antiedematoasă a rutozidei, compus polifenolic dozat din tincturi, căreia i se adaugă și acțiunea bactericidă a citronelolului (concentrații peste 40%), dozat din uleiurile volatile obținute la Târgu Mureș, încurajează prepararea unor produse farmaceutice de uz dermatologic având la bază extracte vegetale de *Pelargonium roseum*.

BIBLIOGRAFIE

- BALABAN AT, BANCUI M, POGANY I - *Aplicații ale metodelor fizice în chimia organică*, Ed. Științifică și Enciclopedică, București, 1983, 63-71.
- BALCHIN LIS M, - *Geranium and Pelargonium*, Ed. Taylor & Francis, London,, 2002, 118 – 216.

3. BATE-SMITH EC - *Ellagitannin content of leaves of Geranium species*, Phytochemistry, 1972, 41 - 48.
4. BOJOR O, POPESCU O - *Fitoterapia tradițională și modernă*, Ed. Fiat Lux, București, 2003, 447 - 452.
5. BUCUR L, VLASE L, FODOREA C, ISTUDOR V - *Analiza HPLC a compușilor polifenolici din extractele obținute din flori și ramuri tinere de Elagnus angustifolia L.*, Revista de Chimie, 2006, 57, (2):189 - 192
6. CIUCANU I - *Cromatografia de gaze cu coloane capitare*, Ed. Academiei Române, București, 1990, 146 - 158
7. CIULEI I, GRIGORESCU E, STĂNESCU U - *Plante medicinale. Fitochimie și Fitoterapie*, Ed. Medicală, București, 1993, vol.I și II:144 - 155, 264 - 271.
8. CSEDŐ C - *Plantele medicinale și condimentare din județul Harghita*, Ed. Tipografia Târgu Mureș, 1980, 456 - 458
9. DEHELEAN CA, VLASE L, PEEV C - *Comparative analysis of polyphenols content from birch tree foliar buds and leaves*, Revista de Chimie, 2006, 57, (8):162 - 166
10. FODOREA SC, VLASE L, LEUCUȚA SE, TĂMAȘ M - *Cercetări fitochimice asupra speciei Geranium palustre Torner Cent. (Geraniaceae)*, Clujul Medical, 2003, LXXVI, 4:923 - 926.
11. GĂLEA C - *Cultivarea speciei Pelargonium roseum Willd la Tîrgu Mureș*, Marisia - studii și materiale, 2006, fascicola 6, p.16 - 21.
12. MABRY TJ, MARKHAM KR, THOMAS MB - *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin - Hidelberg - NY, 1970, 194 - 200.
13. TĂMAȘ M - *Cercetări asupra flavonelor din Prunus spinosa L.*, Farmacia, 1985, XXXIII, (3):181 - 185.
14. VLASE L, RADU L, FODOREA C, LEUCUȚA S, GOCAN S - *Determination of Phenolic Compounds from Geranium sanguineum by HPLC*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005, 28, (19):3109 - 3117.
15. WAGNER H, BLADT S - *Plant Drug Analysis*, Springer Verlag Berlin - Heidelberg, 1996, 121 - 129, 132 - 149.
16. WILLIAMS CA, NEWMAN M, GIBBY M - *The application of legal phenolic evidence for systematic studies within the genus Pelargonium (Geraniaceae)*, Biochem. Syst. Ecol., 2000, 28:119 - 192.
17. ****Farmacopeea Română* - Ed. Medicală, București, 1993, ediția a X-a.

Contribuții la cunoașterea etnomedicinei din partea sud-vestică a munților Călimanului

Echim Ilie¹, Brânzaniuc Klara², Csedő Carol²

¹Farmacia „Ardealul” Piatra Neamț

²Universitatea de Medicină și Farmacie Tg. Mureș

Adresa de contact: csedo@rdslink.ro

Lucrarea cuprinde preocupările autorilor privind adunarea și redarea unor cunoștințe etnoterapeutice a locuitorilor părții sud-vestice a munților Călimanului, muncă ce a necesitat numeroase deplasări pe teren în cele peste 20 de sate în perioada anilor 1979-1983 și 1998-2002.

După aprecierile noastre sătenii din această parte a masivului Călimanului cunosc aproape 300 de specii de plante medicinale, dintre care pe aproape 200 le folosesc în scopuri terapeutice. Dintre acestea amintim câteva. Cu frunzele de arin negru (*Alnus glutinosa* Gaertn.), mărlul lupului (*Aristolachia clematitis* L.), cu tulpinile fertile de la coada calului (*Equisetum arvense* L.) se face fiertură cu care se fac băi în reumatism și respectiv în gută. În afecțiuni ginecologice, respectiv în infecții cu *Trichomonas vaginalis* și *Candida albicans* se fac spălături locale și se bea decoctul din plante ca sânziene albe (*Galium molugo* L.), bujor (*Paeonia officinalis* L.), busuioc sălbatic (*Prunella alba* L.) etc. În astm se bea decoctul din partea aeriană de pelin bun (*Artemisia absinthium* L.), iar din partea aeriană de varga ciobanului (*Dipsacus silvester* Huds.) se face fiertură ce se bea în „tuse măgărească”. Din partea aeriană de cânepa codrului (*Eupatorium cannabinum* L.) în amestec cu ¼ rădăcină de rostopască (*Chelidonium majus* L.) se face un decoct ce se bea în afecțiunile ficatului, în așa numita „gălbănare neagră”. Decoctul din partea aeriană de rotungioară (*Glechoma hederacea* L.) se folosește în afecțiuni externe în terapia rănilor greu vindecabile, la oameni și animale. Precizăm că multe din plantele amintite, folosite de localnicii zonei studiate la tratarea afecțiunilor umane, se folosesc și în afecțiunile similare ale animalelor.

This study comprises the authors' preoccupation regarding the compilation and presentation of some ethnotherapeutic knowledge of the inhabitants of the south – west part of the Caliman Mountains, requiring a lot of field-work in more than 20 villages during 1979 – 1983 and 1998 – 2002.

*We estimated that the villagers of this part of the Caliman Mountains know around 300 species of medicinal plants and use approximately 200 for therapeutic purposes. For example the leaves of black alder (*Alnus glutinosa* Gaertn.), birthwort (*Aristolochia clematitis* L.) and the fertile stems of the horse-tail (*Equisetum arvense* L.) can be used for the preparation of brews for bathing in case of reumatism and apoplexy. In case of gynecological affections, infections with *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* can be treated with local bathing and drinking the decoction of plants like: hedge bedstraw (*Galium molugo* L.), common peony (*Paeonia officinalis* L.), cutleaf selfheal (*Prunella alba* L.), etc. The decoction made of the aerial parts of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) is drunk in case of asthma and a brew is prepared from the aerial parts of wild teasel (*Dipsacus silvester* Huds.), which is drunk to treat pertussis (Whooping cough). The decoction made out of the aerial parts of hemp-agrimony (*Eupatorium cannabinum* L.) mixed with ¼ of greater celandine (*Chelidonium majus* L.) is drunk when the liver is affected by the so called black jaundice. The decoction made out of the aerial parts of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) are used for external affections in the therapy of slow healing wounds in humans as well as in animals. We would like to point out the fact that most of the above mentioned plants used for the treatment of human diseases are also used for similar affections in animals by the inhabitants of the studied region.*

Valorificarea plantelor medicinale, din flora spontană, capătă pe an ce trece o importanță din ce în ce mai mare, întrucât întoarcerea la medicina naturalistă, devine o realitate, iar necesitățile de material vegetal utilizat în scopuri terapeutice sunt tot mai mari. Partea sud-vestică a munților Călimani, prin relieful său variat oferă o floră medicinală bogată, iar locuitorii satelor din această parte a țării cuprinzând un număr de peste 20 de

sate, sunt buni cunoscători ai plantelor de leac, cunoștințe ce s-au păstrat și transmis prin viu grai din generație în generație. Culegerea datelor de folclor medical din această zonă am efectuat-o prin deplasări pe teren în perioada anilor 1979-1983 și 1998-2002., scopul acestei munci fiind culegerea de date privind numărul plantelor medicinale cunoscute de săteni și a modului în care aceștia le folosesc în scopuri terapeutice, cunoștințe ce pot fi în multe cazuri informații primare valoroase, adevărate puncte de plecare pentru cercetări viitoare în vederea introducerii în terapia modernă a unor noi sorturi de medicamente de origine vegetală.

Delimitarea terenului. Partea sudică a bazinului Călimani, este jalonată de valea transversală a Mureșului, respectiv defileul Toplița-Deda, care separă Călimanul de munții Gurghiului, parte sudică formată dintr-o serie de bazinele presărate cu așezări umane. Limita vestică începe la nord de dealul Tănase (Bârgău) trece pe la vest de vârfurile Pârjoliturii (1143m), Ragliței (1149m), Pleașa (1136m), Bistrei (1112m), la sud de dealul Vătăvii până la valea Bistrei, pe care o urmărește până la confluența ei cu Mureșul. Așezările umane sunt amplasate de regulă la periferia masivului Călimani în bazinele depresionale dealungul văilor mai importante. Dintre acestea amintim: Răstolița, Bistrița, Pietriș, Dumbrava, Vătava, Monor, Gledin, Sebiș, Ruștior, Lunca Ardan, Regla, Budacul de Sus, Satu Nou etc. a căror locuitori își poartă vara turmele pe plaiurile înșorite ale Călimanului. Locuitorii acestor sate mărginașe, beneficiind de o floră medicinală bogată și de un folclor medicinal nealterat și încă bine păstrat, folosesc numeroase plante medicinale în afecțiuni dintre cele mai diverse. Cei bolnavi apelează frecvent la remediile preparate de așa numiții „doftori” ai satelor, oameni în general vârstnici, prezenți în toate satele zonei, oameni ce posedă cunoștințe temeinice atât în ceea ce privește cunoașterea plantelor medicinale (unii cunosc chiar zeci de specii), cunoștințe despre afecțiunile în care acestea sunt indicate precum și despre modul de preparare a remediilor. Dintre aceștia amintim pe: Echim Dumitru 83 ani din Vătava, Oltean Ioan 84 ani și Groza Nastasia 84 ani din Sebiș, Simioanca Alexa 80 ani din Lunca, Ursa Nechita 88 ani din Ardan, Dester Dumitru 60 ani din Regla, Biz Simion 62 ani și Șandru Gheorghe 59 ani din Monor, de la care am preluat marea parte a datelor. Sătenii acestei zone, cunosc după aprecierile noastre, aproape 300 de specii de plante de leac, dintre care pe aproape 200 le folosesc în scopuri terapeutice, atât la om cât și la animale. Am constatat de asemenea că pentru administrarea remediilor, sătenii folosesc forme medicamentoase variate începând cu aplicarea părților aeriene în stare crudă direct pe răni, tăieturi, buboae, afecțiuni reumatismale continuând cu folosirea „scăldărilor” sau băilor medicinale, a fumigațiilor, a „aburelilor” (aplicarea plantelor calde scoase din fiertură pe unele părți ale corpului în special în afecțiuni reumatice) a plămădelilor” sau cataplasmelor etc. toate acestea în afecțiuni externe.

În afecțiunile interne cel mai frecvent se folosesc „ceaiurile” sau infuziile, precum și „fiertura” sau decoctul. Soluțiile alcoolice pentru obținerea cărora se folosește pentru extracție „țuica sau vinarsul”, spirtul sanitar, vinul, oțetul, etc. se folosesc atât în afecțiuni interne cât și în cele externe. În cele ce urmează vom prezenta dintre numeroasele plante medicinale folosite în medicina populară de către locuitorii părții sud-vestice a masivului Călimani, pe cele care ni s-au părut mai interesante, mai specifice zonei, grupate pe afecțiuni.

În afecțiunile *reumatice* sătenii din Sebeș folosesc frunzele de arin negru (*Alnus glutinosa* Gaertn.) la prepararea fierturii cu care se fac băi, iar cu frunzele calde scoase din fiertură, se fac așa numitele „oblojeli” pe părțile dureroase. Cu fiertura din frunzele și fructele de mărul lupului (*Aristolachia clematitis* L.), frunzele de mesteacăn (*Betula pendula* Roth.) se fac băi, iar cu tulpinile fertile din coada calului (*Equisetum arvense* L.) se face o fiertură în care-și țin mâinile cei bolnavi de gută. Cu fiertura din cânepa codrului

(*Eupatorium cannabinum* L.) se fac băi medicinale sau scăldături. Din cele la care se utilizează părțile aeriene în stare crudă, mărunțite și pisate cu sau fără sare și puse sub „legătura” în reumatism amintim: slăbănogul (*Impatiens noli-tangere* L.) păduroi (*Melampyrum arvense* L. și *Melampyrum bihariense* Kern.) [18-22] pecetea lui solomon (*Polygonatum officinale* All.).

Cu extractele alcoolice din flori de podbal de munte (*Arnica montana* L.), flori de crin (*Lilium candidum* L.), din rădăcinile și partea aeriană de brândușă de toamnă (*Colchicum autumnale* L.) se fac frecții cu bune rezultate în întreagă zonă. Cataplasmele sau așa numitele „plămădeli” se obțin prin fierberea semințelor și rădăcinilor în special în lapte și se aplică pe locurile dureroase. Așa sunt semințele de in (*Linum usitatissimum* L.) cânepa (*Cannabis sativa* L.) rădăcina de tătăneasă (*Symphytum officinale* L.). La Monor și Gledin semințele de in fierte în lapte se aplică sub formă de cataplasme în mastite și în cancere de sân.

În afecțiuni ginecologice, la Lunca, în infecțiile cu *Trichomonas vaginalis* și *Candida albicans*, în așa numitele „scurgeri albe, poală albă” la femei se bea și se fac spălături cu decoctul din următoarele plante: sânziene albe (*Galium molugo* L.) bujor (*Paeonia officinalis* L.). La Buștior se utilizează în același scop decoctul din partea aeriană de busuioc sălbatic (*Prunella alba* L.).

În meno- și metroragii în așa numitele „scurgeri roșii” și în hematurie la Ardan, Monor, Vătava și Bistra se folosește decoctul din partea aeriană a plantelor: traista ciobanului (*Capsella bursa-pastoris* L.) (Medik.) și sânțer (*Cornus sanguinea* L.). La Ardan amestecul părților aeriene din spanacul ciobanilor (*Chenopodium bonus-hernicus* L.) și ochiul boului vânat (*Knautia arvensis* L. Coult.) se folosește în același scop. Sătenii din Ardan folosesc în atonii uterine precum și pentru favorizarea eliminării placentei „cămașa, casa copilului” decoctul plantelor: volbură (*Convulvulus arvensis* L.) și spanacul ciobanilor (*Chenopodium bonus-hernicus* L.). Nu lipsesc nici abortivele în acest scop, sătenii din Ardan folosesc rădăcina de podbal (*Tussilago farfara* L.).

În afecțiuni respiratorii sătenii din Lunca, utilizează partea aeriană de pelin bun (*Artemisia absinthium* L.) din care prepară decoctul și pe care-l beau în astm bronșic. În întreaga zonă se folosește decoctul din partea aeriană de varga ciobanului (*Dipsacus silvester* Huds.) în tuse „măgărească”. Din partea aeriană a cimbrisorului de câmp (*Thymus serpyllum* L.) așa numita „buruiană de ceas rău” sătenii prepară ceaiul care se bea în boli mintale.

În Sebiș și Ardan, infuzia din partea aeriană a plantelor hrenoasă (*Lipidium latifolium* L.) și dumbravnic (*Melittis melisso-phyllum* L.) se bea în afecțiuni ale tubului digestiv, în special în diaree. Din partea aeriană de cânepa codrului (*Eupatorium cannabinum* L.) în amestec cu ¼ rădăcină de rostopască (*Chelidonium majus* L.) se face un decoct ce se bea cu bune rezultate în afecțiuni ale ficatului în așa numita „gălbinare neagră”. În întreaga zonă, ceaiul din capsulele mature ale macului de grădină (*Papaver somniferum* L.) se dă sugarilor în colici abdominale și insomnie. Decoctul din partea aeriană de rotungioară (*Glechoma hederacea* L.) se folosește la Sebiș în special, dar și în întreaga zonă, la spălarea rănilor adânci greu vindecabile la oameni, dar mai ales la animalele de tracțiune folosite la muncile grele forestiere cu bune rezultate, fapt dovedit și de autori [10]. Planta întreagă *Chondrilla juncea* (răsfug) denumită popular în zonă „răsfocul pământului” uscată în cuptor după coacerea pâinii și pisată se dă ca mâncare amestecată cu ovăz și se aplică și local la animalele bolnave de așa numitul „răsfoc” - antrax sau cărbune.

Precizăm că multe din plantele amintite folosite de localnicii zonei studiate la tratarea afecțiunilor umane se folosesc și în afecțiunile similare ale animalelor.

CONCLUZII

Cercetările noastre în partea sud-vestică a munților Călimani s-au desfășurat între anii 1979-1983 și 1998-2002, necesitând numeroase deplasări în cele peste 20 de sate și în care am stat de vorbă cu zeci de persoane documentându-ne în legătură cu cunoștințele sătenilor despre plantele de leac și despre afecțiunile în care aceștia le folosesc.

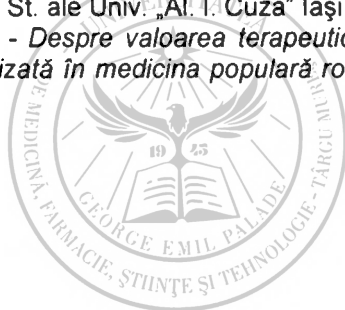
Am constatat că sătenii cunosc aproape 300 de plante medicinale dintre care pe aproape 200 le folosesc în scopuri terapeutice, în lucrarea de față noi prezentând doar pe cele ce ni s-au părut mai interesante, mai specifice zonei dintre care amintim: *Alnus glutinosa*, *Aristolachia clematitis*, *Equisetum arvense* în afecțiuni reumatismale, *Galium molugo*, *Cornus sanguinea*, *Convolvulus arvensis* în afecțiuni ginecologice, *Artemisia absinthium* în astm, *Glechoma hederacea* în vindecarea rănilor.

Din toate cele relatate desprindem concluzia că partea sud-vestică a munților Călimani posedă un folclor medical deosebit de interesant și bogat și mai ales nealterat și încă bine păstrat.

BIBLIOGRAFIE

1. BORZA AL - *Dicționar etnobotanic*, Edit. Acad. RSR, București, 1968.
2. Bujoreanu G - Boli, leacuri și plante de leac cunoscute de țărâtimea română, Edit. Astra, Sibiu, 1936.
3. BUTURĂ V - *Enciclopedie de etnobotanică românească*, Edit. Șt. și Encicl. București, 1979.
4. BUTURĂ V - *Plante cunoscute și întrebuințate de locuitorii câtorva sate românești*, În „Bulet. Grăd. Bot.” Cluj, vol. XVIII, 1938, 1-4:99-106.
5. COICIU E, RÁCZ G - *Plante medicinale și aromatice*, Edit. Acad. RPR București, 1962.
6. CSEDŐ C - *Plante medicinale și condimentare din județul Harghita*, Editura UJECOOP, Miercurea Ciuc, 1980.
7. CSEDŐ C, FÜZI J, KISGYÖRGY Z - *Cartarea plantelor medicinale din flora spontană a bazinului Ciuc*, Plantele medicinale din flora spontană a bazinului Ciuc, 1968:101.
8. CSEDŐ C, FÜZI J, KISGYÖRGY Z, RÁCZ G - *Plante medicinale din flora spontană a bazinului Ciuc*, Congresul Național de Farmacie, București, 7-9 XI. 1968, Volum de rezumate.
9. CSEDŐ C, KISGYÖRGY Z, ECHIM I, GÁSPÁR M - *Plantele medicinale din valea Budacului*, Studii și comunicări ale Societății de științe biologice din RSR Filiala Reghin, Vol. II, 1982:175-182.
10. CSUPOR D, FORGO P, CSEDŐ C, MÁTHÉ I, HOHMANN J - *Kárpát-medencében honos Aconitum fajok diterpén alkaloidjainak vizsgálat*, Acta Pharm. Hung. 2006, 76:181-190.
11. ECHIM I, ÁDÁM L - *Forme medicamentoase utilizate de locuitorii satelor din partea vestică a munților Călimani*, „Orientări în domeniul preparării medicamentului”. USSM din RSR Filiala Mureș, secția Farmacie, IMF Tg. Mureș, 1982:23.
12. ECHIM I, CSEDŐ C - *Remedii vegetale utilizate în medicina populară în afecțiuni reumatice din valea Budacului*, „Orientări în domeniul preparării medicamentului”. USSM din RSR Filiala Mureș, secția Farmacie, IMF Tg. Mureș, 1982, 22.
13. ECHIM I, CSEDŐ C, KISGYÖRGY Z - *Plante cunoscute și întrebuințate în medicina populară a locuitorilor părții nord-vestice a munților Călimani*, Simpozion „Actualități în domeniul medicamentelor de origine naturală”, USSM din RSR Filiala Iași, 1982.

14. ECHIM I, DOMOKOS L, CSEDÓ C - *Acțiunea antibiotică a extractelor de rotungioară (Glechoma hederacea L.)*, Studii și comunicări ale Societății de științe biologice din RSR Filiala Reghin, vol. II., 1982:163-168.
15. MIHOK C, CSEDÓ C - *Răspândirea geografică și caracterizarea botanică a speciilor indigene de Aconitum*, Ref. nr. 1 în cadrul Programului de pregătire doctoratului, UMF Tg. Mureș, 2004.
16. MIHOK C, CSEDÓ C - *Recoltarea și condiționarea unor specii de Aconitum din Carpații Românești*. Ref. nr. 2 în cadrul Programului de pregătire doctoratului, UMF Tg. Mureș, 2005:2-8.
17. MUNTEAN M, CSEDÓ C - *Studiul farmacognostic al speciilor de Melampyrum indigene*, Teză de doctorat, UMF Tg. Mureș, Edy optclitt, Arad, 2006.
18. MUNTEANU M, OROIAN S, DARKÓ B - *Studiul histo-anatomic al organelor vegetative la Melampyrum bihoriense Kern*, Note botanice, Fasc. XXX, University Press, Tg. Mureș, 2004:35-42.
19. NIȚĂ M, TUDOSE M, GISCĂ F - *Contribuții histo-anatomice referitoare la unele specii de Melampyrum L.*, Buletinul Grădinii Botanice, Iași, 1995:75-79.
20. RÁCZ G - *Considerații asupra valorificării plantelor întrebuințate în medicina populară*, Farmacia, 1960, 82:97.
21. RÁCZ G, CSEDÓ C - *Plantele folosite în medicina populară de pe verstanții vestici ai munților Harghita*, Aluta (Sf. Gheorghe), 1970, 2:75.
22. RÁCZ G, ILIEȘ G - *Considerații asupra valorificării plantelor întrebuințate în medicina populară din Moldova*, St. ale Univ. „Al. I. Cuza” Iași, 1960, 4:167.
23. SPIELMANN I, RÁCZ G - *Despre valoarea terapeutică a unor produse vegetale cu acțiune antibiotică utilizată în medicina populară românească*, Rev.Med. 1965, 11, 2:252.



Studiul privind distribuția elementelor metalice în organele plantei

Taraxacum officinale L, fam. Asteraceae

Marioara Olariu¹ Alexandrina Oșan¹, Ioana Pop²

¹U.M.F. Tg Mureș, Facultatea de Farmacie

²Sandoz

Spectrofotometria de absorbție atomică (SAA) este o metodă adecvată pentru determinarea conținutului în metale din plante.

Recoltarea plantei s-a făcut în perioada de înflorire din împrejurimile orașului Tg.Mureș. S-au uscat separat următoarele organe ale plantei: frunze, tulpină, rădăcină și flori. Pulberile obținute din organele plantei au fost supuse dezagregării. Digestia s-a făcut cu HNO₃ 63% în amestec cu H₂O₂ 30%. Următoarele elemente: K, Na, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu și Pb s-au determinat prin tehnica SAA. Valorile concentrațiilor în elemente, determinate pe probe diferite în greutate, duc la rezultate ce prezintă dispersii mici (cu excepția sodiului și plumbului). Cel mai abundent metal este K urmat de Mg și Ca. Cele mai mici concentrații au fost determinate pentru Cu și Mn.

Determinarea metalelor din diferite organe ale plantei *Taraxacum officinale* (păpădia) se justifică, întrucât valorile obținute diferă de la un organ la altul.

Cuvinte cheie: *Taraxacum officinale* L, macroelemente, microelemente

Atomic absorption spectrophotometry is an adequate method for metal content determination in plants.

The plant was harvested in its flowering period in Tg.Mureș. The following plant organs were dried separately: leaves, stems, roots and flowers. The powders obtained from the plant organs were disaggregated. After a wet digestion in HNO₃ 65% and H₂O₂ 30%, the following elements: K, Na, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn and Pb were determined by AAS technique. The concentrations of the determined elements in different weight samples led to small dispersion result (except for sodium and lead). The most abundant element was K followed by Mg and Ca. The smallest quantity determined was for Cu and Mn.

*Metal determination in different plant organs of *Taraxacum officinale* is justified because the values obtained are different from one organ to another.*

Key words: *Taraxacum officinale* L., macroelements, trace elements.

Compoziția chimică a organismelor vii, animale și plante, este complexă, incluzând numeroși compuși chimici a căror structură și proporție diferă foarte mult în funcție de natura organismului, vârstă, condiții de mediu.[1], [4]

În afara componentelor organice și a apei, în alcătuirea plantelor intră și substanțe minerale. Acestea nu pot fi sintetizate de către plantă. Pentru organismele vegetale principala sursă de aprovizionare cu compuși anorganici o constituie solul. Un număr de 12 elemente (C, O, H, N, P, S, Cl, K, Na, Ca, Mg, Si) reprezintă 99% din greutatea organismelor. Ele au fost numite macroelemente, elemente plastice sau de constituție.

Alte elemente dintre care: Mo, Cu, Zn, Mg, Fe, B, Mn, Co etc. se găsesc în cantități mult mai mici (sub 1%) și poartă denumirea de oligoelemente sau microelemente.

Determinarea compoziției chimice a plantelor este importantă din următoarele motive: este necesar să se cunoască cantitatea de elemente nutritive ce se îndepărtează din sol odată cu recoltarea plantelor, (în scopul înlocuirii lor). [9]

pentru aprecierea aportului alimentar [7] și terapeutic de elemente pentru om și animale.[3], [6], [8]

Compoziția chimică normală a unei plante, adică concentrația diferitelor elemente în țesuturile vegetale, oscilează între anumite valori limită. Excesul sau carența unui element se manifestă prin modificări de ordin citologic, histologic și fiziologic, și are influență asupra productivității plantei.

Studiul întreprins s-a axat pe determinarea conținutului în metale a plantei *Taraxacum officinale* L. Planta este folosită în scopuri farmaceutice, recoltându-se partea aeriană (*Taraxaci herba*) și rădăcina (*Taraxaci radix*). [2]

Pentru determinarea conținutului în metale a plantei s-a apelat la metoda spectrofotometriei de absorbție atomică (SAA) o metodă cu sensibilitate și reproductibilitate foarte bună. [5]

Scopul determinărilor a fost acela de a stabili conținutul și distribuția unor metale în diversele organe ale plantei *Taraxacum officinale* (pădăria).

MATERIAL ȘI METODĂ

Recoltarea plantelor s-a făcut în perioada de înflorire din împrejurimile orașului Tg. Mureș și s-au separat astfel: frunze, tulpini, rădăcini, flori.

De asemenea s-a recoltat partea aeriană a plantei (herba) din orașul Sovata.

Uscarea s-a efectuat în strat subțire, în camere bine aerate. Probele uscate au fost mărunțite cu ajutorul unui mixer, obținându-se pulberea din care s-au efectuat determinările.

Prelucrarea probelor s-a realizat astfel: 0,4000-0,5000g pulbere de produs vegetal se introduce într-un flacon de plastic; se tratează proba cu 6 ml HNO_3 conc. și 3 ml perhidrol (H_2O_2 30%); flaconul de plastic închis ermetic se încălzește în baie de apă timp de 30 min., timp în care are loc dezagregarea materialului vegetal. Proba se aduce cantitativ în balon cotelat de 25 ml cu apă bidistilată. Soluțiile astfel obținute sunt incolore și limpezi.

Determinările experimentale au fost efectuate la Regia Autonomă "Apele Române", filiala Tg. Mureș, cu un spectrofotometru de absorbție atomică UNICAM 939. Aparatul redă direct valoarea concentrației citite în mg/l. (C_P)

Pentru a elimina sursele de erori datorate prezenței impurităților în reactivii folosiți la dezagregarea probelor, s-a determinat de fiecare dată conținutul în elementul studiat și în reactivii folosiți în condiții de lucru, așa numitele valori martor ale reactivilor (notate C_M). Aceste valori se scad din valorile citite pentru fiecare probă.

Având în vedere modul de lucru s-a calculat concentrația în mg element la 100 g probă uscată după formula:

$$C_{(\text{mg}\%)} = 2,5 (C_P - C_M)/m$$

m – reprezintă masa probei luată în lucru

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Elementele determinate au fost: potasiu, magneziu, calciu, fier, zinc, mangan, cupru. Rezultatele experimentale sunt redată în tabelele I și II.

Tabel I. Conținutul în macroelemente al plantei *Taraxacum officinale*

Elemente determinate		Potasiu $C_M=0,267$ mg/l		Magneziu $C_M=1,747$ mg/l		Calciu $C_M=2,083$ mg/l	
1	2	3	4	5	6	7	8
Organul plantei	Masa probei(g)	C_P (mg/l)	$\bar{X}$ mg/100g probă	C_P (mg/l)	$\bar{X}$ mg/100g probă	C_P (mg/l)	$\bar{X}$ mg/100g probă
Frunze	0,4331	233,800	$\bar{X}_m=1264,256$	97,45	$\bar{X}_m=542,011$	98,500	$\bar{X}_m=541,327$
	0,4599	234,100	$S^2=6088,489$	101,000	$S^2=907,559$	107,100	$S^2=1860,544$
	0,4930	234,100	$S=78,028$	110,700	$S=30,125$	101,100	$S=43,134$
	0,4387	234,100	$S(X_m)=34,895$	102,300	$S(X_m)=13,472$	95,800	$S(X_m)=19,290$
	0,4938	234,100		99,040		100,800	
Tulpină	0,5052	234,100	$\bar{X}_m=1263,078$	104,700	$\bar{X}_m=490,489$	70,570	$\bar{X}_m=327,113$
	0,4822	234,100	$S^2=6072,462$	92,580	$S^2=936,174$	67,870	$S^2=565,618$
	0,4948	234,100	$S=75,027$	99,540	$S=30,596$	66,140	$S=23,782$
	0,4196	234,100	$S(X_m)=36,025$	90,300	$S(X_m)=13,683$	60,600	$S(X_m)=11,891$
	0,4263	234,100		78,540		52,400	
Rădăcină	0,4398	185,000	$\bar{X}_m=1019,957$	42,510	$\bar{X}_m=262,346$	27,280	$\bar{X}_m=151,913$
	0,4751	189,100	$S^2=528,739$	56,000	$S^2=1085,870$	39,890	$S^2=722,986$
	0,4196	171,400	$S=22,994$	39,290	$S=32,952$	26,720	$S=26,888$
	0,4299	178,100	$S(X_m)=10,283$	48,690	$S(X_m)=14,736$	24,720	$S(X_m)=12,024$
	0,4326	173,700		53,290		26,130	
Flori	0,4622	228,700	$\bar{X}_m=1256,649$	45,350	$\bar{X}_m=221,367$	21,100	$\bar{X}_m=104,5699$
	0,4619	227,400	$S^2=2165,792$	40,140	$S^2=448,927$	22,400	$S^2=51,3762$
	0,4580	227,200	$S=46,538$	38,220	$S=21,187$	19,690	$S=7,1677$
	0,4259	226,200	$S(X_m)=23,269$	43,100	$S(X_m)=10,593$	21,400	$S(X_m)=3,5838$
Herba (Sovata)	0,4400	234,700	$\bar{X}_m=1327,742$	68,610	$\bar{X}_m=364,222$	91,220	$\bar{X}_m=467,608$
	0,5056	234,400	$S^2=15406,891$	68,600	$S^2=800,981$	86,690	$S^2=7277,615$
	0,4024	234,100	$S=124,124$	106,600	$S=28,301$	93,390	$S=85,308$
	0,4257	233,300	$S(X_m)=62,062$	66,660	$S(X_m)=16,339$	66,510	$S(X_m)=42,654$

Așa cum reiese din tabelul I (col.4) conținutul de *potasiu* în frunze, tulpină și flori este apropiat și mai mic în rădăcina plantei. Valorile conținutului în potasiu obținute pentru părțile aeriene ale plantei recoltate din stațiunea Sovata sunt mai mari decât media valorilor obținute pentru partea aeriană a plantelor recoltate din împrejurimile orașului Tg.Mureș.

Referitor la concentrația *magneziului* (tabelul I, col.6) aceasta scade în ordinea: frunze > tulpină > rădăcină > flori.

Din tabelul I,col.8, reiese că repartizarea *calciului* în diverse organe ale plantei diferă foarte mult: spre exemplu în frunze conținutul este de 5 ori mai mare decât în flori, iar în rădăcină de aproximativ 3,5 ori.

Distribuția *fierului* (tabelul II, col.4) evidențiază conținutul cel mai mic în tulpină (aprox. 10mg/100g probă uscată). Față de tulpină, florile au un conținut dublu, frunzele conțin de trei ori mai mult, iar rădăcinile conțin de 11 ori mai mult fier.

Pentru elementul *zinc* se remarcă valori ale conținutului apropiat în frunze, rădăcină și flori și un conținut mult mai mic în tulpină (tabelul II, col.6).

Tabel II. Conținutul în microelemente al plantei *Taraxacum officinale*

Elemente determinate		Fier $C_M=0,267$ mg/l		Zinc $C_M=0,132$ mg/l		Mangan $C_M=0,000$ mg/l		Cupru $C_M=0,045$ mg/l	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Organul plantei	Masa probei (g)	C_P (mg/l)	$\bar{X}$ mg/100g probă	C_P (mg/l)	$\bar{X}$ mg/100g probă	C_P (mg/l)	$\bar{X}$ mg/100g probă	C_P (mg/l)	$\bar{X}$ mg/100g probă
Frunze	0,4331	6,292	$\bar{X}_m = 31,376$	0,871	$\bar{X}_m = 4,335$	0,768	$\bar{X}_m = 4,246$	0,385	$\bar{X}_m = 1,915$
	0,4599	5,745	$S^2 = 4,650$	0,894	$S^2 = 0,305$	0,820	$S^2 = 0,039$	0,486	$S^2 = 0,110$
	0,4930	6,458	$S = 2,156$	1,001	$S = 0,552$	0,817	$S = 0,199$	0,406	$S = 0,332$
	0,4387	5,405	$S(X_m) = 0,964$	1,043	$S(X_m) = 0,247$	0,740	$S(X_m) = 0,089$	0,382	$S(X_m) = 0,148$
	0,4938	6,519		0,857		0,787		0,335	
Tulpină	0,5052	2,961	$\bar{X}_m = 9,973$	0,610	$\bar{X}_m = 2,420$	0,310	$\bar{X}_m = 1,425$	0,816	$\bar{X}_m = 1,174$
	0,4822	2,194	$S^2 = 4,007$	0,662	$S^2 = 0,071$	0,251	$S^2 = 0,089$	1,493	$S^2 = 0,085$
	0,4948	1,895	$S = 2,001$	0,614	$S = 0,267$	0,282	$S = 0,299$	0,934	$S = 0,292$
	0,4196	1,863	$S(X_m) = 0,895$	0,558	$S(X_m) = 0,119$	0,309	$S(X_m) = 0,134$	1,227	$S(X_m) = 0,130$
	0,4263	1,767		0,476		0,175		1,401	
Rădăcină	0,4398	19,280	$\bar{X}_m = 110,336$	1,060	$\bar{X}_m = 4,319$	0,750	$\bar{X}_m = 3,642$	1,506	$\bar{X}_m = 1,254$
	0,4751	15,400	$S^2 = 331,802$	0,890	$S^2 = 0,516$	0,608	$S^2 = 0,842$	1,099	$S^2 = 0,043$
	0,4196	22,450	$S = 18,2154$	0,953	$S = 0,718$	0,306	$S = 0,917$	2,150	$S = 0,207$
	0,4299	19,740	$S(X_m) = 9,107$	0,777	$S(X_m) = 0,321$	0,780	$S(X_m) = 0,458$	1,343	$S(X_m) = 0,103$
	0,4326	15,470		0,771		0,445		1,069	
Flori	0,4622	4,126	$\bar{X}_m = 20,369$	1,023	$\bar{X}_m = 4,699$	0,268	$\bar{X}_m = 1,089$	1,006	$\bar{X}_m = 0,985$
	0,4619	3,647	$S^2 = 16,669$	0,993	$S^2 = 0,031$	0,173	$S^2 = 0,058$	0,925	$S^2 = 0,003$
	0,4580	5,004	$S = 4,082$	1,021	$S = 0,176$	0,187	$S = 0,242$	1,064	$S = 0,062$
	0,4259	3,070	$S(X_m) = 2,041$	0,893	$S(X_m) = 0,088$	0,162	$S(X_m) = 0,121$	0,945	$S(X_m) = 0,031$
Herba (Sovata)	0,4400	4,495	$\bar{X}_m = 20,369$	0,675	$\bar{X}_m = 4,279$	0,180		1,073	$\bar{X}_m = 1,343$
	0,5056	2,114	$S^2 = 16,669$	0,972	$S^2 = 1,087$	0,800		1,231	$S^2 = 0,100$
	0,4024	9,790	$S = 4,082$	1,038	$S = 1,043$	0,486		1,801	$S = 0,316$
	0,4257	20,43	$S(X_m) = 2,041$	0,856	$S(X_m) = 0,521$	0,705		1,268	$S(X_m) = 0,158$

Conținutul maxim de *mangan* este în frunze și cu puțin mai mic în rădăcină. Față de frunze tulpina are un conținut în mangan de trei ori mai mic iar florile de 4 ori (tabelul II, col.8).

Cuprul se găsește în cantități mici în toate organele plantei cu remarcă că se găsește cel mai mult în frunze, de aprox. două ori mai mult decât în flori. Concentrația cuprului din părțile aeriene ale plantei recoltate la Tg.Mureș și Sovata sunt foarte apropiate. (tabelul II, col.10)

CONCLUZIE

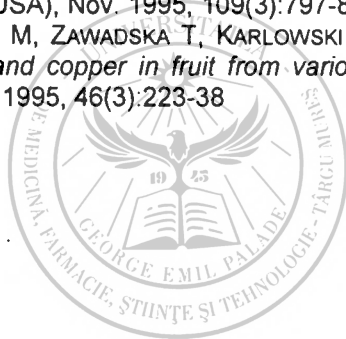
Pe baza datelor obținute putem aprecia că distribuția elementelor metalice diferă de la un organ la altul al plantei și depind de arealul de recoltare.

Conținutul mare în potasiu al păpădiei justifică utilizarea acesteia în formele fitofarmaceutice cu acțiune diuretică.

Având în vedere conținutul ridicat în magneziu și calciu pe de o parte și zinc și mangan, pe de altă parte, păpădia poate constitui o sursă de aport terapeutic al acestor elemente.

BIBLIOGRAFIE

1. ARNHOLD W, ANKE M. – *Der Zinkstatus verschiedener Wiederkäuerarten*, Mengen- und Spurenelemente, 19 Arbeitstagung 1999, Friedrich – Schiller – Universität Jena, 849 - 857
2. CIULEI I, GRIGORESCU E, STĂNESCU U – *Plante medicinale, fitochimie și fitoterapie*, vol II, Ed. Medicală, București, 1993
3. KREJPCIO Z, WÓJCIAK RW, ZIELKE M, et al. – *Level of calcium, magnesium, zinc and copper in the hair of elderly blind people*, Mengen- und Spurenelemente, 19 Arbeitstagung 1999, Friedrich – Schiller – Universität Jena, 525 - 531
4. NEMȚEANU G, POPESCU I, LAZĂR ȘT, et al. – *Chimie și biochimie vegetală*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1983
5. PARKER WC, LAZADA R, LA BRECQUE JJ, - *Appl. Spectrosc.*, 36, 452(1982)
6. SMITH GC, CLEGG MS, KEEN CL et al. – *Mineral values of selected plant foods common to southern Burkina Faso and to Niamey, Niger, West Africa*, Graduate Grory in Geography, University of California (USA), *Int.J.Food Sci.Nutr.* (England), Jan. 1996, 47(1):41-55
7. VLAD M, CASEANU E, PORR PJ et al. – *The concentration of Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Li, Mn and Cr in some foods in Transylvania area (Romania)*, Mengen- und Spurenelemente, 19 Arbeitstagung 1999, Friedrich – Schiller – Universität Jena, 874 - 879
8. WALDO GS, WRIGHT E, WHANG ZH et al. – *Formation of the ferritin iron mineral occurs in plastids*, *Plant Physiol.* (USA), Nov. 1995, 109(3):797-802
9. WOJCIECHOWSKA-MAZUREK M, ZAWADSKA T, KARLOWSKI K et al. – *Content of lead, cadmium, mercury, zinc and copper in fruit from various regions of Poland*, *Racz Pantsw Zakl Hig* (Poland), 1995, 46(3):223-38



Studii in vitro pe celule stem mezenchimale si celule leucemice a unui extract uscat de scoarță de mesteacăn

Cristina A. Dehelean¹, Camelia Peev¹, Simona Cîntă-Pînzaru², Codruța Șoica¹, C.A Tatu¹, Diana Antal¹

¹University of Medicine and Pharmacy Victor Babes Timisoara, P-ta Eftimie Murgu, nr.2, 300041, Romania.

²University Babes Bolyai, Cluj-Napoca, Faculty of Physics, Molecular Spectroscopy Department, Kogalniceanu 1, RO 400084 Cluj-Napoca, Romania

Corresponding author: CA Dehelean, email: cadehelean@umft.ro, Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș Timișoara, Facultatea de Farmacie, Disciplina Toxicologie, P-ta Eftimie Murgu nr.2, 300041, Timișoara.

The aim of this study was to evidence the therapeutic/toxic activity of a dry outer bark of birch tree extracts (Betula pendula Roth), on mesenchymal stem cells and K 562 cells. Vibrational AT-IR and FT-Raman spectroscopy has been performed in order to characterize the birch extract. In vitro toxicologic analysis was performed by a standardized colorimetric MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide]) assay. Also, our data proves the cytotoxic activity on mesenchymal stem cells of different birch bark extracts, compared to the activity proved on leukaemia K 562 cells. The results were compared with those for betulin alone, a known antitumor compound. Birch tree bark extract proves antitumor activity and induces a lower toxicity.

Key words: birch tree, bark, cytotoxic, mesenchymal stem cells.

Scopul studiului a fost acela de a evidenția activitatea terapeutică/toxică a unui extract de scoarță de mesteacăn (*Betula pendula* Roth) pe celule stem mezenchimale și K 562. Pentru a caracteriza extractul s-a apelat la tehnici vibraționale de tip FT-IR și FT-RAMAN. Analiza toxicologică in vitro a folosit tehnica colorimetrică MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide]). Datele s-au corelat cu cele pe celule leucemice K562 și s-au comparat cu cele pentru betulină etalon, un compus cu potențial antitumoral. Extractul uscat de scoarță de mesteacăn prezintă acțiune antitumorală și induce o toxicitate redusă.

Farmacopeea Europeană și Farmacopeea Română

- referințe de calitate pentru controlul produselor vegetale

NOTA I. Evaluarea conținutului de principii active prin metode gravimetrice și titrimetrice

Ligia-Elena Duțu¹, Cerasela – Elena Gîrd¹

Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București, Facultatea de Farmacie, Disciplina de Farmacognozie Fitochimie Fitoterapie, str. Traian Vuia nr. 6, sector 2, București, România
e-mail: ligia.dutu@yahoo.com

Lucrarea prezintă un studiu teoretic comparativ despre metodele gravimetrice și titrimetrice descrise în Farmacopeea Română ediția a 10-a și în Farmacopeea Europeană ediția a 5-a (inclusiv suplimentele 5.1 – 5.5) pentru evaluarea conținutului de principii active al produselor vegetale. În Farmacopeea Europeană și în Farmacopeea Română nu sunt descrise metode gravimetrice de dozare. Metode titrimetrice sunt descrise în cazul unor produse vegetale standardizate în alcaloizi, acid citric și tioheterozide.

Cuvinte cheie: Farmacopeea Europeană ediția a 5-a, Farmacopeea Română ediția a 10-a, Produs vegetal, Metode gravimetrice, Metode titrimetrice

This paper presents a comparative theoretical study about gravimetric and titrimetric methods described in the 10th Edition of Romanian Pharmacopoeia and in the 5th Edition of European Pharmacopoeia (including supplements 5.1 – 5.5) for assay. There are no gravimetric methods described in Romanian Pharmacopoeia and in European Pharmacopoeia for vegetal products standardization. The assay of alkaloids, citric acid and glucosinolates are determined by specific titrimetric methods.

Key words: European Pharmacopoeia, Romanian Pharmacopoeia, Herbal drugs, Gravimetric methods, Titrimetric methods

Evaluarea conținutului de principii active este etapa cu valoare hotărâtoare pentru aprecierea calității unui produs vegetal.

Se recomandă ca standardizarea unui produs vegetal să se facă în acel principiu activ care predomină din punct de vedere chimic sau care contribuie în cea mai mare măsură la acțiunea terapeutică.

În funcție de structura chimică a principiului activ, pentru dozare se pot aplica metode gravimetrice, titrimetrice, spectrofotometrice, cromatografice, biologice etc. [1]

În condițiile în care, în prezent, prevederile Farmacopeei Europene sunt obligatorii pentru controlul calității produselor vegetale și în România, actuala lucrare își propune un studiu teoretic comparativ despre metodele gravimetrice și titrimetrice descrise în Farmacopeea Română ediția a 10-a și în Farmacopeea Europeană ediția a 5-a (inclusiv suplimentele 5.1 – 5.5) pentru evaluarea conținutului de principii active al produselor vegetale.

MATERIAL SI METODA

Au fost selectate produsele vegetale din Farmacopeea Română ediția a 10-a și din Farmacopeea Europeană ediția a 5-a (inclusiv din suplimentele 5.1 – 5.5) pentru a căror standardizare se folosesc metode gravimetrice și titrimetrice. Metodologia de lucru a fost analizată comparativ [3, 4].

REZULTATE

Analizând monografiile specifice de produse vegetale din Farmacopeea Europeană și Farmacopeea Română se poate aprecia că:

1. nu există principii active pentru a căror dozare să se folosească metode gravimetrice;
2. sunt descrise metode titrimetrice de dozare în cazul unor produse vegetale standardizate în alcaloizi, acid citric și tioheterozide (Tabelul I).

Tabelul I. Metode titrimetrice descrise în Farmacopeea Europeană și în Farmacopeea Română pentru standardizarea produselor vegetale

Principiu activ dozat / principiu activ de referință	Metodă titrimetrică descrisă în:		Produs vegetal (monografie de referință)
	Farmacopeea Europeană	Farmacopeea Română	
Alcaloizi tropanici / hioscamină	Titrare indirectă: H_2SO_4 0,02M + NaOH 0,01M; roșu de metil		<i>Belladonnae folium, Stramonii folium*</i>
Alcaloizi / emetină	Titrare indirectă: HCl 0,1M + NaOH 0,1M; roșu de metil	Titrare indirectă: H_2SO_4 0,02M + NaOH 0,01M; roșu de metil	<i>Ipecacuanhae radix</i>
Alcaloizi / protopină	Titrare potențimetrică: HClO_4 0,02M	-	<i>Fumariae herba*</i>
Alcaloizi totali / chelidonină	-	Titrare indirectă: H_2SO_4 0,02M + NaOH 0,01M; roșu de metil	<i>Chelidonii herba</i>
Alcaloizi eterosolubili / aconitină	-	Titrare indirectă: H_2SO_4 0,02M + NaOH 0,01M; roșu de metil	<i>Aconiti tubera**</i>
Acizi / acid citric	Titrare potențimetrică: NaOH 0,1M	-	<i>Hybisci sabdariffae flos*</i>
Tioheterozide / izotiocianat de alil	-	Titrare indirectă: I_2 0,05M + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1M; amidon	<i>Sinapis nigrae semen**</i>

Legendă:

* - nu există monografie specifică în Farmacopeea Română ediția a 10-a

** - nu există monografie specifică în Farmacopeea Europeană ediția a 5-a

DISCUȚII

Metodele gravimetrice sunt metode în care determinarea concentrației unui principiu activ se bazează pe măsurarea masei.

Aceste metode se caracterizează prin exactitate și precizie ridicate, superioare de exemplu metodelor titrimetrice (măsurarea maselor se face mult mai exact decât măsurarea volumelor).

Sunt însă laborioase și necesită un timp îndelungat de lucru. De aceea, gravimetria este recomandată a fi utilizată cu precădere în cercetare, iar în controlul produselor vegetale doar atunci când este necesară o exactitate ridicată a rezultatelor pe un număr mic de probe. Dacă se lucrează cu un număr mai mare de probe, se preferă înlocuirea metodelor gravimetrice cu procedee mai rapide [1, 2].

Practic, în Farmacopeea Europeană și Farmacopeea Română nu există produse vegetale pentru a căror standardizare să se folosească o metodă gravimetrică.

Metodele titrimetrice sunt metode chimice, în care analitul (principiul activ vegetal) se dozează prin măsurarea volumului de reactiv de concentrație cunoscută, care se aduce în cantitate stoechiometrică peste soluția-probă.

La baza determinărilor titrimetrice stau echilibre chimice, de tip acid – bază (protometrie, complexometrie) sau oxidare – reducere (redoxometrie).

Sunt folosite în mod curent în laboratoarele de control, datorită faptului că sunt rapide, au o exactitate ridicată, utilizează instrumente simple și se pretează la automatizare.

La realizarea experimentală a metodelor titrimetrice se pot folosi procedee directe sau indirecte.

Titrare directă constă în aducerea soluției standard din biuretă peste soluția probei de analizat până la punctul final (determinat cu un indicator sau instrument). Procedeele se poate aplica atunci când:

- reacția între analit și titrant decurge stoechiometric, cu viteză mare;
- există un indicator care permite evidențierea punctului final;
- analitul și produșii de reacție sunt stabili în timpul determinării.

Dacă nu sunt îndeplinite aceste condiții se recurge la titrarea indirectă. Aceasta poate presupune o titrare prin diferență (soluția probei se tratează cu un volum bine determinat de soluție standard luată în exces, iar cantitatea care nu a reacționat cu analitul se retitrează cu altă soluție standard, în prezența unui indicator adecvat) sau prin substituție (proba se tratează cu un volum de reactiv în exces, iar cantitatea de produs de reacție rezultată, care este echivalentă cu cantitatea de analit din probă, se titrează cu o soluție standard).

Determinările titrimetrice se pot efectua în mediu apos sau anhidru (neapos). Dozările în soluții apoase se aplică în cazul principiilor active solubile în apă și care au o funcție acidă sau bazică suficient de mare (K_a sau $K_b > 10^6$). În mediu anhidru se pot doza direct acizi și baze slabe, insolubile în apă. Datorită dificultății de a găsi expresiile care descriu cantitativ echilibrele în solvenți neapoși, prețului ridicat și toxicității apreciabile a solvenților, titrările în mediu neapos au o utilizare limitată.

Punctul final al titrării se pune în evidență prin metode vizuale (cu ajutorul indicatorilor – de culoare, de fluorescență, turbidimetrice, de adsorbție) sau instrumentale (în titrare potențiometrică, conductometrică, amperometrică).

Indicatorii de pH sunt acizi sau baze slabe organice, care participă la procesele protolitice cu speciile chimice implicate în titrare, modificându-și o însușire ușor observabilă (de exemplu culoarea), dependent de valoarea pH-ului. Cei mai utilizați sunt indicatorii de culoare: metiloranj, roșu de metil, fenolftaleină – în protometrie; negru de eriocrom T, murexid – în complexometrie; amidon – în iodometrie (metodă redoxometrică).

În titrările potențiometrică, punctul de echivalență se determină folosind variația diferenței de potențial între 2 electrozi (un electrod-indicator și un electrod-standard, sau 2 electrozi-indicator) imersați în soluția-probă, în funcție de cantitatea de titrant adăugată. Electrocul-indicator se alege în funcție de principiul activ care urmează să fie dozat. De obicei acesta este din sticlă sau metal (platină, aur, argint, mercur). Electrocul de referință este din calomel sau argint – clorură de argint. Farmacopeea Europeană recomandă ca pentru titrările potențiometrică acido-bazice să se folosească combinații de tip sticlă – calomel sau sticlă – argint – clorură de argint, dacă monografia produsului nu are alte prevederi.

Alegerea metodei de dozare și a condițiilor experimentale concrete depinde de proprietățile fizico-chimice ale principiului activ, de natura produsului vegetal și de conținutul în principiu activ al produsului vegetal.

Calcularea cantității unui anumit principiu activ din proba de produs vegetal se face pe baza stoechiometriei reacției și ține cont de procedeul de dozare utilizat (direct sau indirect) [1, 2].

Comentarii referitoare la metodele titrimetrice de dozare propuse de Farmacopeea Europeană și Farmacopeea Română pentru dozarea de principii active

Produsele vegetale *Belladonnae folium*, *Ipecacuanhae radix*, *Chelidonii herba* prezintă monografii specifice atât în Farmacopeea Europeană cât și în Farmacopeea Română. Sunt standardizate în alcaloizi. În cazul primelor două produse vegetale menționate, pentru determinarea conținutului de alcaloizi se folosesc metode titrimetrice acido-bazice indirecte, în mediu apos. Metodele folosite în Farmacopeea Europeană nu diferă semnificativ de cele din Farmacopeea Română. Pentru determinarea conținutului de alcaloizi totali din *Chelidonii herba* (exprimați în chelidonină), Farmacopeea Europeană propune o metodă cromatografică HPLC, în timp ce Farmacopeea Română apelează la o titrare indirectă, în mediu apos.

Produsele vegetale *Stramonii folium*, *Fumariae herba*, *Hybisci sabdariffae flos* prezintă monografii specifice doar în Farmacopeea Europeană. Pentru evaluarea conținutului de alcaloizi tropanici din *Stramonii folium* (exprimați în hiosciamină), Farmacopeea Europeană propune o metodă titrimetrică indirectă, asemănătoare cu cea descrisă pentru standardizarea produsului *Belladonnae folium*; diferă cantitatea de probă luată în lucru. Pentru dozarea alcaloizilor din *Fumariae herba* se folosește o titrare potențimetrică în mediu anhidru (acid percloric 0,02M). Conținutul de acizi totali din produsul vegetal *Hybisci sabdariffae flos* se determină potențimetric, folosind o soluție titrată de hidroxid de sodiu 0,1M.

Produsele vegetale *Aconiti tubera* și *Sinapis nigrae semen* prezintă monografii specifice doar în Farmacopeea Română. Pentru evaluarea conținutului de alcaloizi eterosolubili din *Aconiti tubera* Farmacopeea Română propune o metodă titrimetrică indirectă, în mediu apos, folosind soluții titrate de acid sulfuric 0,02M (exces) și apoi hidroxid de sodiu 0,01M (titrare exces), iar ca indicator de culoare roșu de metil. Dozarea glucosinolatelor din *Sinapis nigrae semen* se realizează printr-o tehnică mai laborioasă. Metoda presupune hidroliza tioheterozidelor, transformarea senevolilor rezultați în derivați de tiouree (prin captare în amoniac), determinarea excesului de amoniac (titrare cu soluție de acid clorhidric 1M) și în final titrarea senevolilor printr-o metodă iodometrică indirectă, folosind soluții titrate de iod 0,1M (exces), respectiv tiosulfat de sodiu 0,1M (pentru retitrarea excesului de iod).

CONCLUZII

În Farmacopeea Europeană și în Farmacopeea Română nu sunt descrise metode gravimetrice de dozare a principiilor active vegetale.

Metode titrimetrice sunt descrise în cazul unor produse vegetale standardizate în alcaloizi (*Belladonnae folium*, *Stramonii folium*, *Ipecacuanhae radix*, *Chelidonii herba*, *Aconiti tubera*), acid citric (*Hybisci sabdariffae flos*) și tioheterozide (*Sinapis nigrae semen*). Pentru produsele vegetale comune în Farmacopeea Europeană și în Farmacopeea Română, metodele titrimetrice de dozare descrise în Farmacopeea Europeană sunt asemănătoare (dar nu identice) cu cele din Farmacopeea Română.

BIBLIOGRAFIE

1. GÎRD CE, DUȚU LE, POPESCU LM et al – *Farmacognozie. Baze practice*, vol. I, Ed. Universitară, București, 2005, 27-31
2. MONCIU CM, NEAGU A, NEDELCU A et al – *Analiză chimică în controlul medicamentului*. Ed. Medicală, București, 2005, 319-330, 803-805.
3. ^{xxx} – *Farmacopeea Română ediția a X-a*. Editura Medicală, București, 1993
4. ^{xxx} – *European Pharmacopoeia 5th edition* (și suplimentele 5.1 – 5.5), Strasbourg, Council of Europe, 2005 - 2006.

Studiul chimic calitativ și cantitativ al gemoderivatului de muguri de coacăz negru și a materiei prime aferente

Cerasela Elena Gîrd, Mariana Pavel, Ligia Elena Duțu

UMF Carol Davila, București, Facultatea de Farmacie
Disciplina de Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie
Adresa de contact: cerasela.gird@yahoo.com

În această lucrare se prezintă un studiu chimic calitativ și cantitativ comparativ între mugurii, frunzele și gemoderivatul obținut din mugurii de coacăz negru. Chimic calitativ în toate probele s-a decelat prezența flavonelor, derivaților acidului cafeic, taninului, mucilagiilor și a saponozidelor. Cantitativ, mugurii au un conținut mai ridicat în flavone ($309,10\text{--}321,14 \times 10^{-3}\%$ rutozid) și derivați ai acidului cafeic ($2340\text{--}2816 \times 10^{-3}\%$), iar frunzele în tanin ($3,83\text{--}4,15\%$) și mucilagii ($4,13\text{--}4,41\%$). Gemoderivatul are un conținut scăzut în acid cafeic ($8,92\text{--}10,13 \times 10^{-3}\%$ g/100 mL soluție).

Cuvinte cheie: Muguri și frunze de coacăz negru, Gemoderivat, Studii chimice calitative și cantitative

This paper is a comparative qualitative and quantitative chemical study about buds and leaves harvested from black-currant, and about a gemoderivative obtained from black-currant, too. Flavones, polyphenolcarboxylic acids, tannins, mucilages and saponins are present in all samples. The buds have a higher content of flavones ($309.10 - 321.14 \times 10^{-3}\%$ rutoside) and polyphenolcarboxylic acids ($2340 - 2816 \times 10^{-3}\%$ caffeic acid). The leaves have a higher content of tannins ($3.83 - 4.15\%$) and mucilages ($4.13 - 4.41\%$). The gemoderivative has a low content of polyphenolcarboxylic acids ($8.92 - 10.13 \times 10^{-3}\%$ g caffeic acid / 100 ml solution).

Key words: Black-currant buds and leaves, Gemoderivatives, Qualitative and quantitative chemical study

Ribes nigrum L. (Grossulariaceae), coacăzul negru este un arbust nespinos cu tulpină viguroasă și erectă, prezintă frunze subrotunde, cordiforme, cu 3-5 lobi triunghiulari, iar pe fața internă prezintă numeroase glande de culoare galbenă, florile sunt dispuse în racem, iar fructele de culoare negricioasă prezintă un gust dulceag și un miros specific [2,6,7].

În fitoterapie, de la această specie se utilizează în special fructele care prin fitocomplexul flavonoide-vitamine imprimă proprietăți capilare- și vasoprotectoare, antiagregant-plachetară, antiradicalară, stimulent digestiv și renal [4,5]. Frunzele bogate în flavone (derivați ai kemferolului, cvercitolului, miricetolului și isoramnetolului, hiperozidă, astragalozidă) se utilizează în fitoterapie pentru proprietățile diuretice [1,5,8,9]. Extractele obținute din frunze sunt contraindicate în tratamentul edemelor rezultate în urma unei disfuncții cardiace sau renale [5,8].

Deoarece pe piața farmaceutică au apărut numeroase fitopreparate care conțin extracte hidroglicerolice obținute din muguri (gemoderivate) recoltați de la diverse specii, prezentul studiu își propune să stabilească compoziția chimică calitativă și cantitativă a materiei prime aferente și a gemoderivatului obținut din mugurii de coacăz negru. S-a întreprins acest studiu, deoarece aceste medicamente care sunt încadrate în clasa suplimentelor nutritive nu sunt caracterizate chimic și nu există o corelare a compoziției chimice cu acțiunea terapeutică.

OBIECTIVELE CERCETĂRII

1. Stabilirea particularităților anatomice pentru mugurii și frunzele de coacăz negru
2. Stabilirea compoziției chimice calitative și cantitative a celor două produse vegetale și a gemoderivatului obținut din muguri
2. Decelarea modificărilor chimice cantitative apărute pe parcursul maturizării frunzelor

MATERIAL ȘI METODĂ

Ca material de studiu s-au folosit mugurii foliari de coacăz negru, recoltați din flora cultivată în anul 2006 și gemoderivatul corespunzător. Pentru a decela eventualele modificări chimice calitative și cantitative apărute pe parcursul maturizării produsului vegetal s-a luat în studiu și frunza matură. Menționăm că mugurii foliari s-au recoltat atunci când frunzulițele formate erau evidente ca formă și dimensiune, deci poate fi considerat că în cercetare s-au utilizat frunzele imature recoltate în stadiul de debut.

Metoda utilizată a fost analiza farmacognostică [3], cu scopul stabilirii caracterelor morfologice și anatomice (preparat superficial clarificat în NaOH 20 g/L din muguri și pulbere clarificată cu clorhidrat 800 g/L din frunză) ale celor două produse vegetale precum și pentru determinarea conținutului în principii active (analize chimice calitative și cantitative). Pentru determinarea tipului de principii active s-au analizat soluțiile extractive eterice, alcoolice și apoase obținute prin epuizarea produselor vegetale cu acești solvenți.

Cantitativ s-au determinat:

- prin metode spectrofotometrice flavonele (reacția de chelatare cu clorura de aluminiu III, $\lambda=427$ nm) și acizii polifenolcarboxilici (APFC, proprietatea acidului cafeic de a forma în prezența reactivului Arnou oxime colorimetrabile, $\lambda=510$ nm);
- prin metode gravimetrice poliholoizidele mixte de tip mucilag (precipitarea în alcool absolut sau acetonă, purificarea precipitatelor prin reprecipitări și solubilizări în apă caldă) și taninul catehic, (precipitarea cu reactivul Styassny);
- prin metode volumetrice uleiul volatil (distilare cu vapori de apă conform FR X, la aparatul NeoClevenger).

Pentru interpretarea rezultatelor de la determinările spectrofotometrice s-a apelat la curbele etalon stabilite în prealabil cu substanțele de referință corespunzătoare, și anume: rutozid pentru flavone și acid cafeic pentru APFC. Citirile spectrofotometrice s-au efectuat la un spectrofotometru UV-Vis Cecil series 2000, aflat în dotarea disciplinei.

Preliminar s-au determinat pierderile prin uscare (umiditatea) și substanțele solubile (extractivul, respectiv totalul de substanțe organice care s-au solubilizat în apă și alcool de diferite concentrații) și factorul de îmbibare (volumul pe care îl ocupă produsul vegetal și mucilagul care aderă de acesta prin îmbibare cu apă) conform FR X [10].

S-a apelat și la tehnica cromatografică în scopul evidențierii derivaților flavonici și a APFC din cele două produse vegetale și gemoderivatul corespunzător.

Condițiile separării cromatografice [8]:

- fază fixă: silicagel GF 254;
- fază mobilă: acetat de etil:acid formic anhidru:apă – 80:8:12;
- proba: soluții alcoolice obținute prin refluxarea unui gram de produs vegetal cu 5 mL metanol timp de 10 min. și gemoderivat;
- etaloane: amestec de rutozidă și acid clorogenic în metanol;
- revelator: difenilboriloxietilamină pulverizat succesiv cu PEG 400.

REZULTATE

Examenul macroscopic a evidențiat particularitățile celor două produse vegetale și anume:

- mugurii foliari sunt formați din câte trei frunzulițe membranoase cu aspect catifelat, fiecare frunzuliță prezintă un aspect cordiform, cu 3 lobi triunghiulari, neregulați, de culoare verde pe ambele epiderme și cu un miros ușor aromat (figura 1);



Figura 1 Muguri de coacăz negru

- frunzele cu un ușor aspect cordiform prezintă 3 lobi triunghiulari neregulați.

În preparatul microscopic din muguri s-a evidențiat prezența numeroaselor glande pluricelulare (figura 2) și a perilor tectori unicelulari cu aspect verucos (figura 3).

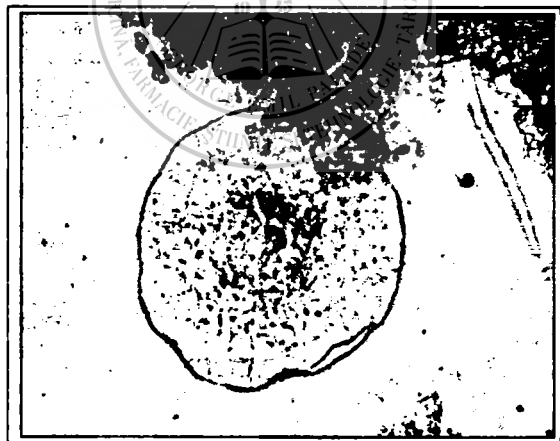


Figura 2. Glandă pluricelulară (ob. 40x)



Figura 4 Peri tectori unicelulari verucoși (ob. 10x)

În preparatul din frunză s-au observat rare glande pluricelulare, fragmente de parenchim clorofilian, vase de lemn inelate și druze de oxalat de calciu.

Din punct de vedere chimic calitativ în cele două produse vegetale s-au identificat: steroli, agliconi flavonici, carotenoide (în soluția extractivă eterică), flavone, APFC, saponozide, proantociani, compuși reducători, tanin (în soluția extractivă alcoolică) și poliholozide mixte de tip mucilag (în soluția extractivă apoasă). În gemoderivat a fost decelată prezența flavonelor, a taninului, APFC și a mucilagiilor.

Rezultatele screeningului chimic cantitativ pe probele luate în lucru sunt prezentate în tabelul I.

Tabelul I. Rezultatele determinărilor chimice cantitative

Determinarea	Muguri	Frunză	Gemoderivat
Substanțe solubile g%	18,29-19,23 în apă	13,82-14,25	-
	18,53-19,44 în metanol 20%	11,18-12,23 în metanol 20%	-
	17,46-18,03 în metanol 50%	14,25-15,34 în metanol 50%	-
	10,94-11,29 în metanol 70%	6,71-7,13 în metanol 70%	-
Factor de îmbibare mL	7,8-8	10-10,3	-
APFC g% acid cafeic	$2340-2816 \times 10^{-3}$	$1802-1913 \times 10^{-3}$	$8,92-10,13 \times 10^{-3}$
Flavone g% rutozid	$309,10-321,14 \times 10^{-3}$	$163,32-170,1 \times 10^{-3}$	$74,59-80,16 \times 10^{-3}$
Tanin g%	2,14-2,59	3,83-4,15	0,284-0,316
Mucilagii g%	2,98-3,10	4,13-4,41	0,768-0,824
Ulei volatil mL/kg	0,5	0,3	-

Cromatografic atât în cele două produse vegetale cât și în gemoderivat s-au identificat rutozida (R_f -0,4) și acidul clorogenic (R_f -0,55), iar pe baza datelor din literatura de specialitate și hiperozida (figura 4) [6]. Cromatografic, conștiuenții decelați în gemoderivat prezintă o valoare a R_f -ului modificată (0,24 pentru rutozid, 0,41 pentru acid clorogenic și 0,62 pentru hiperozidă) față de muguri, frunze și etaloane.



Figura 4. Cromatograma pentru flavone și APFC

Legendă:

- 1-gemoderivat,
- 2- soluție alcoolică din muguri,
- 3-soluție alcoolică din frunză,
- 4-etaloane

DISCUȚII

Descrierile macro- și microscopice ale celor două produse vegetale au corespuns datelor citate în literatura de specialitate [8]. Totuși trebuie menționat faptul că acele glande pluricelulare sunt mai puțin reprezentative pentru produsul vegetal de tip folium, iar în preparatul de muguri nu s-au observat incluziuni celulare.

Chimic calitativ suplimentar față de literatura de specialitate [6,7,9] s-au identificat carotenoidele și saponozidele.

Identificarea în gemoderivat a flavonelor, taninului, mucilagiilor și a derivaților acidului cafeic atestă faptul că procesul de obținere a preparatului farmaceutic permite solubilizarea unei palete cât mai variate de principii active, identice cu materia primă vegetală

Chimic cantitativ se observă o diferențiere a celor două produse vegetale. Conținutul în APFC și flavone este mai crescut în muguri, iar frunzele sunt mai bogate în tanin și mucilagii. Substanțele solubile determinate sunt mai crescute în apă și metanol 20% pentru muguri și respectiv în apă și metanol 50% pentru frunze. Acest parametru poate constitui un criteriu foarte important în selectarea solvenților de extracție, în scopul obținerii unor extracte standardizate în anumite tipuri de principii active. În gemoderivat derivații acidului cafeic sunt în cantitate foarte mică comparativ cu materia primă din care

s-a obținut. Conținutul în uleiul volatil puțin mai crescut în muguri este justificat și prin abundența glandelor pluricelulare decelate microscopic care acumulează acest tip de principiu activ.

În cromatograme se observă existența spoturilor galben-orange intens în toate probele, corespunzătoare rutozidei din amestecul de etaloane, conform valorii R_f calculate. Migrarea la un R_f mai mic a rutozidei, acidului clorogenic și hiperozidei în gemoderivat se datorează glicerinei din compoziția acestuia.

CONCLUZII

Au fost stabilite particularitățile anatomice și compoziția chimică a celor două produse vegetale. S-a constatat că pe parcursul maturizării frunzelor apar modificări ale conținutului de principii active. Metodologia de obținere a gemoderivatului a permis solubilizarea în proporții diferite a celor mai importante principii active din mugurii folosiți ca materie primă vegetală în obținerea acestuia.

BIBLIOGRAFIE

1. BRUNETON J - *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes medicinales*, TEC&DOC, Paris, 2005, 364-365.
2. GIRD CE - *Antociani. Valoarea terapeutică și nutritivă a speciilor genului Ribes*, Editura Artprint, București, 2004, 73-90.
3. GIRD CE, DUȚU L, POPESCU ML et al - *Farmacognozie, Baze practice*, Editura Universitară "Carol Davila", București, 2005, vol. I:71, 113-115, 145-146.
4. ISTUDOR V - *Farmacognozie, Fitochimie, Fitoterapie*, Editura Medicală, București, 1998, vol. I:117-118
5. STĂNESCU U, HÂNCIANU M, MIRON A et al - *Plante medicinale de la A la Z, monografii ale plantelor de interes terapeutic*, Editura "Gr. T. Popa", Iași, 2004, vol. II:484-486.
6. TĂMAȘ M - *Botanică farmaceutică*, Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, 1999, vol. III:63.
7. TIȚĂ I - *Botanică farmaceutică*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 2003, 672.
8. WICHTL M, ANTON R - *Plantes therapeutiques, tradition, pratique officinale, science et therapeutique*, TEC&DOC, Paris, 1999, 471-473.
9. x x x, *PDR for Herbal Medicine*, Ed. Thomson, 2005, 97-99.
10. x x x, *Farmacopeea Română, ediția a X-a*, Editura Medicală, București, 1993, 1057, 1060, 1063.

Magyarországon előforduló Asteraceae fajok *in vitro* antiproliferatív hatásának szűrővizsgálata

Hajdú Zsuzsanna¹, Csupor-Löffler Boglárka¹, Hohmann Judit¹, Réthy Borbála², Zupkó István², Falkay György², Máthé Imre¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézet 6720, Szeged, Eötvös u. 6.

²Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet 6720, Szeged, Eötvös u. 6.

Aqueous and organic extracts of plants of Asteraceae family were screened for antiproliferative activity against human cell lines by MTT assay. Plants were collected or harvested from cultures in Hungary. The extracts were prepared with methanol, and were partitioned between n-hexane and chloroform. The residual plant materials were dried and extracted with boiling water. In total 436 extracts of different organs of fifty three species were examined on three human cell lines, HeLa (cervix epithelial adenocarcinoma), A431 (skin epidermoid carcinoma) and MCF7 (breast epithelial adenocarcinoma). Out of all investigated fractions 74 exhibited high (<50%), 164 showed moderate (25-50%) antiproliferative activity on the cell lines. Neither the water-methanol fractions of the methanolic extracts nor the aqueous extracts exhibited considerable antiproliferative activity.

A klinikai onkológiában biztonságosan használható, megfelelően hatásos tumorelleses gyógyszerek kifejlesztése a gyógyszeripari kutatások egyik fő törekvését jelenti napjainkban. Ezirányú kémiai szintézisek vezérmolekulái gyakran természetes eredetű vegyületek, amelyek felderítésének egyik lehetősége a növényi kivonatok szűrővizsgálata. A vizsgálatok első lépése a nyers extraktumok antiproliferatív aktivitásának mérése *in vitro*. Erre a célra széles körben alkalmaznak modellként különféle humán vagy állati sejtvonalakat. A vizsgált növények kiválasztásában népgyógyászati vagy kemotaxonómiai ismeretekre lehet támaszkodni.

Jelen dolgozatunkban természetes eredetű daganatellenes anyagok felkutatására irányuló kísérleteinkről számolunk be. 53, Asteraceae családba tartozó, Magyarországon előforduló, ill. termesztésbe vont ázsiai növény frakcionált kivonatainak (szervenkénti bontás után 109 növényi rész, 436 minta) antiproliferatív hatását vizsgáltuk három humán daganatos sejtvonalon *in vitro*. Kísérleti mintaként többségükben az Alföldön gyűjtött, egyes esetekben termesztésből származó vagy kereskedelembe beszerezhető növények metanolos kivonatainak folyadék-folyadék megosztással előállított *n*-hexános, kloroformos és 50%-os vizes-metanolos frakcióit, valamint vizes kivonatokat használtunk fel. A minták aktivitását emlőkarcinóma (MCF-7), cervixkarcinóma (HeLa) és epiteliális eredetű bőrkarcinóma (A431) sejteken teszteltük 10 µg/ml-es koncentrációban, a tumorelleses hatást kolorimetriás úton mértük.

Kísérleteink során 436 mintát felhasználva összesen 1308 mérést végeztünk. A 436 kivonat 3 sejtvonalon való tesztelésével 238 minta mutatott 25 % feletti aktivitást. Ebből 164 frakció 25 és 50 % közötti, míg 74 minta 50 % feletti aktivitással bír. A 25 és 50 % közötti, mérsékelt antiproliferatív aktivitást mutató eredmények 45,1%-a (74 minta) a kloroformos frakciókból, 16,2%-a (47 minta) a *n*-hexános frakciókból, 16,5 %-a (27 minta) az 50 %-os metanolos frakciókból, míg 9,8 %-a (16 minta) a vizes kivonatok közül került ki.

Az 50 % feletti eredmények 80,1 %-át (60 minta) a kloroformos, 16,2 %-át (12 minta) a *n*-hexános, valamint 2,7 %-át (2 minta) a vizes-metanolos frakciók adták. A vizes kivonással készült mintáknak egyike sem mutatott magas, 50 %-ot meghaladó aktivitást.

A három, különböző sejtvonalon végzett vizsgálatok összesített eredményei azt mutatják, hogy az egyes sejtvonalak között statisztikailag nincs szelektivitásbeli különbség. Az eltérő polaritású anyagokat tartalmazó mintákat tekintve azt látjuk, hogy a kloroformos, és a *n*-hexános frakciók között nagyobb arányban találhatók magas aktivitást mutató minták, mint az 50 %-os metanolos, illetve a vizes kivonatok között.

Szerzők köszönetet mondanak Dr. Rédei Tamásnak és Dr. Miklóssy-Vári Vilmosnak †, az MTA Vácrátóti Ökológiai és Botanikai Kutatóintézet munkatársainak a vadon termő növények azonosításáért, valamint a termesztett fajok rendelkezésünkre bocsátásáért.

Ecdysteroid isolation using rotation planar chromatography

A. Hunyadi¹, N. Tóth¹, G. Tóth², A. Simon², L. Polgár³, Mária Báthori¹

¹Department of Pharmacognosy, University of Szeged, Eötvös u. 6, P.O.Box 121, 6701 Szeged, Hungary

²Institute for General and Analytical Chemistry, Budapest University of Technology and Economics, Szt. Gellért tér 4, 1111 Budapest, Hungary

³Department of Ecotoxicology, Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Science, Herman O. u. 15, P.O.Box 102, 1525 Budapest, Hungary

Ecdysteroids are insect moulting hormones, occurring also in plants, where they probably act as a defensive mechanism against non adapted herbivores. The plants, moreover, contain these compounds in significantly higher amounts and structural variability, than insects. Ecdysteroids exert beneficial pharmacological effects on vertebrates (e.g. increasing protein synthesis without any of the common steroidal side effects, adaptogenic effect, antidiabetic effect etc.). Chemically, they are usually close related compounds with quite high polarity, thus their successful isolation needs the application of numerous consecutive steps of chromatographic methods with different selectivity.

Here we report the isolation of five ecdysteroids from the plant *Ajuga reptans* var. *reptans* (capitasterone, 20-hydroxyecdysone 3-acetate, ajugalactone, cyasterone and sengosterone). The isolation procedure involved a variety of different chromatographic methods, and, by the novel use of rotation planar chromatography, an improvement was achieved in the separation comparing to the earlier available methods.

The numbers of ecdysteroid-containing whole-plant preparations, dietary supplements and over-the-counter drugs have increased dramatically in the past few years. Use of these products is recommended for their adaptogenic, anabolic and stimulatory effects on the central nerve system. It has been repeatedly demonstrated that ecdysteroids are responsible for the therapeutic effects of these preparations, which contain mainly crude or partially-purified plant extracts or a mixture of ecdysteroids. *Leuzea*, *Pfaffia* species, *Cyanothis* species and *Polypodium vulgare* are used as natural plant sources for these preparations [4]. The available amounts of the such plant material are limited and other species are therefore needed to substitute them. *Ajuga* species are the most promising candidates from this aspect. The product Ecdisten® based on 20-hydroxyecdysone content has been approved by the Pharmaceutical Committee of Uzbekistan for medical use as a general tonic [1], while a total preparation based on the phytoecdysteroids of *Ajuga turkestanica* has been passed for clinical trial [3].

Ajuga reptans var. *reptans* is a very rich source of ecdysteroids. This species is characterized by a high accumulation and wide structural diversity of ecdysteroids. In an ongoing effort to identify the ecdysteroid constituents of *Ajuga reptans* var. *reptans*, an investigation of the ecdysteroids of its herb extract was undertaken.

This presentation describes a sophisticated procedure for isolation of the ecdysteroids of *Ajuga reptans* var. *reptans*, which employs repeated rotation planar chromatography to improve the isolation. The optimized combination of the mobile phase used in the consecutive steps of rotation planar chromatography resulted in the isolation of the characteristic ecdysteroids of *Ajuga reptans* var. *reptans*.

The structures of the pure compounds were elucidated by spectroscopic methods. The compounds isolated included several biologically important ecdysteroids containing a lactone ring and ecdysteroids with an additional oxo group at C-12.

EXPERIMENTAL

Plant material

Ajuga reptans var. *reptans* was grown in field of the 'PPI HAS' experimental facility. The whole plants without roots were collected in their blossoming stage, and then air-dried under laboratory conditions.

TLC Experiments

NP-TLC was performed on 20x20 cm plates coated with 0,2 mm layer of silica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phases were toluene-acetone-ethanol (96 %)-ammonia (25 %) (100:40:32:9, v/v/v/v) (System 1) or chloroform-methanol-benzene (25:5:3, v/v/v) (System 2) or ethyl acetate-ethanol-water (16:2:1, v/v/v) (System 3). The spots were visualized either by fluorescent quenching at 254 nm or after spraying with vanillin-sulfuric acid and observing in daylight or at 366 nm.

Rotation Planar Chromatography

A Harrison Model 8924 Chromatotron (Harrison Research, Palo Alto, CA) was used. The stationary phase was Silica gel 60 GF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany) (particle size 5-40 µm) coated manually on the rotor as a 1 mm layer and activated at 80 °C for 1 h. Previous TLC experiments served as a tentative guide for mobile phase selection. Stepwise development was performed with three mobile phases (300 ml each). System 1 was: chloroform-methanol-benzene (25:2.5:1.5, v/v/v) (A), chloroform-methanol-benzene (25:5:3, v/v/v) (B), methanol (C), System 2 was: ethyl acetate-ethanol-water (16:1:0.1, v/v/v) (A), ethyl acetate-ethanol-water (16:2:1, v/v/v) (B), ethyl acetate-ethanol-water (16:4:2, v/v/v) (C). After equilibration of the adsorbent with mobile phase A for 10 min a solution of the sample (200 mg) dissolved in the first elution solvent (5 ml) was introduced through the inlet. The mobile phase flow was 3-4 ml min⁻¹, 10 ml of the fractions were collected. The total elution time was therefore 90 min. The separation was controlled by inspection under UV illumination at λ = 254 nm. The separation of the fractions was verified by NP-TLC using System 1-3.

Low pressure liquid chromatography

Alumina Brockmann II. Neutral (Reanal, Budapest, Hungary) was packed into a glass column (900x350 mm). Mobile phases were a mixture of dichloromethane and methanol (95:5, 9:1, 85:15, 8:2, 7:3 v/v) using a stepwise gradient elution.

Reversed phase low-pressure column chromatography (RP-LP-CC) was carried out on endcapped C₁₈ silica (0.06-0.2 mm particle size) (Chemie Urticon-C-Gel, C-560) packed in a 420x35 mm glass column. Mobile phases were a mixtures of aqueous methanol solution 30-60 % using a stepwise gradient elution.

Solid phase extraction

Stationary phase: MN-polyamide SC 6 for column chromatography 0.06-0.16 mm (Woelm, Eshwege, Germany) was used for clean-up. Elution was made using water and water-methanol 8:2 v/v.

High-performance liquid chromatography

The system used for high-performance liquid chromatography (HPLC) consisted of a Shimadzu LC-10AS pump and a SPD-10A Shimadzu UV-vis detector. Zorbax-SIL column (5 µm, 250x4.6 mm i.d.) (DUPont, Paris, France) was used as stationary phase and eluted with dichloromethane-isopropanol-water (125:40:3) at flow rate of 1 ml/min. Chromatographic separations were monitored at 242 nm.

RESULTS

Isolation of ecdysteroids

Figure 1 and 2 show the scheme of isolation. The crude methanolic extract was subjected to prepurification. The principal procedures were preparative scale separation methods, such as fractionated precipitation, as well as liquid-liquid extraction and solid phase extraction (SPE).

Two consecutive precipitation steps with acetone removed the overwhelming majority of polar contaminant. The apolar impurities were removed by liquid-liquid extraction with *n*-hexane. The last step of prepurification was SPE on polyamide. The ration of sample to sorbent was relatively large, up to 1:5. The ecdysteroids can be eluted with water from polyamide, while the interfering flavonoids, other phenolic compounds and chlorophyll remain adsorbed on polyamide.

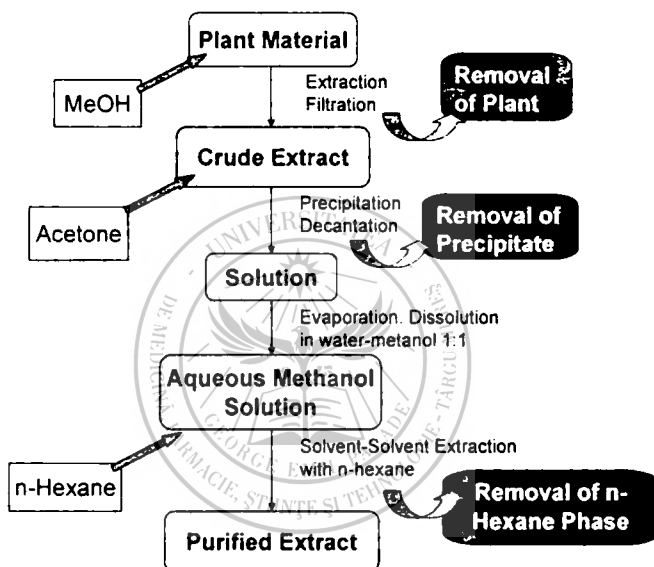


Figure 1. Flowsheet of the multistep clean-up of ecdysteroids of *Ajuga reptans* var. *reptans*

The prepurified extract contains even after precipitation, liquid-liquid extraction and solid phase extraction (SPE) a complex mixture of structurally related ecdysteroids, therefore their isolation required a series of chromatographic steps.

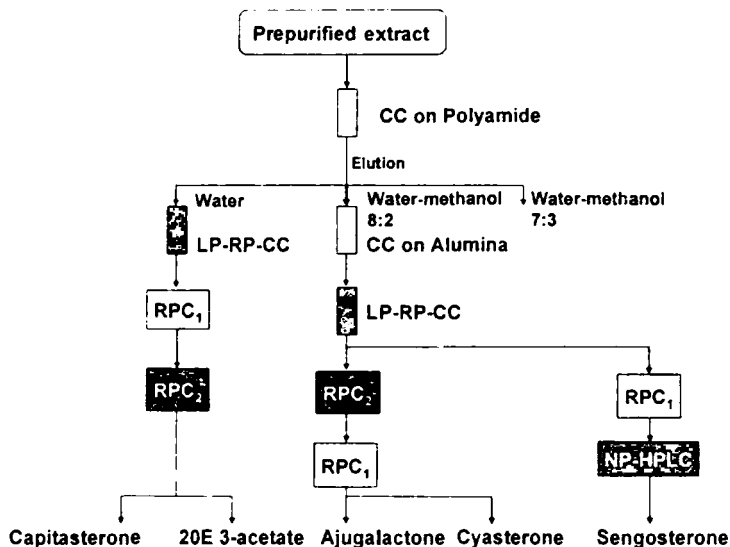


Figure 2. Essential steps of the isolation of ecdysteroids from the prepurified plant extract.

Ecdysteroids eluted with water from polyamide were further purified by low pressure reversed phase column chromatography (LP-RP-CC). Stepwise gradient elution was carried out with aqueous methanol solution from 30 % to 60 %, in each steps with a 5% increase of the methanol content in water. The ecdysteroids of interest were obtained at elution with 45 % of aqueous methanol. These fractions were purified by preparative rotation planar chromatography (RPC). System 1/A-C was used as mobile phases. The elution of compound 1 and 2 took place at the beginning of the separation eluted with chloroform-methanol-benzene (25:2.5:1.5, v/v/v). Pure compound 1 and 2 were obtained by repeated preparative RPC using ethyl acetate based solvent systems (System 2/A-B).

Ecdysteroids eluted with water-methanol (8:2, v/v) solution from polyamide were subjected to column chromatography on alumina. Fractions containing compound 3 and 4 (eluted with dichloromethane-methanol 9:1 and 85:15 v/v from alumina) were separated by low-pressure RP column chromatography (C₁₈). The elution was carried out with aqueous methanol solution similarly as before. Selected fractions eluted with 45 and 50 % of aqueous methanol were combined and further purified by preparative RPC. Fractions (containing compound 3 and 4) obtained by the first RPC were subjected a second rotation planar chromatographic separation. Different mobile phases were used in the consecutive steps. System 2/A-C were employed in the first case and System 1/A-C were used at the second RPC experiments. The repeated RPC with the combination of the optimized mobile phases resulted in a successful isolation of ecdysteroids 3 and 4. Figure 3 shows the thin layer chromatogram of the fractions obtained by repeated RPC.

Fractions eluted with 40 % of aqueous methanol from the second low pressure reversed phase column contains compound 5, which was purified by RPC (system 1/A-C). The Figure 4. shows the HPLC chromatogram of the crude RPC fraction (Figure 4/A) containing compound 5. This ecdysteroid was further purified by NP-HPLC with heart-cut method. Figure 4/B shows the NP-HPLC chromatogram of the pure compound 5.

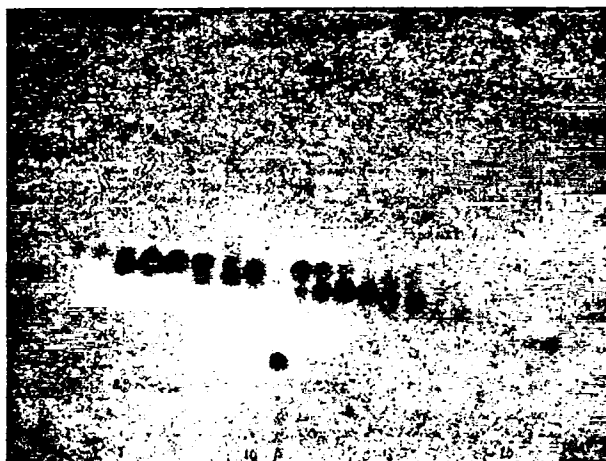


Figure 3. TLC analysis of fractions obtained by repeated rotation planar chromatography from the prepurified extract after low-pressure column chromatography on alumina and endcapped silica (C18). The stationary phase was TLS silica F254 20x20 cm, and the mobile phase was System 2. Fractions 6-7 and 13-14 contain compounds 2 and 3, respectively.

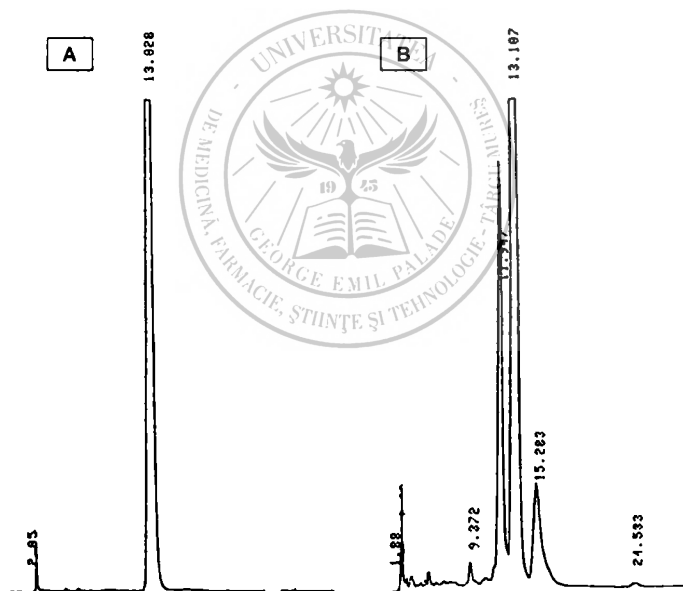


Figure 4. Analytical HPLC separation of fractions containing compound 5. NP chromatography was performed on Zorbax-SIL column (5 μ m) stationary phase packed into a 250 x 4.6 mm stainless steel column. The mobile phase was dichloromethane-isopropanol-water (125:40:3, v/v/v) with a flow rate of 1 ml/min.

The structures of the isolated compounds were elucidated by spectroscopic methods. Their chemical structures are given in Figure 5.

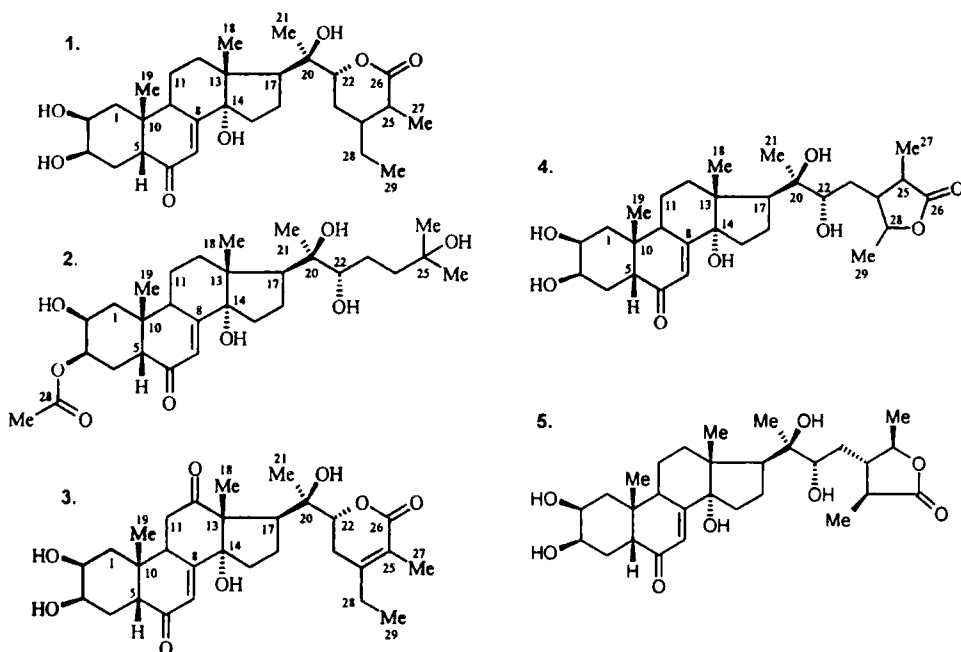


Figure 5. Structures of the isolated ecdysteroids. Numbers of compounds: 1. capitasterone, 2. 20-hydroxyecdysone 3-acetate, 3. ajugalactone, 4. cyasterone, 5. sengosterone

Compounds 1 and 2 were proven to be capitasterone and 20-hydroxyecdysone 3-acetate, and compound 3 was found to be ajugalactone. Compound 4 and 5 were identified as cyasterone and sengosterone. Publication on the detailed evaluation of their spectral data is in progress.

Table 1. TLC characteristics (R_f) of the isolated compounds.

Compound	$R_f \times 100$ in the Solvent System		
	1	2	3
Capitasterone (1)	45	68	70
20-Hydroxyecdysone 3-acetate (2)	51	67	68
Ajugalactone (3)	42	68	50
Cyasterone (4)	37	64	58
Sengosterone(5)	44	70	63

Table I gives the TLC characteristics (R_f) of the isolated compounds.

DISCUSSION

A sophisticated procedure for isolation of the ecdysteroids of *Ajuga reptans* var. *reptans* was developed. The isolation utilizes simple separation methods, such as fractional crystallization, liquid-liquid partition and SPE for clean-up and multistep chromatographic methods for the isolation of the ecdysteroids. The isolation of pure

ecdysteroids from the partially-purified plant extract was based on low-pressure normal-phase and reverse phase column chromatography on alumina and endcapped C₁₈ silica, respectively. The final purification was made by repeated use of preparative rotation planar chromatography and preparative HPLC. The earlier separation procedure of the ecdysteroids was improved by the use of rotation planar chromatography, which was performed on a silica gel stationary phase in circular mode. Our intent in using RPC was to develop a new simple and quickly separation method for the isolation of ecdysteroids which based on the different adsorption mechanism of the ecdysteroids and the interfering impurities. Repeated RPC experiments with different developing solvents showed that ecdysteroids of *Ajuga reptans* var. *reptans* could be separated by means of rather unpolar developing solvents than used in TLC experiments. A final eluting solvent with less solvent strength was elaborated to start the preparative separation by rotation planar chromatography (RPC). The optimized combination of the mobile phase used in the consecutive steps of rotation planar chromatography resulted in the proper isolation of the characteristic ecdysteroids of *Ajuga reptans* var. *reptans*. Use of three gradient step in a single run of RPC reduced solvent usage and analysis time.

Preparative rotation planar chromatography is a simple solid-liquid chromatographic method using forced-flow techniques in the preparative separation. The advantages of this method: the free choice of stationary phase, the adjustable volume of vapor phase and eluent flow-rate, and the optimization of developing solvent to be performed by conventional TLC are beneficial. Also the analytical RPC separation can be used to scale-up the on-line preparative RPC. Preparative rotation planar chromatography is an effective, inexpensive means of separating ecdysteroids in a complex plant extract with low solvent usage and less time-consumption.

Finally, because this chromatographic separation is a forced-flow method driven by centrifugal force, the separation is better than that obtained by convention planar chromatography, and so RPC is a very convenient procedure in the last purification step of the ecdysteroid isolation.

The compounds isolated included several biologically important ecdysteroids containing a lactone ring and ecdysteroids with uncommon oxo-group at C-12. They increase the protein synthesis in vertebrates [5] and posses high insect moulting effects on *Drosophyla melanogaster* B₁₁ test. Ajugalactone has a double activity: high insect hormone activity and antiponasterone A activity, too [2].

ACKNOWLEDGEMENT

This project was sponsored by grant of Tét Foundation (OMFB-00756/2005, JAP-22/02)

REFERENCES

1. BATHORI M, PONGRÁCZ Z - *Phytoecdysteroids - from isolation to their effects on humans*, Curr Med Chem, 2005, 12(2):153-172.
2. DINAN L - *Ecdysteroid structure-activity relationships*, in Atta-ur-Rahman (ed): Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 29, Elsevier, Amsterdam, 2003, 3-71.
3. KHALITOVA ZI, SYROV VN - *In prospects of the Creation of Drugs from the Raw Materials of Central Asia*, A Collection of Abstracts of Lectures at an International Conference [in russian], Tashkent, 1988, p10.
4. LAFONT R, DINAN L - *Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update*, J Ins Sci, 2003, 3:7.
5. SYROV VN, SAATOV V, SAGDULLAEV SHSH et al - *Study of the structure – anabolic activity relationship for the phytoecdysteroids extracted from some plants of central Asia*, Pharm Chem J 2001, 35:667-671.

Az oleánol- és az urzolsav előfordulása a Lamiaceae családban

Janicsák Gábor^{1*}, Veres Katalin², Kakasy András Zoltán³, Máthé Imre^{1,2}

^{1*} MTA Ökológiai és Botanikai Kutatóintézete, 2163 Vácrátót, Alkotmány út 2, Magyarország

² Szegedi Tudományegyetem, Farmakognóziai Intézete, Szeged, Magyarország

³ Semmelweis Egyetem, Farmakognóziai Intézete, Budapest, Magyarország

* Corresponding author. Tel.: +36 28 360122; fax.: +36 28 360110

E-mail address: janicsak@botanika.hu

The oleanolic and ursolic acid contents from 88 taxa of Lamiaceae (19 genera, 66 species, 8 subspecies, 9 varieties and 5 hybrids) were investigated gas chromatographically. Both triterpenoid acids were present in all of the investigated taxa, but the plants belonging in the subfamily Nepetoideae produced significantly higher amounts than those in the subfamily Lamioideae. The oleanolic acid content ranged from traces to 1.840% dry weight, and that of ursolic acid from traces to 4.019% dry weight.

Keywords: Lamiaceae; Subfamily Lamioideae; Subfamily Nepetoideae; Triterpenoids; Oleanolic acid; Ursolic acid; Chemotaxonomy; Gas chromatography.

Kulcsszavak: Lamiaceae; Lamioideae alcsalád; Nepetoideae alcsalád; triterpenoidok; oleánolsav; urzolsav, kemotaxonómia; gázkromatográfia

Az oleánolsav (OS) és az urzolsav (US) gyakori összetevője a növényeknek. Szaponinok aglikonjaként és szabad savakként egyaránt előfordulnak. Széleskörű elterjedésüket bizonyítja, hogy az egyik legtöbb gyógynövényt magába foglaló Lamiaceae családdal kapcsolatos publikációk, az egyéb hatóanyagok mellett, többnyire e két triterpén jelenlétéről is beszámolnak [Mendes és mtsai, 1989; Bruno és Ciriminna, 1993; Kuo és mtsai, 2000; Ryu és mtsai, 2000; Tezuka és mtsai, 2000; Tan és mtsai, 2002]. Mind az OS, mind az US, több fontos biológiai hatással rendelkezik. Ezek hasonlósága a közeli kémiai szerkezettel magyarázható. A szakirodalomban számos adat bizonyítja a két vegyület gyulladásgátló [Safayhi és Sailer, 1997; Baricevic és mtsai, 2001], májvédő [Liu és mtsai, 1995], rákellenes [Ovesna és mtsai, 2004], HIV ellenes [Kashiwada és mtsai, 1998], mikrobellenes [Mallavadhani és mtsai, 2004], gombaellenes [Rocha és mtsai, 2004], gasztroprotektív [Rodriguez és mtsai, 2003], vércukorszint csökkentő [Perez és mtsai, 1998] és vérlipidszint csökkentő [Ma, 1982] tulajdonságát. Alacsony toxicitásuk miatt kozmetikai és táplálkozás kiegészítő készítményeknek is kedvelt alkotórészei [Liu, 1995]. A vizsgált fajok szűk köre és a többnyire inkább csak kvalitatív információk következtében az OS és az US Lamiaceae-családbeli elterjedéséről nem áll elegendő adat a rendelkezésünkre. Erdtman (1945) a Lamiaceae családot a pollenek morfológiai jellemzői alapján Lamioideae és Nepetoideae alcsaládra osztotta. A Lamioideae-t Cantino és mtsai (1992) a későbbiekben a következő alcsaládokra osztották tovább: Ajugoideae, Chloanthoideae, Lamioideae, Pogostemonoideae, Scutellarioideae, Teucrioideae és Viticoideae. Erdtman szerint a Nepetoideae és a Lamioideae fajok kémiai sajátágaiban számos különbség mutatható ki. Jelentős az eltérés az illóolaj, a rozmaryn- és kávéssav, a fenil-etanoid glikozidok és a betainok mennyiségében, illetve minőségében [Cantino és Sanders, 1986; Máthé és mtsai, 1993; Blunden és mtsai, 1996; Máthé, 1997; Janicsák és mtsai, 1999; Pedersen, 2000; Grayer és mtsai, 2003; Hohmann és mtsai, 2003].

Korábbi denzitometriás szűrővizsgálatainkkal kimutattuk, hogy az OS/US tartalom tekintetében szignifikáns a mennyiségi különbség az Erdtman szerinti Lamioideae és

Nepetoideae alcsaládok között. Ezért célul tűztük ki az OS és az US mennyiségének részletes vizsgálatát a két alcsalád általunk begyűjthető fajaiban.

A közeli kémiai szerkezet lehetetlenné teszi a két triterpén vékonyréteg kromatográfiás (VRK) szétválasztását. Ezért az általunk korábban kidolgozott gázkromatográfiás (GC) módszert alkalmaztuk [Janicsák és mtsai, 2003] a rendelkezésünkre álló 88 Lamiaceae taxon OS és US tartalmának meghatározására.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényanyag: A vizsgált Lamiaceae taxonok föld feletti részét (4 *Dracocephalum* faj esetén csak levelét) 1999 júliusában gyűjtöttük Magyarországon, Vácrátóton az MTA Ökológiai és Botanikai Kutatóintézete Kísérleti területén. A helyszín Budapesttől északra, 30 km-re terül el. Éghajlata kontinentális, éves átlaghőmérséklete 10,3 °C, évi átlagos csapadékmennyiség 525 mm. A növényeket botanikus kerti magcsere keretében beszerzett szaporítóanyagból neveltük. Azonosításukat kutatócsoportunk botanikusa végezte. A mintapéldányokat Intézetünk herbáriumában őrizzük. A begyűjtött növényeket 40 °C-on szárítottuk.

Kivonás és vizsgálat: A porított mintákat (0,8 g) Soxhlet készülékben, metanollal (90 ml) 6 órán keresztül extraháltuk. A kapott kivonatokat metanollal 100 ml-re egészítettük ki (törzsoldat).

A minták előtisztítása (SPE) során 4 ml vizet adtunk a törzsoldatok 1 ml-éhez. Az így kapott 5 ml 20%-os vizes metanolos oldatokat Chromabond SB oszlopokra vittük. Az SPE eljárás pontos leírása egy korábbi dolgozatunkban található meg [Janicsák és mtsai, 2003].

Az SPE-vel tisztított minták szililezését a minta oldatok 80 °C-on történt bepárlását követően végeztük el. A 1,5 ml-es térfogatú üvegcsékben (La Pha Pack, Németország) lévő száraz maradékokat 200 µl vízmentes piridinben (Fluka, Németország) oldottuk fel, majd származékképzés céljából 400 µl 1% trimetilkloroszilán tartalmú N,O-bisz(trimetilszilil)-trifluoroacetamidot (Supelco, USA) adtunk hozzájuk. A szililezés teljessége érdekében mintáinkat 2 órán át 80 °C-on melegítettük.

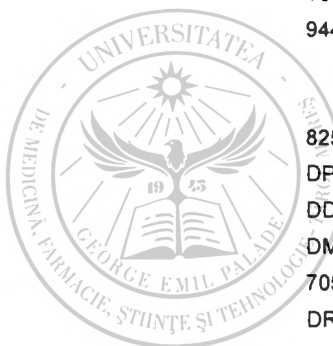
A gázkromatográfiás vizsgálatokat HP 5890 Series II típusú műszerrel (Hewlett Packard / jelenleg Agilent Technologies/, USA) végeztük. A készülék lángionizációs detektorral (FID) volt ellátva. Az egyéb mérési paraméterek a következők voltak: kolonna: HP 5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm); megosztási arány: 1:10; vivőgáz: nitrogén; injektor, detektor és a kolonna hőmérséklete: 300 °C; fejnnyomás: 8 psi; injektált térfogat: 1,0 µl; vizsgálati idő/minta: 22 perc.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

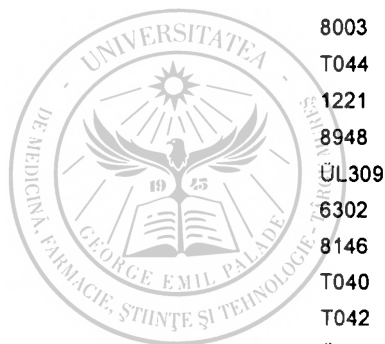
A Cantino és munkatársai (1992) által kialakított Lamioideae alcsaládból 14, a Nepetoideae-ből 52 faj vizsgálatát végeztük el. Ugyanakkor a Cantino féle rendszer további 6 alcsaládját, melyek részei az Erdtman (1945) szerinti Lamioideae alcsaládnak, egyetlen taxon sem képviselte. A tanulmányozott taxonokat a hozzájuk tartozó OS és US tartalmi értékekkel az I-es táblázat mutatja be. Amint az korábbi eredményeink [Máthé, 1997] alapján várható volt, az OS és az US mennyisége a Lamioideae fajokban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Nepetoideae alcsaláddhoz tartozó taxonokban. A korábban Lamiaceae fajokban mért rozmaring- és kávésav értékekkel [Janicsák, 1999] összevetve, jelen esetben kisebb különbségeket találtunk az alfajok és a nemzetségek szintjén. Például a *Salvia nemorosa* (OS: 0,265-0,441%; US: 0,925-1,306%) és a *Dracocephalum* fajok (OS: 0,051-0,269%; US: 0,260-0,817%) esetén.

I. Táblázat A vizsgált Lamiaceae taxonok oleánol- és urzolsav tartalma (g/100g-ban)

Lamiaceae taxonok	Kód	OS	US
LAMIOIDEAE alcsalád			
<i>Ballota nigra</i> L.	9446	0,013	0,039
<i>Leonurus cardiaca</i> L.	9779	*	0,016
<i>Marrubium alysson</i> L.	8201	0,009	0,014
<i>M. incanum</i> Desr.	8676	*	0,008
<i>M. peregrinum</i> L.	8570	0,036	0,040
<i>M. supinum</i> L.	L1336	*	*
<i>M. thessalum</i> Boiss. Et Heldr.	8202	0,009	0,017
<i>M. vulgare</i> L.	9960	*	0,030
<i>Phlomis tuberosa</i> L.	T/020	*	0,027
<i>Physostegia virginiana</i> (L.) Benth.	ÜL418	*	0,009
<i>Sideritis syriaca</i> L.	8253	0,059	0,068
<i>Stachys grandiflora</i> (Stev.) Benth.	L918	*	*
<i>S. sylvatica</i> L.	T046	0,031	0,036
<i>S. officinalis</i> (L.) Trevis.	9446	0,013	0,014
NEPETOIDEAE alcsalád			
<i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi	8254	0,075	0,263
+ <i>Dracocephalum bipinnatum</i> Rupr.	DP99	0,166	0,494
+ <i>D. diversifolium</i> Rupr.	DD99	0,254	0,817
+ <i>D. moldavica</i> L.	DM99	0,051	0,260
<i>D. peregrinum</i> L.	7053	0,269	0,722
+ <i>D. rupestre</i> Hance	DRP99	0,127	0,502
<i>D. ruyschiana</i> L.	6535	0,246	0,674
<i>Elsholtzia strauntonii</i> Benth.	L676	0,118	0,398
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	8697	0,139	0,314
<i>H. officinalis</i> L. l. <i>ruber</i> (Mill.) Gams	9747	0,150	0,350
<i>H. officinalis</i> L. l. <i>cyaneus</i> Alef.	8272	0,154	0,378
<i>H. officinalis</i> L. l. <i>albus</i> Alef.	8273	0,202	0,547
<i>H. officinalis</i> L. ssp. <i>montanus</i> (Jordan et Fourr.) Briq.	1347	0,352	0,719
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	L775	0,479	1,397
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. 'Munstead'	L1030	0,334	0,911
<i>L. angustifolia</i> Mill. ssp. <i>pyrenaica</i> (DC.) Guinea	L979	0,409	1,279
<i>Melissa officinalis</i> L.	L570	0,140	0,581
<i>Melissa officinalis</i> L. cultivar	9181	0,142	0,531
<i>M. officinalis</i> L. cv. Lemon Balm.	9285	0,114	0,411
<i>M. officinalis</i> L. ssp. <i>altissima</i> (Sibth. & Sm.) Arc.	L981	0,063	0,218
<i>Monarda citriodora</i> Cerv.	L561	0,120	0,175



<i>M. didyma</i> L.	8225	0,069	0,187
<i>M. fistulosa</i> L.	8227	0,038	0,071
<i>Nepeta cataria</i> L.	9062	0,213	0,516
<i>N. grandiflora</i> M.B.	9065	0,529	0,935
<i>N. mussinii</i> Spreng.	6547	0,051	0,104
<i>N. pannonica</i> L.	L828	0,080	0,182
<i>Nepeta x faassenii</i> Berg.	9163	1,416	2,923
<i>Origanum heracleoticum</i> L.	L588	0,060	0,129
<i>Origanum kopetdagense</i> A. Boriss.	L592	0,145	0,482
<i>O. tyttanthum</i> Gautsch.	L587	0,059	0,147
<i>Salvia aethiops</i> L.	10627	0,017	0,054
<i>S. amplexicaulis</i> Lam.	8070	0,328	1,055
<i>S. argentea</i> L.	8305	0,116	0,218
<i>S. austriaca</i> Jacq.	8164	0,025	0,049
<i>S. candidissima</i> Vahl	1262	0,041	0,064
<i>S. deserta</i> Schang.	ÜL29	0,333	0,637
<i>S. dumetorum</i> Andr.	8001	0,129	0,450
<i>S. dumetorum</i> Andr. fl. <i>Rosea</i>	8582	0,065	0,154
<i>S. fugax</i> Pobed.	8003	0,192	0,434
<i>S. glutinosa</i> L.	T044	0,056	0,120
<i>S. hians</i> Royle	1221	0,220	0,597
<i>S. jurisicii</i> Kos.	8948	0,627	0,117
<i>S. kuznetzovii</i> Sosn.	ÜL309	0,111	0,216
<i>S. lavandulifolia</i> Vahl.	6302	1,840	4,019
<i>S. nemorosa</i> L.	8146	0,441	0,925
<i>S. nemorosa</i> L. l. <i>albiflora</i> Schur.	T040	0,292	0,950
<i>S. nemorosa</i> L. l. <i>coerulea</i> Priszter	T042	0,150	0,507
<i>S. nemorosa</i> L. ssp. <i>illuminata</i> (Klokov) Soó	ÜL307	0,328	1,261
<i>S. nemorosa</i> L. ssp. <i>moldavica</i> (Klokov) Soó	8037	0,265	0,943
<i>S. nemorosa</i> L. ssp. <i>tesquicola</i> (Klokov et Pobed.) Soó	7006	0,415	1,306
<i>S. nubicola</i> Wall.	T059	0,128	0,387
<i>S. nutans</i> L.	10142	0,148	0,364
<i>S. officinalis</i> L.	5676	1,559	3,825
<i>S. pratensis</i> L.	8156	0,120	0,256
<i>S. pratensis</i> L. ssp. <i>bertolonii</i> (Vis.) Soó	6899	0,339	0,533
<i>S. przewalskii</i> Maxim.	L747	0,140	0,391
<i>S. sclarea</i> L.	10622	0,045	0,145
<i>S. x simonkaiana</i> Borb.	6617	0,201	0,567
<i>S. staminea</i> Benth.	L1518	0,165	0,066
<i>S. x sylvestris</i> L.	6999	0,186	0,558
<i>S. tomentosa</i> Mill.	8007	0,362	1,047
<i>S. transsylvanica</i> (Schur) Schur	7008	0,320	0,758



<i>S. verbenaca</i> L.	L1716	0,393	0,313
<i>S. verticillata</i> L.	8182	0,579	0,594
<i>S. verticillata</i> L. ssp. <i>amasiaca</i> (Freyn et Bornm.) Bornm.	ÜL175	0,392	0,998
<i>S. virgata</i> Jacq.	6319	0,293	0,354
<i>S. viscosa</i> Jacq.	1077	0,101	0,137
<i>Satureja coerulea</i> Janka	6558	0,176	0,644
<i>S. montana</i> L.	6562	0,131	0,490
<i>Thymus serpyllum</i> L.	L1646b	0,368	1,398
<i>T. vulgaris</i> L.	L1645a	0,265	0,643
<i>T. x citriodorus</i> (Pers.) Schreb.	T061	0,174	0,517
<i>T. x citriodorus</i> (Pers.) Schreb. 'Variegata'	T062	0,214	0,526

* nyomokban

* csak a leveleket vizsgáltuk

Az OS mennyisége a még kimutatható (*Leonurus cardiaca*, *Marrubium incanum*, *M. supinum*, *M. vulgare*, *Phlomis tuberosa*, *Physostegia virginiana*, *Stachys grandiflora*) és az 1,840%-os érték (*Salvia lavandulifolia*) között változott. Magas OS szintet produkáló növények voltak még a *Salvia officinalis* (1,559%) és a *Nepeta x faassenii* (1,416%). Alacsony volt az OS tartalom a *Marrubium alysson* (0,009%) és a *M. thessalum* (0,009%) esetén. Korábbi jelzésünknek megfelelően a leggyengébb OS produkcióval bíró taxonok kivétel nélkül a Lamioideae alcsaládba tartoztak.

Három *Salvia* faj (*S. jurisicii*, *S. staminea* és a *S. verbenaca*) kivételével, az US szintje a vizsgált mintákban mindig magasabb volt, mint az OS-é. Az US tartalom a kimutathatósági határ és 4,019% között változott. A Lamioideae fajok közül a legalacsonyabb US tartalmi értékeket a *Marrubium supinum* és a *Stachys grandiflora* (nyomokban), míg a legmagasabbakat a *Sideritis syriaca* (0,068%) mutatta. A Nepetoideae alcsaládban a *Salvia austriaca* minimumot (0,049%) a *Salvia lavandulifolia* maximumot (4,019%) produkált.

Magas (2,5% felett) volt az US koncentrációja a *Nepeta x faassenii* és a *Salvia officinalis* esetén. A Nepetoideae alcsaládban viszonylag magas US szinteket a *Lavandula angustifolia* (1,397%), *Lavandula angustifolia* ssp. *pyrenaica* (1,279%), *Salvia amplexicaulis* (1,055%), *S. nemorosa* ssp. *illuminata* (1,261%), *S. nemorosa* ssp. *tesquicola* (1,306%), *S. tomentosa* (1,047%) és a *Thymus serpyllum* (1,398%), míg alacsonyakat a *Monarda fistulosa* (0,071%), *Salvia aethiopis* (0,054%), *S. candidissima* (0,064%) és a *S. staminea* (0,066%) taxonokban találtunk.

A két triterpén karbonsavat minden vizsgált növényből kimutattuk. Azonban, hasonlóan más kemotaxonómiai markerekhez, például rozmaringsav, kávéssav, betainok, illóolaj komponensek, feniletanoid glikozidok [Máthé és mtsai, 1993; Blunden és mtsai, 1996; Máthé, 1997; Janicsák és mtsai, 1999; Hohmann és mtsai, 2003], az OS és az US mennyiségében is szignifikáns különbség mutatkozott a két rendszertani egység között. A Lamioideae alcsalád mind az OS, mind pedig az US mennyiségében szegényebbnek mutatkozott, mint a Nepetoideae. A két alcsalád átlagértékei a következők voltak: Lamioideae OS: 0,012%, US: 0,023%; Nepetoideae OS: 0,263%, US: 0,638%.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönjük Miklósi Vári Vilmosnak[†] és Galántai Miklósnak[†], hogy biztosították részünkre a növényanyagot, továbbá az Országos Tudományos Kutatási Alapnak (OTKA) a pályázatok (F029249 és T043148) formájában megnyilvánuló anyagi támogatást.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. BARICEVIC D, SOSA S, DELLA LOGGIA R et al - *Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid*, J Ethnopharmacol, 2001, 75: 125-132
2. BLUNDEN G, YANG MH, YUAN ZX et al - *Betaine distribution in the Labiatae*, Biochem Syst Ecol, 1996, 24: 71-81
3. BRUNO M, CIRIMINNA R - *Triterpenoids from Salvia aegyptiaca*, Fitoterapia, 1993, 64: 275-276
4. CANTINO PD, HARLEY RM, WAGSTAFF SJ - *Genera of Labiatae: status and classification*, in Harley RM, Reynolds T (eds): *Advances in Labiate Science*, Royal Botanic Gardens, Kew, 1992, 511-522
5. CANTINO PD, SANDERS RW - *Subfamilial classification of Labiatae*, Syst Bot, 1986, 11: 163-185
6. ERDTMAN G - *Pollen morphology and plant taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae and Avicennaceae*, Svensk Bot Tidskr, 1945, 39: 279-285
7. GRAYER RJ, ECKERT MR, VEITCH NC et al - *The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae*, Phytochemistry, 2003, 64: 519-528
8. HOHMANN J, RÉDEI D, MÁTHÉ I et al - *Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from Salvia officinalis*, Biochem Syst Ecol, 2003, 31: 427-429
9. JANICSÁK G, MÁTHÉ I, MIKLÓSI VV et al - *Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species*, Biochem Syst Ecol 1999, 27: 733-738
10. JANICSÁK G, VERES K, KALLAI M et al - *Gas chromatographic method for routine determination of oleanolic and ursolic acids in medicinal plants*, Chromatographia, 2003, 58: 295-299
11. KASHIWADA Y, WANG HK, NAGAO T et al - *Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids*, J Nat Prod, 1998, 61: 1090-1095
12. KUO YH, LEE SM, LAI JS - *Constituents of the whole herb of Clinopodium laxiflorum*, J Chin Chem Soc, 2000, 47: 241-246
13. LIU J, LIU YP, KLAASSEN CD - *Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver-injury in mice*, Acta Pharm Sinic, 1995, 16: 97-102
14. Ma BL - *Hypolipidemic effects of oleanolic acid*, Trad Med Pharmacol, 1982, 2: 28-29
15. MALLAVADHANI UV, MAHAPATRA A, JAMIL K et al - *Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains*, Biol Pharm Bull, 2004, 27: 1576-1579
16. MÁTHÉ I JR, MIKLÓSI VV, MÁTHÉ I et al - *Essential oil content as chemotaxonomic marker for the genus Salvia with reference to its variation in Salvia officinalis L.*, Acta Horticultur, 1993, 330: 123-131
17. MÁTHÉ I - *Some aspects of recent researches on Lamiaceae species in Hungary*, Arch Farm (Beograd), 1997, 5: 395-404
18. Mendes E, Marco JL, Rodríguez B et al - *Diterpenoids from Salvia candelabrum*, Phytochemistry, 1989, 28: 1685-1690
19. Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K et al - *Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds*, Neoplasma, 2004, 51: 327-333
20. PEDERSEN JA - *Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy*, Biochem Syst Ecol, 2000, 28: 229-253

21. PEREZ RM, PEREZ C, PEREZ S et al - *Effect of triterpenoids of Bouvardia terniflora on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice*, Phytomedicine, 1998, 5: 475-478
22. ROCHA AD, DE OLIVEIRA AB, DE SOUZA FILHO JD et al - *Antifungal constituents of Clytostoma ramentaceum and Mansoa hirsuta*, Phytother Res, 2004, 18: 463-467
23. RODRIGUEZ JA, ASTUDILLO L, SCHMEDA-HIRSCHMANN G - *Oleanolic acid promotes healing of chronic gastric lesions acetic acid-induced in rats*, Pharmacol Res, 2003, 48: 291-294
24. RYU SY, OAK MH, YOON SK et al - *Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of Prunella vulgaris*, Planta Med, 2000, 66: 358-360
25. SAFAYHI H, SAILER ER - *Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes*, Planta Med, 1997, 63: 487-493
26. TAN N, KALOGA M, RADTKE OA et al - *Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from Salvia cilicica and their antileishmanial activities*, Phytochemistry, 2002, 61: 881-884
27. TEZUKA Y, STAMPOULIS P, BANSKOTA AH et al - *Constituents of the Vietnamese medicinal plant Orthosiphon stamineus*, Chem Pharm Bull, 2000, 48: 1711-1719



Áfonya fajok fenoloidjainak összehasonlító vizsgálata

Alberti Á. ^{1*}, Vukics V. ¹, Hevesi Tóth B. ¹, Csedő K. ², Szőke É. ¹, Kéry Á. ¹

¹ Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézet, Budapest Üllői út 26. 1085

² Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Marosvásárhely

* Kapcsolattartó szerző.

Tel.: +36 1 459 1500 x 5201, E-mail cím: alberti@drog.sote.hu

During revaluation of traditional herbal remedies Vaccinium species come to the front again. Their biological values relate with their rich content of phenoloid compounds, such as flavonoids, polyphenols and anthocyanins. Vaccinium species have a number of known biological effects, due to their potent antioxidant activity. Therefore the aim of our study was to determine contents of compounds mentioned above and to reveal their role in antioxidant capacity. Quantitative analyses have been carried out by spectrophotometry, flavonoid pattern of samples was determined by an HPLC method. To quantify antioxidant activity neutralization of free radicals (ABTS and DPPH) was followed up by spectrophotometry. We have found significant correlation between total polyphenol content and scavenger capacity of samples. Antioxidant activities of leaf samples were approximately equal, while that of fruit samples were one order of magnitude lower. Antioxidant capacity of certain phenoloids correlate principally to 3', 4' dihydroxilation of ring B and to conjugation of rings A and B.

Keywords: *Vaccinium, flavonoid, anthocyanin, polyphenol, antioxidant activity*

Napjainkban fokozott érdeklődés övezi a természetes antioxidánsokat, így az áfonya fajokat (*Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Vaccinium macrocarpon* Aiton; *Ericaceae*) is, hiszen rendkívül gazdagok antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező flavonoidokban, antociánokban és polifenolokban. Számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálatban igazolták kapilláris permeabilitást és fragilitást csökkentő hatásukat [1]. Antiatherogen ágensként hatva gátolják az atherosclerotikus plakkok kialakulásának patomechanizmusában szerepet játszó LDL- oxidációt és indukálják a hepatocyták LDL-receptor expresszióját, ezzel fokozva az LDL eliminációját a plazmából [2,6]. Az amerikai tőzegáfonya és a vörös áfonya A típusú procianidinjei gátolják a húgyúti fertőzésekben elsődleges patogén, az *Escherichia coli* baktérium P- fimbriáinak adhézióját az uroepithel sejtekhez [3-5]. Kettős vak, randomizált humán kísérletben leírták, hogy a *Vaccinium macrocarpon* terméséből készült gyümölcsle fogyasztása gátolta a baktériumok adhézióját a gyomor nyálkahártyájához, ezáltal szignifikánsan csökkentette a gyomorfekély fő okaként számon tartott *Helicobacter pylori* fertőzések előfordulását [8].

A *Vaccinium* fajoknak tehát fontos szerepe lehet a napjainkban egyre magasabb prevalenciájú kardiovaszkuláris megbetegedések és húgyúti fertőzések kiegészítő terápiájában és profilaxisában egyaránt.

Munkánk célja volt mintáink flavonoid-, polifenol- és antocián- tartalmának mennyiségi meghatározása, és az antioxidáns hatásban betöltött szerepük tisztázása.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Munkánk során három áfonya faj – fekete áfonya (*Vaccinium myrtillus* L.), vörös áfonya (*Vaccinium vitis-idaea* L.) és amerikai tőzegáfonya (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) levél- és termésmintáit vizsgáltuk. A vörös és fekete áfonya levélmintákat Romániában,

Erdélyben, 2004 augusztusában gyűjtötték be. Fekete áfonya levélmintákat kereskedelmi forgalomból is beszereztünk, a Fitopharma Kft.- től (Budapest) és az MDR2000 Bt.- től (Gödöllő). A vörös és fekete áfonya termésminták szintén kereskedelmi forgalomból származtak. A Kanadából származó amerikai tőzegáfonya levél- és termésmintákat a Pharmaforte Kft. (Budapest) bocsátotta rendelkezésünkre. (I. táblázat).

I. táblázat Vizsgált áfonya minták jelölése és rövidítése

V _{vi}	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> levél, Erdélyből	V _{mFr1}	<i>Vaccinium myrtilus</i> termés, aszalt
V _{mb1}	<i>Vaccinium myrtilus</i> levél, Erdélyből	V _{mFr2}	<i>Vaccinium myrtilus</i> termés, friss
V _{mH1}	<i>Vaccinium myrtilus</i> levél, Erdélyből	V _{maFr}	<i>Vaccinium macrocarpon</i> termés, Kanadából
V _{m3}	<i>Vaccinium myrtilus</i> levél, termesztett	V _{viFr}	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> termés
V _{m4}	<i>Vaccinium myrtilus</i> levél, termesztett		
V _{ma}	<i>Vaccinium macrocarpon</i> levél, Kanadából		

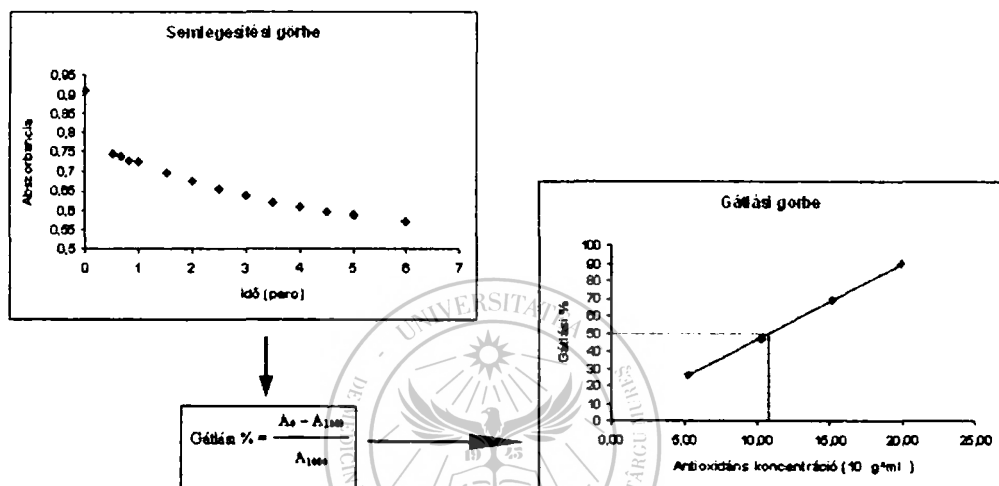
A levélminták összpolicenol-, flavonoid- és arbutintartalmát, illetve a termésminták összpolicenol- és antocián- tartalmát spektrofotometriásan, az 5. Európai Gyógyszerkönyv, illetve a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv előírásai szerint vizsgáltuk. Az abszorbancia értékek meghatározása Hitachi U-2000 spektrofotométerrel történt, a kvantitatív értékeket pirogallolban, hiperozidban, arbutinban illetve cianidin- 3- glükózid kloridban adtuk meg.

A HPLC vizsgálatokat Hypersil ODS (250*4,6 mm; 5µm) oszloppal, Jasco LG-980-02 gradiens programozóval, PU-980 pumpával, Jasco UV-975 UV-VIS detektorral és Rheodyne 7725i (20µl) injektorral felszerelt ABL&E Jasco rendszerben végeztük. A mozgófázis összetétele: acetonitril (A eluens) és 2,5 v/v%-os ecetsav (B eluens), áramlási sebessége 1,0 ml/perc volt. Izokratikus eluens összetételt (13% acetonitril és 87% ecetsav) alkalmaztunk 0-tól 5 percig, ezután lineáris gradiens következett a 35. percig, amikor a mozgófázis acetonitril tartalma elérte 18%-ot, majd 0,1 perc alatt a 100%-ot, amelyet a 40. percig tartottunk. Az eluenseket 0,22 µm pórusátmérőjű membránszűrőn (Millipore) szűrtük. A detektálást 340 nm-en végeztük, a jellemző komponensek UV-spektrumát 200–600 nm-ig terjedő tartományban vettük fel.

A mintákból 70 v/v%-os metanollal ultrahangos fürdőn készítettünk kivonatot (drog – oldószer arány: 1:20), amelyet vákuumbepárlón szárazra pároltunk, majd 70 v/v%-os,

HPLC minőségű metanolban oldottunk fel. Az oldatot Minisart RC-15 (20 μ m) fecskendő szűrőn szűrtük.

Mintáink antioxidáns aktivitását ABTS és DPPH mesterséges szabadgyökök semlegesítési reakciójával határoztuk meg [7]. Reaktív formájukban az ABTS és a DPPH rájuk jellemző hullámhosszokon ($\lambda_{\text{maxABTS}} = 734 \text{ nm}$ és $\lambda_{\text{maxDPPH}} = 515 \text{ nm}$) abszorpciós maximummal rendelkeznek. Oldataik színintenzitása arányos a jelenlévő szabadgyökök koncentrációjával. Hidrogéndonor vegyületek, pl. antioxidánsok jelenlétében a szabadgyökök redukálódnak, és oldatuk abszorpciója csökken. A szabadgyökök semlegesítését jellemző gátlási százalékat az abszorpciós érték csökkenésével fejeztük ki. Az antioxidáns aktivitást az 50%-os gátlási értékhez tartozó antioxidáns koncentráció reciprokával (EC_{50}^{-1} ; $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$) fejeztük ki (1. ábra).



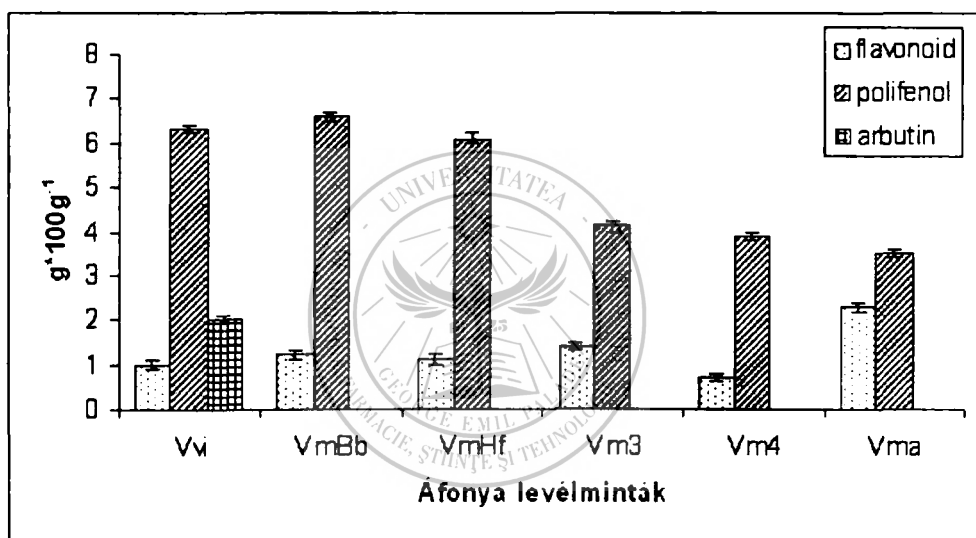
1. ábra Áfonyaminták antioxidáns aktivitását kifejező EC_{50} érték számítása

EREDMÉNYEK

A legnagyobb flavonoid- mennyiséget ($2,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) az amerikai tőzegáfonya levélénél mértük, míg a legkisebbet ($0,7 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) az egyik kereskedelemből beszerzett fekete áfonya mintánál. A többi levélminta közt jelentős eltérést nem tapasztaltunk. A vörös és a két gyűjtött fekete áfonya összpolicenol- tartalma szignifikánsan magasabbnak adódott, mint az amerikai tőzeg és a két kereskedelmi fekete áfonya levélmintáé. A vörös áfonya levél $2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ arbutint tartalmaz, míg a fekete és az amerikai tőzegáfonya levelek nem tartalmaznak arbutint (II. táblázat, 2. ábra).

II. táblázat Áfonya levélminták tartalmi anyagai (n = 3) Rövidítések jelentését lásd az I. táblázatban

	W _i	V _{mBb}	V _{mHf}	V _{m3}	V _{m4}	V _{ma}
Flavonid-tartalom (g*100g ⁻¹)	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1
Összpolifenol-tartalom (g*100g ⁻¹)	6,3 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	3,9 ± 0,3	3,5 ± 0,1
Arbutin-tartalom (g*100g ⁻¹)	2,0 ± 0,1	0	0	0	0	0



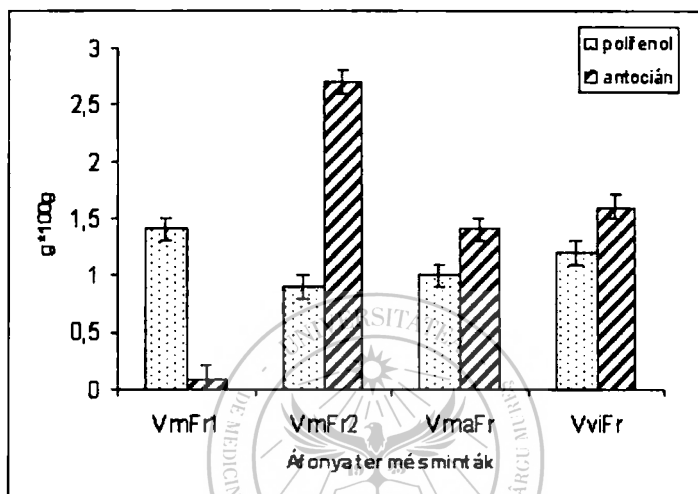
2. ábra Áfonya levélminták összpolifenol-, flavonoid- és arbutintartalma (n = 3)

Rövidítések jelentését lásd az I. táblázatban.

A termések flavonoid- tartalma a vártak megfelelően elhanyagolható volt. Összpolifenol- tartalmuk a levélmintákhoz képest kevesebb volt. Legmagasabb polifenol-tartalommal (1,4 g*100g⁻¹) az egyik fekete áfonya termés minta bírt. Az aszalt fekete áfonya termés antocián- tartalma (0,1 g*100g⁻¹) szignifikánsan kevesebbnek adódott, mint a többi termésé. Ennek oka, hogy szárítás közben az antocián vegyületek elbomlanak, illetve polimerizálódnak és ebben a formában már nem kinyerhetők a mintából. A legnagyobb antocián- tartalommal (2,7 g*100g⁻¹) a friss fekete áfonya termés rendelkezett (III. táblázat, 3. ábra).

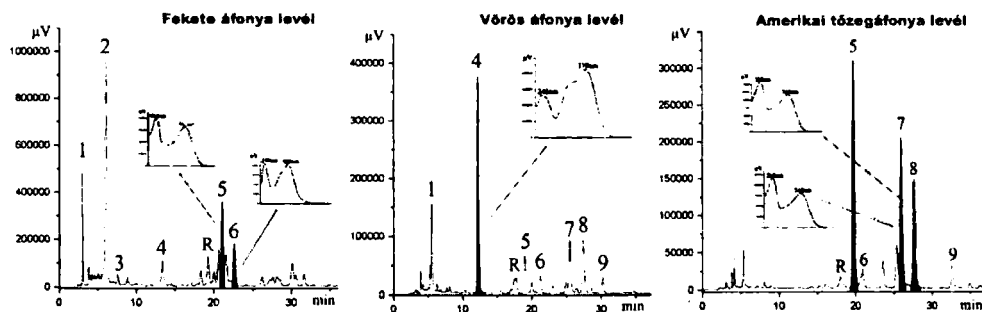
III. táblázat Áfonya termésminták tartalmi anyagai (n = 3) Rövidítések jelentését lásd az I. táblázatban

	VmFr1	VmFr2	VmaFr	VviFr
Összpolifenol- tartalom (g*100g ⁻¹)	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Antocián- tartalom (g*100g ⁻¹)	0,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,1



3. ábra Áfonya termésminták összpolifenol- és antociántartalma (n = 3)
Rövidítések jelentését lásd az I. táblázatban.

Az áfonya levélminták flavonoid ujjlenyomataira jellemző HPLC kromatogramokon a jellemző komponensek UV- spektrumait is feltüntettük (4. ábra).

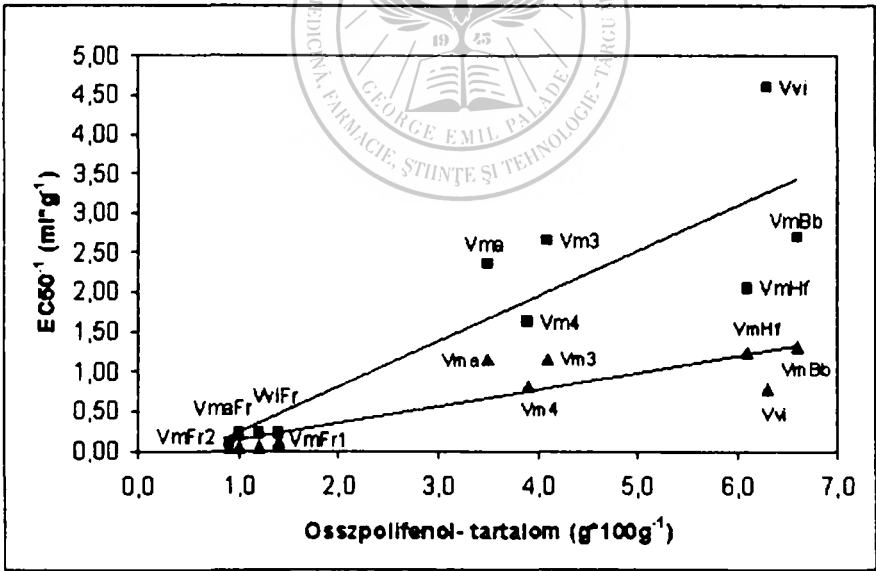


4. ábra *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L. és *Vaccinium macrocarpon* Aiton levél HPLC kromatogramja és jellemző komponenseinek UV- spektruma

A minták antioxidáns aktivitását az EC50⁻¹ értékkel fejeztük ki, változását az összpolicenol- tartalom függvényében ábrázoltuk (IV. táblázat, 5. ábra).

IV. táblázat *Vaccinium* levél- és termésminták antioxidáns aktivitása az összpolicenol- tartalom függvényében

	összpolicenol- tartalom (g*100g ⁻¹)	EC50 ⁻¹ DPPH (10 ⁵ ml*g ⁻¹)	EC50 ⁻¹ ABTS (10 ⁵ ml*g ⁻¹)
Vvi	6,3	0,79 ± 0,03	4,61 ± 0,14
VmBb	6,6	1,32 ± 0,03	2,7 ± 0,05
VmHf	6,1	1,24 ± 0,02	2,06 ± 0,06
Vm3	4,1	1,16 ± 0,03	2,66 ± 0,05
Vm4	3,9	0,81 ± 0,02	1,63 ± 0,06
Vma	3,5	1,16 ± 0,01	2,36 ± 0,07
VmFr1	1,4	0,11 ± 0,01	0,21 ± 0,01
VmFr2	0,9	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01
VmaFr	1,0	0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Wifr	1,2	0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,01



5. ábra Áfonya minták antioxidáns aktivitása (EC50⁻¹) az összpolicenol- tartalom függvényében. ▲ DPPH (R²=0,7658, p < 0,001), ■ ABTS (R²=0,7718, p < 0,001).

DISZKUSSZIÓ

A különböző áfonya fajok flavonoid kromatogramjai jellemző módon eltérnek egymástól, így megállapítható, hogy azok HPLC- módszerrel biztosan elhatárolhatók. A vörös áfonya levél jellemzésére a 4- es ($t_{R4} = 12,71$ perc), a fekete áfonya levél jellemzésére az 5-6- os ($t_{R5} = 20,07$ perc, $t_{R6} = 22,04$ perc) komponensek dominanciája, míg az amerikai tőzegáfonya levélre az 5-ös és a 7-8- as ($t_{R7} = 25,73$ perc, $t_{R8} = 27,51$ perc) komponensek dominanciája alkalmas. Mivel nem állt rendelkezésünkre a jellemző komponensek autentikus standardja, az összetétel az egyes csúcsok UV-spektruma alapján jellemezhető. Az addícióval is azonosított rutin mellett számos flavonoid komponenst detektáltunk. Ezek mindegyike a flavonoid vegyületek benzoil és cinnamoil molekularészeire jellemző elnyelési maximumértékeket mutatta – 240-280 nm illetve 300-380 nm tartományokban. A levélminták 1-2 nagyságrenddel jobb antioxidáns aktivitást mutattak, mint a termések. Ez az eredmény megfelelt várakozásainknak, hiszen az áfonya termések összpolicenol- és flavonoid- tartalma is lényegesen elmaradt a levélmintákétól. Összefüggést találtunk az áfonya minták összpolicenol- tartalma és antioxidáns kapacitása közt. Ez az összefüggés hiányzott a flavonoid és antocián komponenseknél. Ebből arra következtettünk, hogy mintáink antioxidáns hatása policenolos vegyületeik szinergizmusának köszönhető.

IRODALOMJEGYZÉK

1. BERTUGLIA S, MALANDRINO S, COLANTUONI A - *Effect of vaccinium myrtillus anthocyanosides on ischaemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation*, Pharmacol Res, 1995, 31: 183-187.
2. CHU YF, LIU RH - *Cranberries inhibit LDL oxidation and induce LDL receptor expression in hepatocytes*, Life Sci, 2005, 77: 1892-1901.
3. DI MARTINO P, AGNIEL R, DAVID K et al. - *Reduction of E. coli adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial*, World J Urol, 2006, 24: 21-27.
4. FOO LY, LU Y, HOWELL AB et al. - *The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli in vitro*, Phytochemistry, 2000, 54:173-181.
5. KONTIOKARI T, SUNDQVIST K, NUUTINEN M et al. - *Randomised trial of cranberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women*, BMJ, 2001, 322: 1571-1573.
6. LAPLAUD PM, LELUBRE A, CHAPMAN MJ - *Antioxidant action of Vaccinium myrtillus extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations*, Fundam Clin Pharmacol, 1997, 11: 35-40.
7. RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A et al. - *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free Rad Biol Med, 1999, 26: 1231-1237.
8. ZHANG L, MA J, PAN K et al. - *Efficacy of cranberry juice on Helicobacter pylori infection: a double-blind, randomized placebo-controlled trial*, Helicobacter, 2005, 10: 139-145.

Új dimenziók az ekdiszteroidok izolálásában

Liktor-Busa Erika¹, Simon András², Tóth Gábor², Máthé Imre¹, Báthori Mária¹

¹Szegedi Tudományegyetem, Farmakognózi Intézet, Szeged, Eötvös utca 6, H-6720, Magyarország

²Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémia Intézet, Budapest, Szt. Gellért tér 4. H-1111, Magyarország

Ecdysteroids, as steroid hormones of arthropods regulate moulting, metamorphosis, reproduction of insects. Phytoecdysteroids, compounds structurally related to zooeecdysteroids, are widely- distributed secondary constituents of plants. The occurrence of ecdysteroids in relatively large amounts in plant species has made investigation of their pharmacological effects possible. Ecdysteroids exert significant anabolic action without androgenic side-effects. Recent research on ecdysteroids has been intensified in consequence of their application in gene expression systems.

*One of the richest sources of ecdysteroids is *Serratula wolffii* (Andrae) from the family Asteraceae. This species biosynthesizes predominantly 20-hydroxyecdysone, the major ecdysteroid of plants, and a series of minor ecdysteroids.*

*We now report the isolation and structure determination of seven ecdysteroids from the roots of *Serratula wolffii*. The isolation of compounds from the methanol extract involves effective, simple clean-up and combined chromatographic procedures, including column chromatography on polyamide and octadecyl silica, RPC and preparative HPLC. The optimized combination of these procedures resulted in pure, biologically active ecdysteroids, such as ajugasterone C, dakrihainansterone, 20-hydroxyecdysone, stachysterone B and shidasterone. This presentation deals with the discovery of an ecdysone-related compound, 2 β ,3 β ,20R,22R,25-pentahydroxy-5 β -cholest-6,8(14)-dien and a new ecdysteroid, 20,22-didehydrotaxisterone. The structures of compounds were elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry.*

Az ekdiszteroidok a növényvilágban multikomponensű keverékek formájában fordulnak elő. Nagyfokú szerkezeti hasonlóságuk miatt az izolálás során a kromatográfias módszerek (preparatív TLC, oszlop-, flash kromatográfia, HPLC) optimalizált sorrendben történő kombinált alkalmazására van szükség.

Ezeknek a rovarokban felfedezett, vedlési hormon hatású molekuláknak mezőgazdasági és gyógyászati jelentősége is van. Farmakológiai hatásai közül a legkifejezettebb a fehérjeszintézist fokozó hatásuk, de nem rendelkeznek a gerinces endogén szteroidokra jellemző hormonális mellékhatásokkal. Az utóbbi években az ekdiszteroidok, mint génexpressziós rendszerek inducerei kerültek előtérbe.

Növényi nyersanyagunkban, a *Serratula wolffii*-ban magas koncentrációban és széles szerkezeti változatosságban vannak jelen ezek a vegyületek. Ismert, hogy a nagy mennyiségben jelen lévő ekdiszteroidok mellett a minor komponensek, köztük az anabolikus hatás szempontjából fontos 11-es helyzetben hidroxilezett ekdiszteroidok is fellelhetők ebben a növényfajban.

Munkánk célja a rotációs planar kromatográfia (RPC) tanulmányozása és az ekdiszteroid izolálási metodikába való bevezetése volt. Hatékony előtisztítást követően fordított fázisú oszlopkromatográfia és RPC optimalizált kombinációjával tiszta

ekdiszteroidokat sikerült izolálni. A minor komponensek spektroszkópiailag tiszta állapotban történő kinyerésére végső lépésként HPLC-t alkalmaztunk.

Kísérleti rész

Növényi nyersanyagunk a *Serratula wolffii* föld alatti része volt, amelyet az Agroherba Gyógynövénytermelő és Szolgáltató Kft. herencsényi bemutatókertjében termesztettek, a gyűjtés ideje 2003. augusztus vége.

Módszerek:

NP-TLC

NP-TLC kivitelezésére DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (E. Merck-Damstadt-Germany) állófázist alkalmaztunk. A kifejlesztő elegyek: 1. etilacetát-etanol-víz (80:10:5 v/v/v), 2. diklórmétán-metanol-benzol (25:5:3 v/v/v). Detektálás: első lépésben UV fényben 254 nm-en (CAMAG UV lámpa), majd vanillin-kénsavas előhívást követően 366 nm-en ill. természetes fényben.

Szilárd fázisú extrakció (SPE)

Az előtisztítást 0,05-0,16 mm szemcseméretű poliamid töltet MN-Polyamid SC 6 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) felhasználásával hajtottuk végre. Mozgófázisként víz-metanol eluensrendszert alkalmaztunk, gradiens elúciót végezve.

Alacsony nyomású oszlopkromatográfia (LP-RP-CC)

A fordított fázisú oszlopkromatográfiát 0,06-0,2 mm szemcseméretű (C18) kémiaiag kötött szilikagélén (Chemie Urticon-C-Gel C-560) hajtottuk végre, 30-60% víz-metanol eleggyel gradiens elúciót végezve.

RPC

Az RPC kivitelezéséhez Harrison Model 8924 Chromatotron (Harrison Research, Palo Alto, CA) alkalmaztuk. Állófázisként szilika gél 60 GF254 (E. Merck-Damstadt-Germany) fázist használtunk, melynek szemcsemérete 15 µm; a rétegvastagság 1mm volt.

Mozgófázisként két oldószer rendszert alkalmaztunk:

RPC1:

1/A: kloroform-metanol-benzol (50:3:2 v/v/v)

1/B: kloroform-metanol-benzol (50:5:3 v/v/v)

1/C: kloroform-metanol-benzol (50:10:6 v/v/v)

RPC2:

2/A: etilacetát-etanol-víz (80:2:1 v/v/v)

2/B: etilacetát-etanol-víz (80:5:2 v/v/v)

2/C: etilacetát-etanol-víz (80:10:5 v/v/v)

Az állófázis A jelzésű eluensrendszerrel történő 10 perces mosását követően vittük fel a mintát (A eluensrendszerben oldva) a szilikagélre. Az áramlási sebesség 4 ml/perc volt. 10 ml-s frakciókat gyűjtöttünk. A teljes elválasztás időtartalma 1 óra volt.

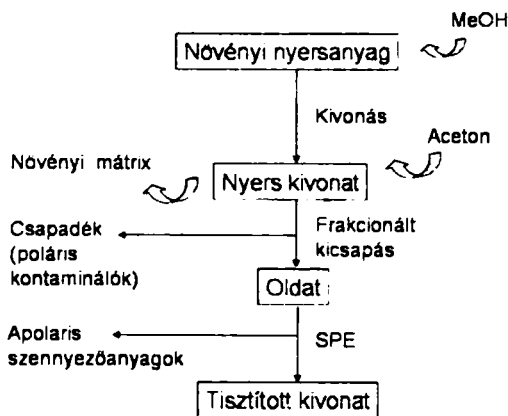
NP-HPLC

A HPLC megvalósításához Zorbax-Sil (9,4 mm x 250 mm-belső átmérő; 5 µm) (DUPont, Paris, France) állófázist használtunk. Mozgófázis ciklohexán:izopropanol:víz (100:40:3, v/v/v) eluensrendszer volt. A mozgófázis áramlását Shimadzu LC-10AS pumpa biztosította; a detektálás SPD-10A Shimadzu UV-VIS detektorral történt. A kromatográfiás elválasztást 245 nm-en követtük.

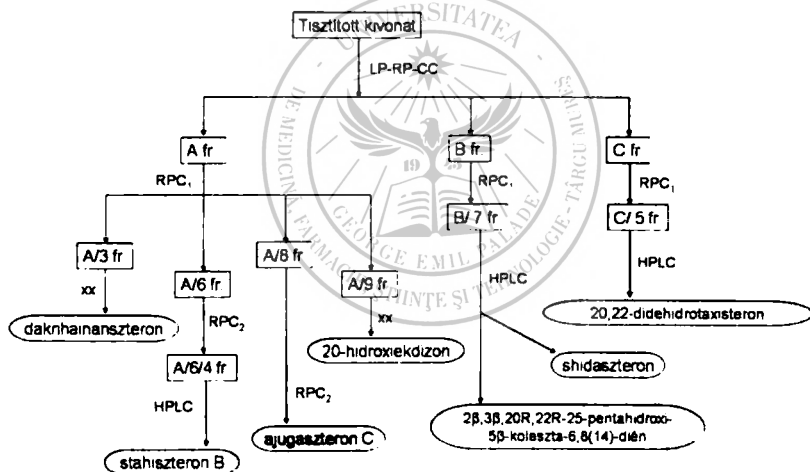
Eredmények – ekdiszteroidok izolálása

Az ekdiszteroidok izolálásának menetét az 1. 2. ábra mutatja be.

1. ábra: *Serratula wolffii* ekdiszteroidjainak előtisztítási sémája



2. ábra: Ekdiszteroidok tisztítása az előtisztított kivonatból



A középpoláris ekdiszteroidok kivonására metanolt alkalmaztunk. A metanolos kivonat előtisztítását egyszerű, hatékony elválasztás-technikai módszerekkel végeztük: frakcionált acetonos kicsapást, illetve szilárd fázisú extrakciót (SPE) használtunk. Az acetonos kicsapással a poláris kontamináló anyagoktól (cukrok, fehérjék) tisztítottuk meg a mintánkat. A szilárd fázisú extrakciót poliamid állófázison hajtottuk végre. Ez a lépés csoportelválasztást nyújt a flavonoidokra és az ekdiszteroidokra. Az alkoholos hidroxil csoportokat tartalmazó ekdiszteroidok vízzel eluálódnak a poliamid oszlopról, míg a fenolos karakterű flavonoidok kötve maradnak azon.

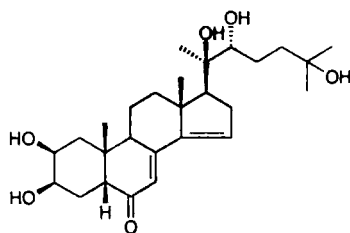
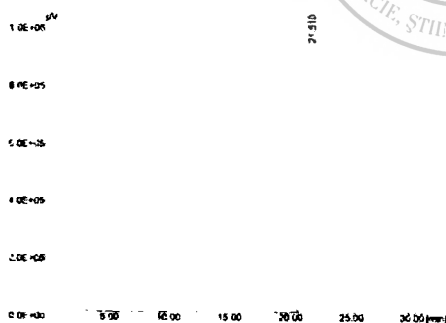
A vízzel eluálódott, ekdiszteroidokban gazdag frakciót fordított fázison szeparáltuk tovább. Állófázisként oktadecil-szilika töltetet alkalmaztunk, az elválasztást idejét redukált

nyomás alkalmazásával csökkentettük. Az oktadecil-szilika nagy mértékben borított kémiaiilag kötött állófázis, így a módszernél a poláris ekdiszteroidok állófázishoz való kötődésével nem kell számolni. Az állófázis regenerálhatósága miatt gazdaságosan alkalmazható a módszer. Az elúciót víz-metanol eleggyel végeztük, 30% vizes metanol elegytől indulva, 60% vizes metanollal zártuk az elválasztást. Az egymást követő lépésekben 5%-kal emeltük a metanol arányát. A frakcionálást rétegekromatográfiásan ellenőriztük. Három ekdiszteroid tartalmú frakciót (jelölésük: A, B, C) választottunk ki a további feldolgozásra; a frakciók rendre 50, 55, 60% vizes metanollal eluálódtak.

A szeparálást RPC segítségével folytattuk tovább. Mozgó fázisként az 1/A-C eluensrendszereket használtunk. Az 50% vizes metanollal eluálódott frakció RPC-vel történt szeparálását követően négy frakciót tisztítottunk tovább. (A/3, A/6, A/8, A/9) A kiválasztott frakciókból két ekdiszteroidot: a növényben a legnagyobb mennyiségben megtalálható 20-hidroxiekdizont és a dakrihainanszteront sikerült kristályosítással tisztán kinyernünk. A dakrihainanszteron tartalmú frakció kloroform-metanol-benzol (50:3:2 v/v/v) rendszerrel eluálódott, míg a 20-hidroxiekdizont a kloroform-metanol-benzol (50:10:6 v/v/v) eleggyel eluálódott frakció tartalmazta. A további, szintén ismert ekdiszteroidot, az ajugaszteron C-t ismételt RPC alkalmazásával nyertük ki tisztán. A reciklizáció esetén a 2/A-C eluensrendszert alkalmaztuk. Az etilacetát-etanol-víz (80:2:1 v/v/v) eluensrendszerrel nyert frakció tartalmazta a tiszta ajugaszteron C-t.

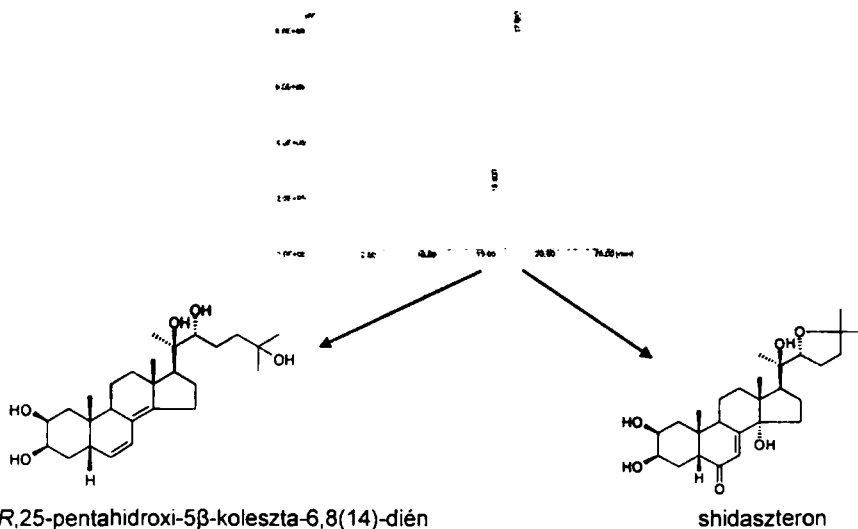
Az A/6 jelű frakciót, amely kloroform-metanol-benzol (50:5:3 v/v/v) rendszerrel eluálódott reciklizáltuk, a 2/A-C eluensrendszer felhasználásával. Az etilacetát-etanol-víz (80:2:1 v/v/v) eleggyel eluálódott A/6/4 jelű frakciót NP-HPLC segítségével tisztítottuk tovább. Egy ekdiszteroidot a stahiszteron B-t izoláltuk. A tiszta vegyület NP-HPLC kromatogramját a 3/a. ábra mutatja.

3. ábra: Az izolált ekdiszteroidok NP-HPLC kromatogramja; állófázis: Zorbax-Sil (9,4 mm x 250 mm-belső átmérő; 5 µm); mozgófázis: ciklohexán:izopropanol:víz (100:40:3, v/v/v); áramlási sebesség: 3/a. - 3 ml/perc; 3/b+c. - 2 ml/perc.

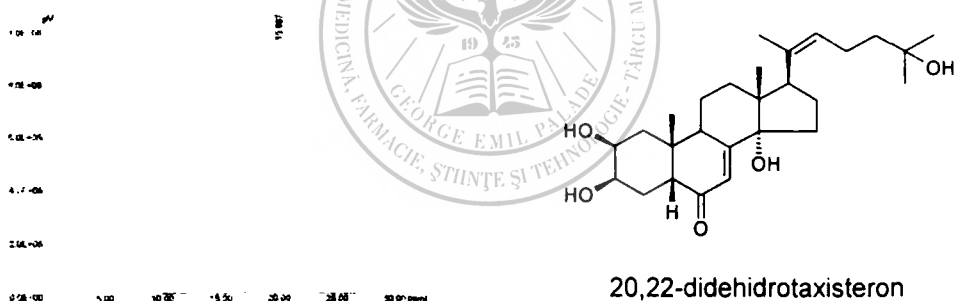


stahiszteron B

A fordított fázisról 55 és 60% vizes metanollal eluálódott frakciók további tisztítása hasonlóan történt: első lépésben RPC-t alkalmaztunk, 1/A-C eluensrendszer felhasználásával; végső tisztítást NP-HPLC segítségével hajtottuk végre. A B/7 jelű frakcióból, amely kloroform-metanol-benzol (50:5:3 v/v/v) rendszerrel eluálódott a shidaszteront és 2β,3β,20R,22R,25-pentahidrox-5β-koleszta-6,8(14)-diént izoláltuk. A HPLC kromatogramjukat a 3/b. ábra mutatja.



A C/5 jelű frakció szintén a kloroform-metanol-benzol (50:5:3 v/v/v) eleggyel eluálódott, melyből a 20,22-didehidrotaxisteron izoláltuk, amely eddig ismeretlen ekdiszteroid. A tiszta vegyület HPLC kromatogramja látható a 3/c. ábrán.



Összefoglalás

Az RPC alkalmazásával egyszerűsítettük az ekdiszteroid izolálási metodikát. Az eddig használt soklépéses eljárás helyett két előtisztítási és két vagy három kromatográfias lépéssel sikerült tiszta ekdiszteroidokat izolálnunk. Egyszerű, hatékony előtisztítást követően a redukált nyomású fordított fázisú oszlopkromatográfiát egészítettük ki az RPC használatával. Utolsó lépésként reciklizált RPC-t illetve HPLC-t használtunk. Az RPC-hez két oldószerrendszert fejlesztettünk ki. Három lépéses gradiens elúciót alkalmazva csökkentettük az analízis időtartalmát.

Az RPC esetén az elválasztás hatékonysága több tényező függvénye. Befolyásolja a réteg vastagsága, a mozgófázis összetétele, az áramlási sebesség. Ezek változtatásával, optimalizálásával az elválasztás hatékonysága növelhető. Az RPC további jellemzője a centrifugális erő jelenléte, amely elősegíti a szeparálást. Az RPC előnye, hogy egyszerű,

gyors elválasztás érhető el akár 1,5 g minták esetén is. A minta rövidebb ideg van kapcsolatban az állófázissal, ezért csökken a bomlás veszélye. A sikeres elválasztáshoz kisebb oldószererősség is elegendő volt, mint a klasszikus TLC-nél. Ezek alapján az RPC alkalmas helyettesítője a preparatív TLC illetve a végső HPLC tisztításnak is.

A fent bemutatott izolálási eljárás segítségével hét ekdiszteroidot izoláltunk, melyek szerkezetét ^{13}C , ^1H NMR spektrumaik alapján határoztunk meg. Az izolált vegyületek között megtalálhatók az ismert ekdiszteroidok, például a 11-es helyzetben hidroxilezett, kiemelkedő anabolikus hatású ajugaszteron C. Két új természetes anyagot is sikerült kinyernünk. Az egyik a 20,22-didehidrotaxisteron, amely új szerkezeti jellemzővel, az oldallánc 20-22 szénatomjai közötti kettős kötéssel rendelkezik. A másik komponens a $2\beta,3\beta,20R,22R,25$ -pentahidroxi- 5β -koleszta-6,8(14)-dién, egy ekdiszteroid-szerű molekula, amely a jellegzetes 7-én-6-on struktúra helyett kondenzált kettős kötést tartalmaz. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy ezek az újszerű szerkezeti elemek hogyan befolyásolják a hatást, s hogy illeszkednek az izolált vegyületek az ekdiszteroidok bioszintézisébe.

Köszönetnyilvánítás: Munkánkhoz az Tét JAP-22/02 (OMFB-00756/200) támogatás nyújtott anyagi segítséget.



Analiza calitativă și cantitativă a unor compuși sterolici din *Salvia officinalis* L.

S. Nemeth¹, T. Nemeth¹, L. Vlase², H. Popescu³

¹Facultatea de Medicină și Farmacie spec. Farmacie, Oradea, Str. N. Jiga 29

²Facultatea de Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

³Facultatea de Farmacie Craiova

Studiul cromatografic (HPLC) comparativ al extractelor metanolice obținute din diferite părți de plantă ale speciei *Salvia officinalis* L. a relevat prezența a 3 steroli (beta-sitosterol, stigmasterol și colesterol). Au fost identificați prin compararea proprietăților cromatografice cu cele ale substanțelor de referință.

The chromatographic study (HPLC) of methanolic extract obtained from different drugs of Salvia officinalis L. revealed the presence of 3 sterols (beta-sitosterol, stigmasterol and cholesterol). They have been identified by comparing the chromatographic properties with those of reference substances.

S-a efectuat un studiu comparativ privind conținutul în beta-sitosterol, stigmasterol și colesterol din diferite produse vegetale ale plantei *Salvia officinalis* L.[2,3,4,5,6].

MATERIAL ȘI METODĂ

Frunzele, rădăcina și semințele de *Salvia officinalis* L. au fost recoltate în iulie 2005 din zona Romos (județul Hunedoara) de la plantele în al doilea an de vegetație.

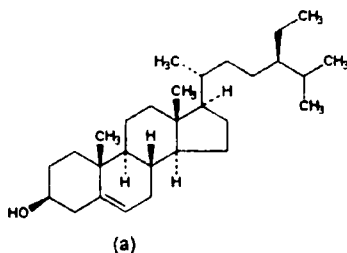
Uscarea produselor vegetale s-a efectuat în mod natural, la umbră într-o încăpere bine aerisită.

Extracția s-a făcut cu MeOH într-un aparat Soxhlet până la epuizarea produsului vegetal.

Pentru analiza compușilor sterolici s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (LC/MS).

Metoda de analiză utilizată se bazează pe o metodă HPLC publicată în literatura de specialitate [1] la care s-au adus unele modificări. Principala modificare adusă metodei inițiale este schimbarea coloanei cromatografice și a debitului fazei mobile. Ca rezultat, față de metoda publicată în literatură, timpul de analiză a scăzut de la 30 minute la 5 minute fără a afecta separarea sterolilor și rezoluția.

Standarde: beta-sitosterol, stigmasterol și colesterol (Fig. 1 a-c).



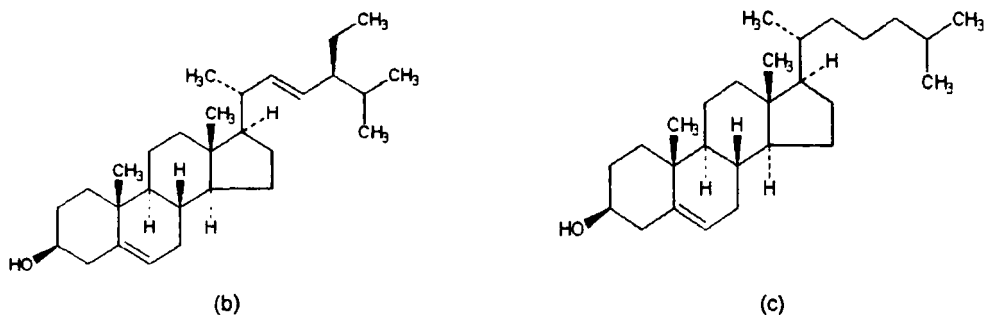


Figura 1. Structura beta-sitosterolului (a), a stigmasterolului (b) și a colesterolului (c)

Aparatura:

- HPLC cuplat cu spectrometru de masă
- HP 1100 Series binary pump
- autosampler HP 1100 Series
- termostat HP 1100 Series
- detector UV HP 1100 Series
- spectrometru de masă Agilent Ion Trap 1100 VL

Condițiile de lucru HPLC:

- Coloană analitică: Zorbax SB-C18 100 mm x 3.0 mm i.d., 5 μ m
- Precoloană Zorbax SB-C18
- Fază mobilă: amestec metanol: acetonitril 30:70 (v/v), eluție izocratică
- Debit: 1 ml/min, temperatură: 35° C
- Detecție
- Ultraviolet, 205 nm (doar pentru vizualizarea profilului cromatografic)
- MS
- Volumul de injectare: 10 μ l

Condițiile de lucru MS:

- Sursa de ioni: APCI (atmosferic pressure chemical ionisation)
- Mod ionizare: pozitiv
- Nebulizator: azot, presiune 50 psi
- Gaz de uscare: azot, debit 6 L/min, temperatură 240° C
- Potențial capilară: -2000 V
- Mod analiză: monitorizare ioni specifici ai sterolilor

Metoda MS

Ionii monitorizați în metoda MS sunt prezentați în Tabelul I. Deoarece în condițiile de ionizare toți sterolii pierd o moleculă de apă, ionii detectați de spectrometru sunt întotdeauna de forma $[M-H_2O+H]^+$.

În figura 2 este prezentată cromatograma amestecului a trei steroli utilizați ca standarde (beta-sitosterol, colesterol și stigmasterol) realizată prin detecția în UV, la 205 nm.

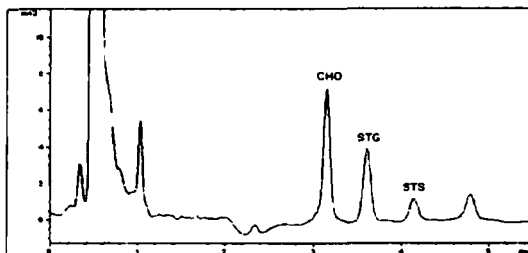


Figura 2. Cromatograma unui amestec de standarde de steroli, detecție UV (CHO= colesterol, STG = stigmasterol, STS=sitosterol).

Detecția MS a pus în evidență ionii-părinte ai sterolilor analizați (ioni părinte= ioni care se formează după ionizarea substanței, înainte de o eventuală fragmentare). În cazul fiecărui sterol s-a pus în evidență ionul așteptat (Tabelul I).

Tabelul I. Ionii specifici sterolilor monitorizați în metoda de screening

Sterol	M	M-H ₂ O	M-H ₂ O+H ⁺
Colesterol	386	368	369
Sitosterol	414	396	397
Stigmasterol*	412	394	395

Cromatograma totalului ionic a unui amestec a celor trei steroli este prezentată în figura 3. Este reprezentată grafic suma tuturor ionilor scanati de spectrometru, indiferent de masa acestora (culoare albastră) și de asemenea cromatograma UV. Timpii de retenție și ordinea de eluție este aceeași ca în figura

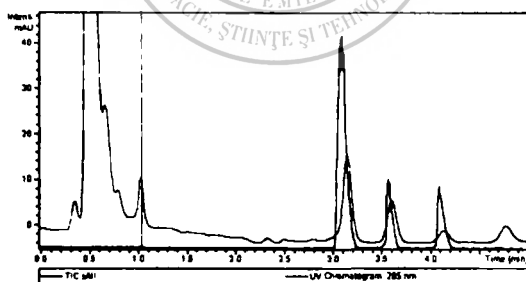


Figura 3. Cromatograma totalului ionic (TIC, albastru) și UV (roșu) a unui amestec de standarde de steroli. (ordinea de eluție este colesterol, stigmasterol, sitosterol)

Prelucrarea probelor de analizat

Au fost analizate 4 probe:

- Pr1-extract metanolic obținut din *Salviae folium* (uscată)
- Pr2-extract metanolic obținut din *Salviae folium* (proaspătă)
- Pr3-extract metanolic obținut din *Salviae radix*
- Pr4-extract metanolic obținut din *Salviae semen*

Extracția s-a efectuat cu metanol la reflux
 Cromatogramele probelor analizate sunt prezentate în figurile 4,5,6,7.
 Concentrațiile sterolilor din extractele analizate sunt prezentate în Tabelul II și Figura 8.

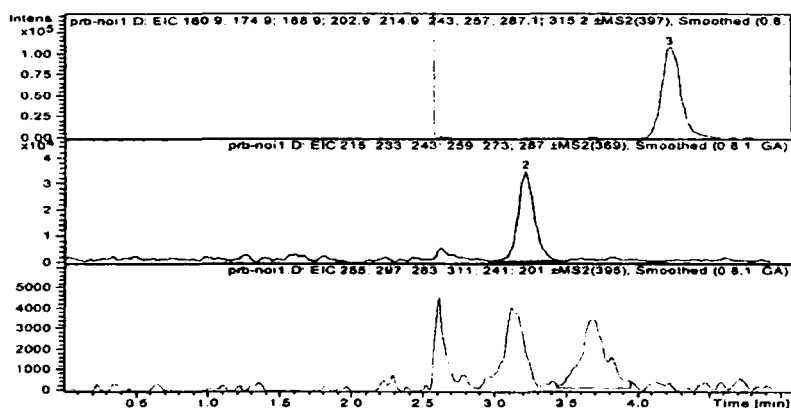


Figura 4. Cromatogramele extrase ale sitosterolului (rând 1), colesterolului (rând 2) și stigmasterolului (rând 3) din proba 1

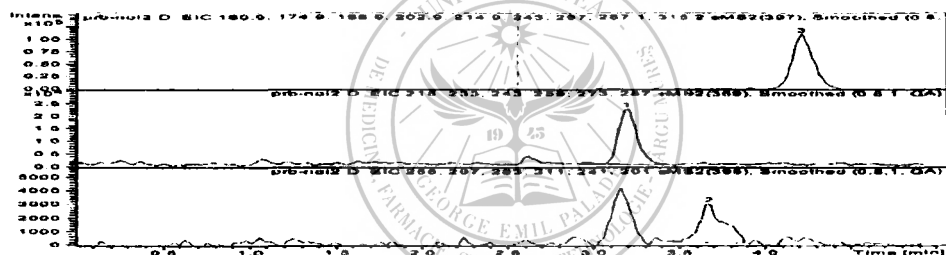


Figura 5. Cromatogramele extrase ale sitosterolului (rând 1), colesterolului (rând 2) și stigmasterolului (rând 3) din proba 2

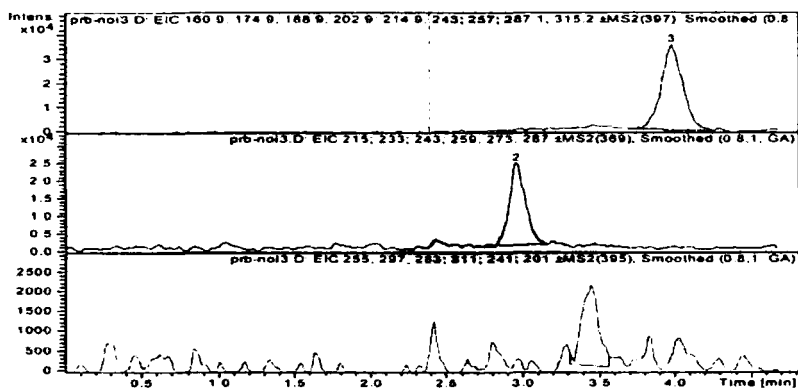


Figura 6. Cromatogramele extrase ale sitosterolului (rând 1), colesterolului (rând 2) și stigmasterolului (rând 3) din proba 3

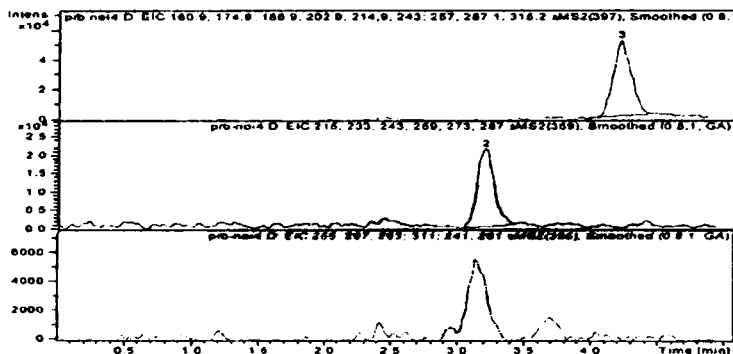


Figura 7. Cromatogramele extrase ale sitosterolului (rând 1), colesterolului (rând 2) și stigmasterolului (rând 3) din proba 4

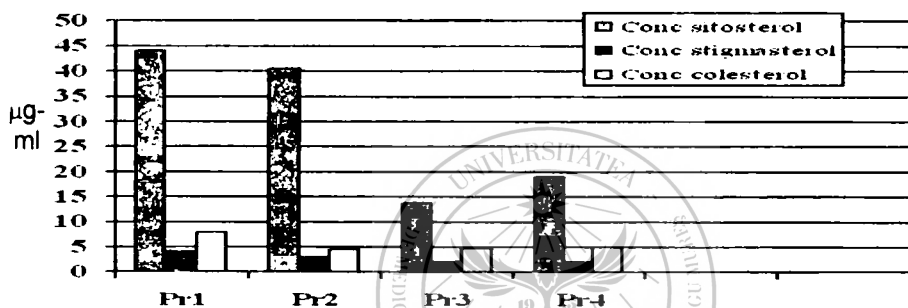


Figura 8. Concentrațiile sterolilor din extractele analizate

Tabelul II. Concentrațiile sterolilor din extractele analizate

Proba	Concentrație sitosterol (µg/ml)	Concentrație stigmasterol (µg/ml)	Concentrație colesterol (µg/ml)
Pr1	44,008	4,069	8,061
Pr2	40,431	2,983	4,446
Pr3	13,963	1,934	4,739
Pr4	19,099	1,956	5,033

CONCLUZII

1. Prin metoda HPLC modificată s-au identificat sitosterolul, stigmasterolul și colesterolul din cele 4 probe analizate.

2. Conținutul maxim în sitosterol, stigmasterol și colesterol îl are proba 1 (44,008 µg/ml, 4,069 µg/ml, 8,061 µg/ml).

3. Concentrațiile de colesterol sunt apropiate în probele 2 și 3 (4,446 µg/ml și 4,739 µg/ml).

4. Deși concentrațiile în sitosterol din probele 2 și 3 sunt semnificativ diferite (40,431μg/ml și 13,963μg/ml), conținutul în colesterol este foarte apropiat (4,446μg/ml și 4,739μg/ml).

.BIBLIOGRAFIE

1. SANCHEZ-MACHADO DI, LOPEZ HERNANDEZ J, PASEIRO-LOSADA P et al - *An HPLC method for the quantification of sterol in edible seaweeds*, Biomed Chromatogr, 2004, Apr;18 (3):183-190.
2. ISTUDOR V - *Farmacognozie, fitochimie, fitoterapie*, Ed. Medicală, București, 2001, vol 2:115-116.
3. NEMETH T, ARDELEAN A, SZABO I, NEMETH TS - *Analize farmacognostice*, Ed. Univ. „Vasile Goldiș”, 2000, vol 2:75-76.
4. CIULEI I, GRIGORESCU E, STĂNESCU U - *Plante medicinale, fitochimie și fitoterapie.*, Ed Medicală, București, 1993, vol I:686.
5. BIANCHINI JP, GARIDON EM, SIGOLIOT JC - *Determination of sterol and triterpene alcohol acetates in natural products by reversed phase liquid chromatography – mass-spectrometry*, J.Chromatography, 1985, 329:231–246.
6. VIVIENNE V, YANKAH P, JONES JH - *Phytosterols and Health Implications*, Chemical Nature and occurrence Inform, 2001, 12:808-811.



Analiza conținutului de apă în mugurii foliari

Camelia I. Peev, Diana Antal, Cristina A. Dehelean, Kaycsa Adriana

Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" Timișoara

Persoana de contact: Camelia Peev

Adresa de corespondență: Farmacia S.C. Ephedra Farm S.R.L., Timișoara, str. Baba Dochia U2.

Tel. -0-071073, cameliapeev@yahoo.com

S-a realizat un studiu al conținutului în apă la mugurii foliari, proveniți de la opt specii diferite, din flora spontană cât și din cultură: alun *Corylus avellana* L., anin *Alnus glutinosa* L., brad *Abies alba* Miller, coacăz negru *Ribes nigrum* L., castan sălbatic *Aesculus hippocastanum* L., plop negru *Populus nigra* L., tei *Tilia tomentosa* Miller, mestecăn *Betula pendula* Roth. Mugurii foliari studiați sunt produse vegetale pentru prepararea de extracte hidrogliceroalcoolice utilizate în gemoterapie. Pierderea prin uscarea s-a efectuat conform monografiei din F.R.X.

S-a pus în evidență faptul că, conținutul în apă (%) al mugurilor foliari depinde de specia de la care provin, de momentul calendaristic al recoltării și mai puțin de arealul geografic de proveniență. S-au obținut valori minime ale umidității 28,23 % în cazul mugurilor de brad, și maxime de 78,12 % în cazul mugurilor desfăcuți, de coacăz negru.

Cuvinte cheie: Muguri foliari, umiditate, gemoterapie

*This study consists in the analysis of foliar buds water content from 8 different species from spontaneous and cultivated flora: hazel tree *Corylus avellana* L., alder-tree *Alnus glutinosa* L., fir *Abies alba* Miller, black currant *Ribes nigrum* L., horse chestnut *Aesculus hippocastanum* L., poplar *Populus nigra* L., linden tree *Tilia tomentosa* Miller, birch tree *Betula pendula* Roth. The analysed foliar buds are used as vegetal sources for to obtain hydroglycero alcoholic extracts applied in gemotherapy. The drying procedure was done as F.R.X demands.*

It was evidenced that foliar buds water content depends on the type of vegetal product, the harvesting period and less the native product area. Minimal values of humidity were 28.23% for fir buds and 78.12% as maximal values for open black currant buds.

Key words: foliar buds, humidity, gemmotherapy.

Mugurii foliari reprezintă o nouă categorie de produse vegetale care se utilizează în domeniul farmaceutic la prepararea de extracte vegetale hidrogliceroalcoolice. Gemoterapia este medicina care utilizează în exclusivitate aceste produse. La ora actuală se folosesc uzual extractele provenite de la 35-36 de specii de plante. Sunt încă în studiu farmacologic mugurii foliari proveniți de la alte 90 de specii [5,6].

Mugurii foliari reprezintă partea apicală, nedezvoltată și embrionară a tulpinii și ramificațiilor ei. Sunt considerați ca etapă de dezvoltare a frunzei, iar aspectele legate de conținutul în apă, sunt puțin studiate [1,4,7]. Momentul optim de recoltare a mugurilor foliari, ca produs vegetal farmaceutic, este faza dormindă, primăvara, înainte de deschidere [5,6].

Studiul de față a urmărit remarcarea modificărilor legate de conținutul de apă la mugurii foliari în fază dormindă, considerată în literatura de specialitate, perioada octombrie-martie, în fază de tranziție dormind-activă, și faza de desfacere [6].

S-au luat spre analiză mugurii foliari proveniți de la diverse specii de plante, care cresc în flora spontană, cât și cele de cultură: alun *Corylus avellana* L., anin *Alnus glutinosa* L., brad *Abies alba* Miller, coacăz negru *Ribes nigrum* L., castan sălbatic *Aesculus hippocastanum* L., plop negru *Populus nigra* L., tei *Tilia tomentosa* Miller, mestecăn *Betula pendula* Roth [2,6].

S-a urmărit o diversificare a arealului de recoltare, atât ca particularitate de relief cât și ca diferențiere în coordonate de latitudine. S-a ținut cont ca în cadrul aceleași specii, alegerea

exemplarelor vegetale să fie de o vârstă aproximativ apropiată, considerându-se astfel, că majoritatea proceselor biologice interne se desfășoară cu o rată de viteză similară.

S-au ales câteva intervale de recoltare, începând cu data de 10-12 martie, moment de final de iarnă și start de primăvară întârziată pentru anul 2005. Studiul a durat cât timp a permis conjunctura meteorologică, până la data de 7-10 aprilie, când mugurii deja au atins punctul lor de deschidere.

MATERIAL ȘI METODĂ

Produsul vegetal: Mugurii foliari au fost recoltați de la opt specii de plante, din zone diferite geografic: Munții Apuseni (M.A.) - zona Aleșd, Munții Apuseni (M.A.) - zona Arieșeni, malul Crișului Negru (C.N.) - zona Tinca, zona Banat (B.) - Făget și Timișoara. Recoltarea s-a făcut la perioade diferite, începând cu 5 martie 2004 și terminându-se în 10 aprilie, imediat înainte de desfacerea lor, la intervale de 5-6 zile.

Determinarea pierderii prin uscarea s-a făcut conform monografiei din F.R.X. [3]

Materiale: etuvă Binder seria FD, exsicator, fiole de cântărire, balanță analitică precisa WAS 220/C/2.

Proba vegetală proaspăt recoltată s-a mărunțit, s-a cântărit între 3,00-4,00 g, în funcție de cantitatea de probă avută la dispoziție. S-a introdus cu fiola de cântărire în etuva încălzită la 105°C unde a stat 4 ore; fiola de cântărire s-a introdus în exsicator până a doua zi, când s-a făcut a doua cântărire. Probele, pentru fiecare specie de muguri, s-au realizat în duplicat.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de alun, *Corylus avellana*, sunt trecute în Tabelul I.

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de anin, *Alnus glutinosa*, sunt trecute în Tabelul II.

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de brad, *Abies alba*, sunt trecute în Tabelul III.

Tabelul I. Umiditatea exprimată în % a mugurilor foliari de *Corylus avellana*

Nr.crt	Zona	10 - 12 martie	17 - 19 martie	23 - 25 martie	27 - 29 martie	1 - 3 aprilie	7 - 10 aprilie
1.	M.A. Aleșd	44,62	-	53,54	59,57	63,24	-
2.	C.N. Tinca	46,18	49,23	-	62,34	64,25	-
3.	M.A. Arieșeni	44,32	45,60	-	-	59,23	61,73
4.	B. Făget	-	40,13	42,91	-	55,50	60,24

Tabelul II. Umiditatea exprimată în % a mugurilor foliari de *Alnus glutinosa*

NR.C RT.	ZONA	10 - 12 MARTIE	17 - 19 MARTIE	23 - 25 MARTIE	27 - 29 MARTIE	1 - 3 APRILIE	7 - 10 APRILIE
1.	M.A.ALEȘD	42,24	-	47,63	53,39	-	58,04
2.	C.N.TINCA	39,70	44,69	-	45,83	52,80	59,23

Tabelul III. Umiditatea exprnmată în % a mugurilor foliari de *Abies alba*

Nr.crt	Zona	10 - 12 martie	17 - 19 martie	23 - 25 martie	27 - 29 martie	1 - 3 aprilie	7 - 10 aprilie
1.	M.A.Aleșd	28,23	-	34,14	49,20	59,60	63,12

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de coacăz negru, *Ribes nigrum*, sunt trecute în Tabelul IV.

Tabelul IV. Umiditatea exprimată în % a mugurilor foliari de *Ribes nigrum*

Nr.crt.	Zona	10 - 12 martie	17 - 19 martie	23 - 25 martie	27 - 29 martie	1 - 3 aprilie	7 - 10 aprilie
1.	M.A. Aleșd	48,28	-	57,32	-	59,24	78,12
2.	C.N. Tinca	41,40	51,93	-	69,11	68,98	-
3.	M.A. Arieșeni	45,46	46,93	-	-	69,60	73,23

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de castan sălbatic, *Aesculus hippocastanum*, sunt trecute în Tabelul V.

Tabelul V. Umiditatea exprimată în % a mugurilor foliari de *Aesculus hippocastanum*

Nr.crt.	Zona	10 - 12 martie	17 - 19 martie	23 - 25 martie	27 - 29 martie	1 - 3 aprilie	7 - 10 aprilie
1.	C.N. Tinca	45,79	47,56	-	52,76	53,48	62,73
2.	B.Timișoara	-	42,04	46,66	-	-	-
3.	B.Făget	-	49,22	51,48	-	52,35	60,04

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de plop negru, *Populus nigra*, sunt trecute în Tabelul VI.

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de tei, *Tilia tomentosa*, sunt trecute în Tabelul VII.

Valorile de umiditate (%) obținute pentru mugurii foliari de mesteacăn, *Betula verrucosa*, sunt trecute în Tabelul VIII.

Tabelul VI. Umiditatea exprimată în % a mugurilor foliari de *Populus nigra*

Nr.crt.	Zona	10 - 12 martie	17 - 19 martie	23 - 25 martie	27 - 29 martie	1 - 3 aprilie	7 - 10 aprilie
1.	M.A-Aleșd	33,90	-	40,24	45,94	54,87	57,93
2.	C.N. Tinca	41,02	41,45	-	54,43	-	
3.	M.A.Arieșeni	37,62	38,06	-	-	-	50,05***
4.	B.Timișoara	-	42,17	50,68	-	52,40	55,32
5.	B.Făget	-	38,18	52,04	-	55,60	-

***nu este încă în faza de deschidere

Tabelul VII. Umiditatea exprimată în % a mugurilor foliari de *Tilia tomentosa*

Nr.crt.	Zona	10 - 12 martie	17 - 19 martie	23 - 25 martie	27 - 29 martie	1 - 3 aprilie	7 - 10 aprilie
1.	M.A-Aleșd	-	-	56, 72	60,05	-	67,40
2.	C.N. Tinca	53, 02	-	55, 02	-	59,37	70,28
3.	M.A.Arieșeni	48, 71	-	55, 78	-	-	59,49***
4.	B.Timișoara	-	52, 42	-	-	-	69,57
5.	B.Făget	-	51, 21	-	-	53,15	***

***nu este încă în faza de deschidere

Tabelul VIII. Umiditatea exprimată în % a mugurilor foliari de *Betula verrucosa*

Nr. crt.	Zona	10 – 12 Martie	17 - 19 martie	23 - 25 martie	27 - 29 martie	1 - 3 aprilie	7 - 10 aprilie
1.	M.A.Aleșd	28,84	-	30,22	38,74	50,39	58,81
2.	B. Timișoara	-	34,23	-	40,13	53,10	62,27

Mugurii foliari de alun, *Corylus avellana*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 18-20 de procente de la faza dormindă la faza de deschidere. Se observă faptul că cei din zona de șes, de la mai joasă altitudine, s-au deschis cu o săptămână mai repede decât cei din zona deluroasă-submontană.

Mugurii foliari de anin, *Alnus glutinosa*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 16-17 procente, de la faza dormindă la faza de deschidere.

Mugurii foliari de brad, *Abies alba*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 35 de procente, de la faza dormindă la faza de deschidere.

Mugurii foliari de coacăz negru, *Ribes nigrum*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 28-30 de procente, de la faza dormindă la faza de deschidere.

Mugurii foliari de castan sălbatic, *Aesculus hippocastanum*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 12-17 procente, de la faza dormindă la faza de deschidere.

Mugurii foliari de plop negru, *Populus nigra*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 10-12 procente, de la faza dormindă la faza de deschidere.

Mugurii foliari de tei, *Tilia tomentosa*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 10-17 procente, de la faza dormindă la faza de deschidere.

Mugurii foliari de mesteacăn, *Betula verrucosa*, înregistrează o creștere a umidității medii cu 28-30 procente, de la faza dormindă la faza de deschidere.

Se remarcă faptul că indiferent de arealul de creștere a mugurilor, valorile conținutului în apă sunt apropiate.

CONCLUZII

Conținutul în apă (%) al mugurilor foliari depinde de specia de la care provin, de momentul calendaristic al recoltării și mai puțin de arealul geografic de proveniență.

Cu schimbarea anotimpului iarnă - primăvară, în dezvoltarea mugurilor se observă acumularea treptată de apă; de la valoarea minimă de 28,23 % în cazul mugurilor de brad, la

valoarea maximă de 78,12 % în cazul mugurilor desfăcuți, de coacăz negru. Dintre speciile luate în studiu, valoarea minimă de modificare a umidității este de 1,33 ori pentru mugurii foliari de *Corylus avellana*, iar maxima este de 2,25 ori pentru mugurii foliari de *Abies alba*.

BIBLIOGRAFIE

1. BLIDAR C, TĂMAȘ M - *Histological research on some buds used in gemotherapy*, Contribuții botanice XXXIX, Cluj-Napoca 2004, 155-161.
2. CIOCĂRLAN V - *Flora ilustrată a României, Pteridophyta et Spermatophyta*, Editura Ceres, București, 2000, 191- 192.
3. ****Farmacopeea Română* ediția a X-a, Ed. Medicală București, 1993, 419-421, 1060-1063.
4. JITARU GS, TOMA C - *Morfologia și anatomia plantelor*, București, Editura Didactică și Pedagogică, 1980, 32-65.
5. ****Pharmacopee Francaise X*, Adrapharm, Maisoneuves S.A. editeur, Paris 1982, 203-248.
6. PITERA F - *Compendio di Gemmoterapia Clinica*, Editore de Ferrari, 2000, 510-517.
7. TĂMAȘ M - *Botanică farmaceutică*, Editura Medicală Universitară Iuliu Hațieganu, Cluj-Napoca, 1999, 60- 61.



Analiza comparativă a compoziției în acizi grași a diferitelor sortimente de ulei de ricin (*Ricini oleum*) pentru uz extern

Monica Rusu¹, Marianna Markus², C. Csedő¹

¹ Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș, Disciplina de Farmacognozie și Fitoterapie

² Institutul Central de Cercetare Științifică a Alimentelor, Laboratorul analitic, Budapesta, Ungaria

Utilizarea uleiului de ricin (*Ricini oleum*) pentru uz intern este binecunoscută și cu acțiune confirmată. Totuși pe lângă utilizarea clasică, de uz intern, există informații privind utilizarea uleiului de ricin pentru uz extern, în preparate dermato-cosmetice, destinate mai ales îngrijirii părului.

Lucrarea de față își propune ca pe baza analizelor gaz-cromatografice a mai multor sortimente de ulei de ricin (*Ricini oleum*) să se poată selecta acele sortimente care corespund cel mai bine obținerii de produse de uz dermatologic, cu acțiune certă și stabilitate corespunzătoare în timp.

The use of Castor Oil (Ricini oleum) for internal use is wellknown and has confirmed action. Still, besides the classical use, the internal use, there is information regarding the use of castor oil for external use, in dermatologic-cosmetologic products, destined especially for haircare.

The aim of this research is to select the sort of castor oil (Ricini oleum) which corresponds best for obtaining dermatological products (mainly for hair care), with a determined action and suitable stability.

MATERIAL ȘI METODE:

Mostrele de ulei de ricin luate în lucru au fost procurate din diferite țări, de pe 4 continente (Europa, Asia, America Latină și America de Nord). Calitatea respectivelor produse corespunde doar cerințelor și normelor (farmacopeilor) interne, validate în țările de proveniență.

Pentru determinarea conținutului în acizi grași s-au folosit un număr de 11 mostre de ulei de ricin, de diferite proveniențe, în cantitate de aproximativ 7 mg per probă. Probele de ulei se hidrolizează cu 200 μ l soluție de metanol în mediu de KOH. Un volum de 250 μ l soluție metanolică se esterifică apoi cu trifluorid borat în metanol. Se adaugă NaCl și se trece prin 200 μ l heptan. Uscarea soluției se face în mediu de sulfat de sodiu anhidru.

Aparatura:

S-a folosit gaz-cromatograful Carlo Erba Fractovap, la care a fost cuplat integratorul HP 3390. Coloana utilizată este Omegawax (Supelco inc.) cu o lungime a capilarelor de 30 m, având un diametru interior de 0,25 mm și o grosime a filmului de 25 μ m.

Condiții de lucru:

S-a lucrat în condiții izoterme, la 240°C, injectorul și detectorul de temperatură fiind programate la 240°C. Cantitatea pe probă injectată a fost de aproximativ 0,5 μ l.

Pentru identificarea acizilor grași se folosesc amestecuri standard PolyScience inc. 60 test mixture Supelco inc. lipid standards sigma, inc.) [1,2].

Au fost analizate 11 probe de ulei de ricin (*Ricini Oleum*).

REZULTATE:

Compoziția în acizi grași a probelor de ulei de ricin este redată în tabelul I:

Tabelul I. Compoziția în acizi grași a diferitelor sortimente de ulei de ricin

Amestec	Proba # 1	1	2	3	Medie	Deviația standard	Abatere
C16:0	Acid palmitic	1,34	1,25	1,19	1,26	0,07	5,8
C18:0	Acid stearic	1,02	1,01	0,96	1,00	0,03	2,9
C18:1	Acid oleic	4,33	4,42	4,17	4,31	0,13	2,9
C18:2	Acid linoic	5,41	5,57	5,21	5,40	0,18	3,3
C18:3	Acid linoleic	0,65	0,76	0,63	0,68	0,07	10,4
C20:0	Acid eicosanoic	0,56	0,59	0,7	0,62	0,07	12,0
C18:1-OH	Acid ricinoleic	86,70	86,40	86,61	86,57	0,16	0,2
	Proba # 2						
C16:0	Acid palmitic	1,53	1,42	1,46	1,47	0,05	3,7
C18:0	Acid stearic	1,04	0,74	0,69	0,71	0,03	4,3
C18:1	Acid oleic	5,58	4,79	4,56	4,98	0,54	10,8
C18:2	Acid linoic	5,79	5,68	5,30	5,59	0,26	4,6
C18:3	Acid linoleic	0,70	0,83	0,37	0,63	0,24	37,3
C20:0	Acid eicosanoic	0,69	0,81	0,46	0,65	0,18	27,3
C18:1-OH	Acid ricinoleic	85,72	85,77	87,16	86,22	0,82	0,9
	Proba # 3						
C16:0	Acid palmitic	1,37	1,34	1,22	1,31	0,08	6,2
C18:0	Acid stearic	0,98	0,94	1,08	1,00	0,07	7,2
C18:1	Acid oleic	4,27	4,24	3,97	4,16	0,16	3,9
C18:2	Acid linoic	5,45	5,29	5,08	5,28	0,18	3,5
C18:3	Acid linoleic	0,90	0,77	0,77	0,81	0,07	9,2
C20:0	Acid eicosanoic	0,75	0,80	0,75	0,77	0,03	3,7
C18:1-OH	Acid ricinoleic	84,38	84,99	85,38	84,91	0,50	0,6
	Proba # 4						
C16:0	Acid palmitic	1,13	1,08	1,34	1,18	0,14	11,9
C18:0	Acid stearic	1,31	1,31	1,40	1,34	0,05	3,9
C18:1	Acid oleic	4,23	4,39	4,83	4,49	0,31	6,9
C18:2	Acid linoic	4,92	4,99	5,46	5,12	0,30	5,8
C18:3	Acid linoleic	0,80	0,49	0,57	0,62	0,16	25,9
C20:0	Acid eicosanoic	0,68	0,29		0,48	0,27	55,9
C18:1-OH	Acid ricinoleic	85,90	87,38	86,40	86,56	0,75	0,9
	Proba # 5						
C16:0	Acid palmitic	1,33	1,33	1,48	1,38	0,09	6,4
C18:0	Acid stearic	1,11	1,14	1,02	1,09	0,06	5,4
C18:1	Acid oleic	4,24	4,27	4,53	4,35	0,16	3,7
C18:2	Acid linoic	5,22	5,23	5,66	5,37	0,25	4,7

C18:3	<i>Acid linoleic</i>	0,64	0,59	0,69	0,64	0,05	7,3
C20:0	<i>Acid eicosanoic</i>	0,64	0,47	0,71	0,61	0,12	19,9
C18:1-OH	<i>Acid ricinoleic</i>	86,48	86,98	85,91	86,46	0,54	0,6
	Proba # 6						
C16:0	<i>Acid palmitic</i>	1,42	1,82	1,50	1,58	0,21	13,2
C18:0	<i>Acid stearic</i>	1,12	1,19	1,17	1,16	0,04	3,3
C18:1	<i>Acid oleic</i>	4,69	5,20	4,76	4,88	0,28	5,7
C18:2	<i>Acid linoic</i>	5,61	6,13	5,48	5,74	0,34	6,0
C18:3	<i>Acid linoleic</i>	0,71	0,70	0,71	0,71	0,01	1,1
C20:0	<i>Acid eicosanoic</i>	0,69	0,46	0,67	0,61	0,13	21,1
C18:1-OH	<i>Acid ricinoleic</i>	83,57	82,44	83,13	83,05	0,57	0,7
	Proba # 7						
C16:0	<i>Acid palmitic</i>	1,41	1,49	1,47	1,46	0,04	2,7
C18:0	<i>Acid stearic</i>	0,92	1,06	0,96	0,98	0,07	7,2
C18:1	<i>Acid oleic</i>	4,71	4,64	4,60	4,65	0,05	1,2
C18:2	<i>Acid linoic</i>	5,74	5,86	5,71	5,77	0,08	1,4
C18:3	<i>Acid linoleic</i>	0,83	0,84	0,71	0,79	0,07	9,2
C20:0	<i>Acid eicosanoic</i>		0,63	0,70	0,66	0,05	7,5
C18:1-OH	<i>Acid ricinoleic</i>	83,78	83,72	84,26	83,92	0,30	0,4
	Proba # 8						
C16:0	<i>Acid palmitic</i>	1,36	1,49	1,41	1,42	0,07	4,7
C18:0	<i>Acid stearic</i>	1,03	1,07	1,14	1,08	0,06	5,3
C18:1	<i>Acid oleic</i>	4,16	4,72	4,49	4,46	0,28	6,2
C18:2	<i>Acid linoic</i>	5,11	5,60	5,45	5,39	0,25	4,6
C18:3	<i>Acid linoleic</i>	0,63	0,66	0,63	0,64	0,01	2,3
C20:0	<i>Acid eicosanoic</i>	0,58		0,50	0,54	0,05	9,8
C18:1-OH	<i>Acid ricinoleic</i>	86,41	86,47	85,60	86,16	0,49	0,6
	Proba # 9						
C16:0	<i>Acid palmitic</i>	1,39	1,47	1,38	1,41	0,05	3,3
C18:0	<i>Acid stearic</i>	1,08	1,02	1,12	1,07	0,05	4,8
C18:1	<i>Acid oleic</i>	4,25	4,41	4,30	4,32	0,08	1,9
C18:2	<i>Acid linoic</i>	5,47	5,47	5,36	5,43	0,07	1,2
C18:3	<i>Acid linoleic</i>	0,81		0,58	0,69	0,16	23,0
C20:0	<i>Acid eicosanoic</i>	0,53			0,53		
C18:1-OH	<i>Acid ricinoleic</i>	83,80	84,47	83,89	84,05	0,36	0,4
	Proba # 10						
C16:0	<i>Acid palmitic</i>	1,63	1,76	1,44	1,61	0,16	9,9
C18:0	<i>Acid stearic</i>	1,10	1,03	1,16	1,10	0,06	5,8
C18:1	<i>Acid oleic</i>	5,17	5,16	4,66	5,00	0,29	5,8

C18:2	Acid linoic	6,30	6,50	5,81	6,20	0,36	5,8
C18:3	Acid linoleic	0,82	0,75	0,73	0,77	0,05	6,6
C20:0	Acid eicosanoic	0,59	0,54	0,55	0,56	0,03	5,2
C18:1-OH	Acid ricinoleic	83,39	83,01	84,64	83,68	0,85	1,0
Proba # 11							
C16:0	Acid palmitic	1,48	1,72	1,52	1,58	0,13	8,0
C18:0	Acid stearic	1,04	1,01	1,00	1,02	0,02	1,7
C18:1	Acid oleic	4,54	5,00	4,77	4,77	0,23	4,8
C18:2	Acid linoic	5,38	6,12	5,80	5,76	0,37	6,4
C18:3	Acid linoleic	0,43	0,72	0,71	0,62	0,16	26,3
C20:0	Acid eicosanoic						
C18:1-OH	Acid ricinoleic	85,51	83,17	84,16	84,28	1,17	1,4

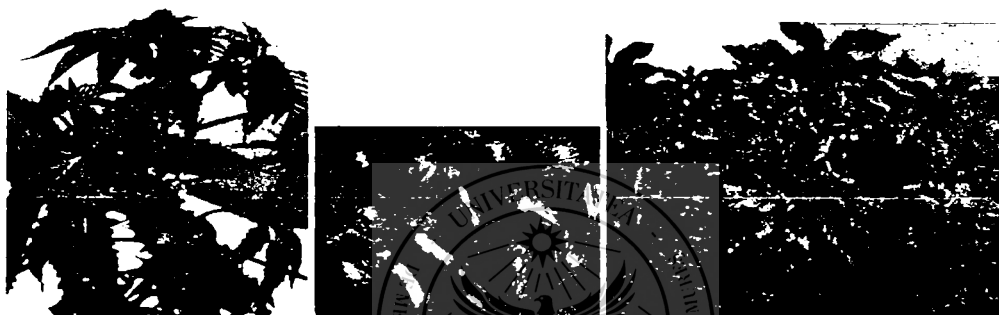


Figura 1. *Ricinus communis* L.

CONCLUZII:

Din datele cercetărilor nu a reieșit o diferență semnificativă între probe, lucru confirmat și de literatura de specialitate [3]. Din acest motiv, vom continua cercetările privind alte constante fizico-chimice ale sortimentelor de ulei de ricin.

De asemenea, un criteriu pentru selectarea materiilor prime în vederea obținerii unui produs finit îl reprezintă și costurile acestora. Pe baza cercetărilor noastre, uleiul de ricin care corespunde cel mai bine scopului urmărit în această lucrare este cel produs în India.

Din păcate, la noi în țară unde există tradiție și experiență în acest domeniu, ricinul nu se mai cultivă în scopuri tehnice, ci doar ocazional, în scop ornamental [4].

BIBLIOGRAFIE:

1. MZS EN IZO 5508-1995: A zsírsavösszetétel meghatározása gázkromatográfiás módszerrel (*Metoda gaz-cromatografică de identificare a compoziției în acizi grași din uleiul de ricin*)
2. MSZ 19928-86: Zsírsav-metilészterek előállítása gázkromatográfiás vizsgálatok céljára (*Obținerea metil-esterilor pentru utilizarea lor în cadrul gaz-cromatografiei*)
3. GUPTA SS, HILDITCH TP, RILEY J.P J. Sci: Food Agric., 1951, 2, 245.
4. RUSU M: *Caracterizarea diferitelor soiuri și sortimente de ulei de ricin (Ricini Oleum)*, Referatul #1 din cadrul pregătirii doctoratului, UMF Târgu Mureș, 2005.

Circulația virusurilor hepatitice și gradul de afectare al populației județului

Mureș prin infecții hepatitice

Monica Sabău¹, Monica Tarcea¹, Cristina Golea¹, Rodica Popa², Roxana Ilcuș³

¹ Disciplinele de Epidemiologie și Igienă, UMF Tg. Mureș

² Casa de Asigurări pentru Sănătate Tg. Mureș

³ Cabinetul Dermato-Venerologie, Policlinica II, Tg. Mureș

Scopul studiului a fost evaluarea retrospectivă a cercetărilor efectuate în perioada 1978-2000 privind circulația virusurilor hepatitice în județul Mureș.

Material și metodă. S-a analizat prin studii seroepidemiologice transversale prevalența markerilor serici a virusurilor hepatitice A, B, D și C în hepatitele acute, la unele grupuri populaționale cu risc (pacienți hemodializați, copii instituționalizați, pacienți cu boli transmise sexual, gravide, personal medical) precum și în hepatite cronice. S-a făcut apel la metode de contraelectroforeză, hemaglutinare pasivă reversă și imunoenzimatice (MONOLISA – Sanofi Diagnostics Pasteur).

Rezultate. Prevalența AgHBs și a anti-HBs la 15.450 persoane sănătoase testate prin tehnici cu sensibilitate mare redusă a fost de 3,1% respectiv de 6,5%. La utilizarea metodelor imunoenzimatice pe 420 persoane recrutate aleatoriu din populația generală, am constatat că 72,6% dețineau markeri ai infecțiilor anterioare cauzate de virusurile hepatitice A, B, D și C. Structura etiologică a hepatitelor virale acute (359 cazuri) nu s-a modificat notabil pe parcursul a 15 ani, doar hepatita acută A a scăzut semnificativ ($p=0,0452$), hepatitele B, D și C având ponderi nemodificate. Infecțiile hepatitice multiple au fost remarcate atât în hepatitele acute, 29% fiind hepatite acute de co sau suprainfecție, cât și în cazul infecțiilor anamnestice, 30,4% fiind infecții duble și 3,9% triple. Pacienții supuși dializei periodice și copiii instituționalizați au fost grupurile cu risc maxim de infecții B și C (63,3% și 51,3% pentru infecția VHB și 36,6% respectiv 16,6% pentru infecția VHC). Virusul hepatitei C a avut un rol important în determinismul hepatopatilor cronice, 68,4% din hepatitele cronice fiind hepatite C.

Concluzii. Circulație intensă a virusurilor hepatitice în arealul studiat. Prezența infecțiilor hepatitice multiple. Densitate mare de surse de virus la unele grupe populaționale, care contribuie la menținerea endemicității prin aceste infecții.

Cuvinte cheie: virusurile hepatitice A, B, D și C; infecții acute și cronice; grupuri cu risc.

The purpose of the study was a retrospective evaluation of our investigation regarding the circulation of hepatitis viruses in Mureș district between 1978-2000.

Methods. Transversal studies of serological markers of hepatitis A, B, D, C in acute hepatitis, among general population, some groups with risk of infection (hemodialysed patients, institutionalized children, patients with sexually transmitted diseases, pregnant women, health-care workers) and in chronic hepatitis.

Results. Using methods with low sensitivity (counterelectrophoresis, reverse passive hemagglutination), we estimate that 3,1% from 15.450 blood samples of persons from general population had evidence of AgHBs and 6,5% of anti-HBs. The prevalence of hepatitis A, B, D and C virus markers was higher in general population (72,6% in 420 persons) when samples were tested in MONOLISA – Sanofi Diagnostics Pasteur. As regarding the etiologic structure of acute hepatitis, little modification appeared during 15 years, except acute hepatitis A, whose decline was statistically significant ($p=0,0452$). Multiple hepatitis viruses infections were noticed in acute hepatitis (29% have been co or superimposed acute hepatitis), as well as in general population (30,4% double and 3,9% triple infections). The highest rates, statistically significant ($p=0,0126$) as compared with those of general population were observed in hemodialysed patients (63,3% HBV and 36,6% HCV) and in institutionalized children (51,3% AND 16,6% respectively). Hepatitis C virus had an important role in inducing chronic hepatitis, 68,4% being hepatitis C.

Conclusions. Intense circulation of hepatitis viruses in our area. Presence of multiple hepatitis viruses in infections. High density of viral sources, especially in some groups of population which maintain endemicity of infections.

Key words: hepatitis A, B, D, C viruses, acute and chronic infections, risk groups.

Infecțiile cauzate de virusurile hepatitice constituie încă un capitol important al patologiei infecțioase, o problemă de sănătate publică cu importante implicații medicale și socio-economice [7,9,10,14,20,26].

Virusurile hepatitice B, C și D contribuie în mod esențial la evoluția persistentă a infecțiilor pe care le induc, manifestate sub forma portajului cronic, hepatitelor cronice, cirozelor, inclusiv a complicațiilor de tip insuficiență hepatică și cancer hepatic [1,8].

Infecțiile hepatitice au o răspândire universală cu largi variații teritoriale, dependente de dimensiunea izvoarelor de virus și de condițiile epidemiologice locale care asigură circulația interumană a virusurilor [20,21,22].

Lucrarea de față este o sinteză a activității de cercetare asupra unor aspecte epidemiologice ale infecțiilor produse de virusurile hepatitice A, B, D, C, cercetare efectuată între 1978-2000.

SCOPUL STUDIULUI

Aprecierea gradului de afectare a populației județului Mureș prin infecții acute și cronice produse de virusurile hepatitice.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am făcut apel la studii seroepidemiologice transversale, efectuate la diferite momente în timp pe parcursul a 22 de ani. Am împărțit persoanele investigate în două categorii.

A. Persoane aparent sănătoase (nr = 15,450) testate pentru prezența AgHBs și anti-HBs prin metode de electroforeză contracurent, hemaglutinare pasivă reversă, reoforeză, după concentrarea prealabilă a serurilor pe lyphogel, metode cu sensibilitate mai redusă;

B. Pacienți cu hepatită acută (359 seruri); persoane recrutate aleator din populația generală (420 seruri); persoane aparținând unor grupuri populaționale la risc (424 gavage, 150 copii instituționalizați, 30 pacienți hemodializați, 302 pacienți cu boli transmise sexual, 426 cadre medico-sanitare și 130 pacienți cu hepatite cronice), investigați pentru următorii markeri: AgHBs, anti-HBc IgM, AgHBe, anti-HBe, anti-HBc, anti-VHA IgM, anti-VHA, anti-VHD și anti-VHC prin metode imunoenzimaticice (MONOLISA – Sanofi Diagnostics Pasteur).

REZULTATE

A. Investigațiile la prima categorie de persoane au evidențiat următoarele:

-O medie a portajului de AgHBs de 3,1% și a anti-HBs de 6,5%, cu variații în funcție de subloturile examinate.

-Raportul dintre subdeterminanții ay:ad ai AgHBs a fost supraunitar variind între 1,5 și 1,4 (Tabelul I).

Tabelul I. Infecția produsă de virusul hepatitei B

Categoria de persoane examinate	Număr examinări (CEF, HP)	AgHBs pozitiv nr. %	anti-HBs pozitivi nr. %	Raport determinanți y:d (Reoforeză)
Persoane sănătoase neselectate	3.294	145 (4,4)	75 (2,3)	65,5:34,4
Donatori	7.500	180 (2,4)	590 (7,8)	61,6:38,3
Gravide	2.500	55 (2,2)	130 (5,2)	70,9:29,1
Cadre medicale	598	28 (4,6)	83 (13,8)	60,7:39,3
Copii instituționalizați	511	58 (11,3)	41 (8,0)	67,2:32,7
Studenti în medicină	1.047	27 (2,5)	93 (8,8)	62,9:37,1
Total	15.450	493 (3,1)	1.012 (6,5)	

-Sistemul antigenic „e” la persoanele cu evidențe pozitive de AgHBs a variat între 2,7% și 10,3% pentru AgHBe, respectiv între 18,9% și 33,8% pentru anti HBe (Fig. 1).

B.Analiza *structurii etiologice* a hepatitelor virale acute efectuată comparativ pe două loturi de pacienți la diferență de 15 ani și folosind metode imunoenzimice a demonstrat o scădere semnificativă a hepatitei acute A ($p=0,0452$), o ușoară creștere, dar nesemnificativă ($p=0,0684$) a hepatitei acute B și menținerea unor nivele aproximativ egale ale hepatitei acute D ($p=0,1907$) și hepatitei acute C (0,92729), (Fig.2).

Confruntând prezența markerilor virali de fază acută cu cei ai infecțiilor anterioare, am constatat că 29% din hepatite au fost hepatite de coinfectie sau hepatite acute cauzate de un virus hepatitic suprapus statusului de infecție anterioară produsă de alt / alte virusuri hepatice.

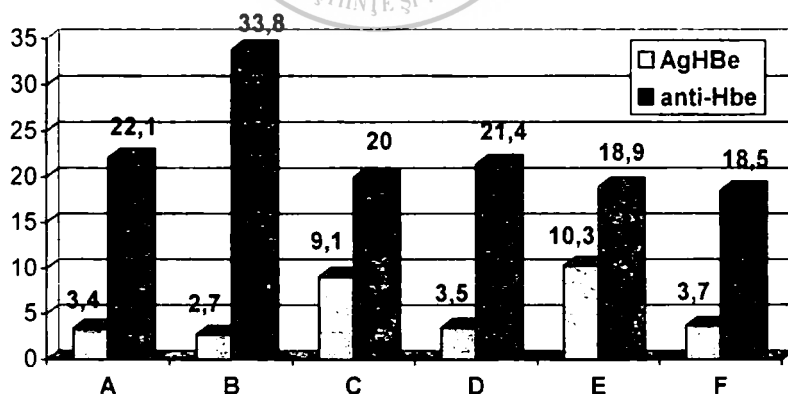


Fig. 1. Sistemul antigenic "e" la purtătorii de AgHBe

Legendă: A=persoane sănătoase, B=donatori, C=gravide, D=cadre medicale, E=copii instituționalizați, F=studenți la medicină

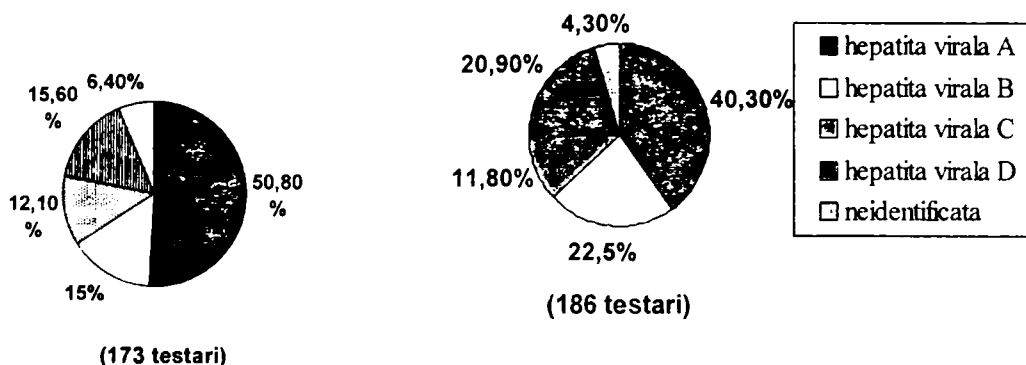


Fig. 2. Structura hepatitelor virale acute

Cele mai frecvente asocieri au fost suprainfecțiile cu VHD și VHC la persoane cu infecție B persistentă (13,4% și 7,0%), respectiv hepatite de coinfecție VHB + VHD (5,4%). Într-un procent mic (1,6%) am notat suprapunerea VHD la persoane cu evidențe serice atât de hepatită B cât și de hepatită A anterioare (Tabelul II).

Infecțiile anamnestice (anterioare) cauzate de virusurile hepatitice A, B, D și C la populația generală au fost notate în 72,6% (Tabelul III) (Fig. 3), 65,5% din persoane au avut infecție cu un singur virus, 30,4% infecții duble și 3,9% infecții triple.

Tabelul II. Ponderea hepatitelor acute multiple (186 cazuri)

Infecțiile hepatitice asociate	Nr. cazuri (%)
Hepatită D + infecție anterioară cu VHB	25 (13,4)
Hepatită C + infecție anterioară cu VHB	13 (7,0)
Coinfecție VHB + VHD	10 (5,4)
Hepatită D + infecție anterioară cu VHB și VHA	3 (1,6)
Heptită A + infecție anterioară cu VHB	2 (1,1)
Hepatită B + Hepatită D + infecție anterioară cu VHA	1 (0,5)
Total	54 (29,03)

Tabelul III. Infecții anamnestice – populație generală (nr. 420)

Infecții cauzate de	Nr. cazuri cu evidențe pozitive
VHA	160 (38,1%)
VHB	111 (26,4%)
VHD	24 (5,7%)
VHC	10 (2,5%)
Total infecții anterioare	305 (72,6%)
Negative	115 (27,3%)

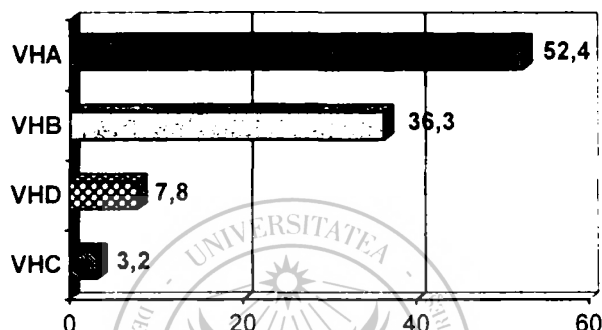


Fig. 3. Frecvențele procentuale ale infecțiilor anterioare la populația generală (nr. 305 persoane infectate)

Grupurile populaționale la risc au avut frecvențe ale infecțiilor cu VHB și VHC statistic semnificativ mai mari ($p < 0,05$) decât cele investigate la populația generală, cu excepția gravidelor ($p > 0,05$) (Tabelul IV).

Tabelul IV. Ponderea infecțiilor anamnestice cauzate de virusurile hepatice B și C la grupe populaționale la risc

Grupul investigat	Nr. examinări	VHB			VHC anti-VHC (+)
		AgHBs (+) nr. %	anti-HBc (+) nr. %	Total nr. %	
Gravide	424	29 (6,8)	85 (20,0)	114 (26,8)	28 (6,6)
Copii instituționalizați	150	33 (22)	44 (29,3)	77 (51,3)	25 (16,6)
Hemodializați	30	6 (20)	13 (43,3)	19 (63,3)	11 (36,6)
Pacienți cu BTS	302	72 (23,8)	57 (18,8)	129 (42,7)	37 (12,2)
Persoane sănătoase	420	32 (7,6)	79 (18,8)	111 (26,4)	10 (2,5)

Antigenemia HBe la gravidele AgHBs-pozitive a fost de 10,3%. Cunoscut fiind faptul că, AgHBe are un rol major în transmiterea virusului B de la mamă la copil, am căutat să aproximăm această rată de transmitere. Astfel, ținând cont de ponderea infecției B persistentă și de pozitivitatea pentru AgHBe a gravidelor, am estimat rata de incidență a infecției B prin transmitere perinatală / transversală la aproximativ 3% din totalul nașterilor pentru anul 1995.

Persoanele hemodializate au avut un grad ridicat de infectare, 19 pacienți (63,3%) au prezentat evidențe de infecție cu VHB și 11 pacienți (36,6%) evidențe de infecție cu VHC. Toți pacienții AgHBs – pozitivi au deținut și AgHBe.

Corelând ponderea infecțiilor hepatice cu volumul de sânge transfuzat și cu durata tratamentului, am remarcat creșterea ponderii ambelor infecții B și C paralelă cu numărul de unități de sânge transfuzat (Tabelul V) și cu durata dializei (Tabelul VI).

Tabelul V. Corelația dintre ponderea infecțiilor hepatice și volumul de sânge transfuzat

Ponderea infecțiilor (%) cauzate de	Unități de sânge transfuzat				
	1-5	6-10	11-20	25-50	peste 60
VHB	0	16,6	50	100	100
VHC	5,5	16,6	50	50	100
VHB+VHC	5,5	33,3	50	66,6	100

Tabelul VI. Infecțiile hepatice în corelație cu durata dializei

Durata dializei	Nr. pacienți	VHB – pozitiv (%)	VHC – pozitiv (%)	VHB + VHC (%)
1-12 luni	18	5,5	5,5	16,6
2-5 ani	6	16,6	30,0	50,0
6-9 ani	2	50,0	-	50,0
10-15 ani	3	66,6	33,3	-
peste 16 ani	1	100,0	-	-
Total	30	20,0	13,3	23,3

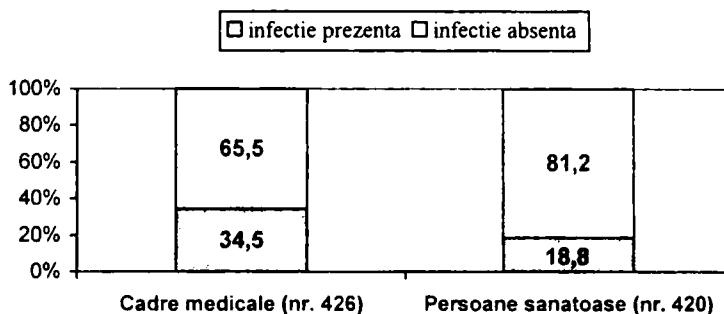
Pentru *copiii instituționalizați*, pe lângă aprecierea densității surselor de virusuri din unitățile de plasament, am mai investigat, pe baza fișelor individuale, variabile legate de condițiile sociale ale părinților și de antecedentele personale, variabile care în opinia noastră au contribuit la endemizarea marcată a infecțiilor hepatice în aceste instituții.

În acest sens, am constatat următoarele aspecte legate de condițiile sociale ale părinților: lipsa apartenenței paterne (61%), lipsa veniturilor necesare întreținerii familiei (84,7%), patologie psihiatrică a mamei (5,1%), alcoolism al părinților (49,1%), sifilis (1,6%), TBC pulmonar (11,8%), portaj de AgHBs al mamei (6,7%).

Dintre factorii legați de organismul afectat: subponderabilitatea la naștere (55,6%), boli diareice acute repetate (28,1%), antecedente de hepatite (5,8%).

Investigațiile efectuate în vederea stabilirii modalităților de contaminare au indicat că media tratamentelor injectabile a fost de numai 1,1 ori mai mare la copiii infectați față de cei neinfecțați cu VHB, și de 0,8 ori mai mare în cazul infecției cu VHC.

Din cele 424 *cadre medicale* investigate, 134 (31,4%) au deținut anti-HBc, 19 au avut evidențe de AgHBs (3,1%), ponderea infecției cu VHB a fost semnificativ mai mare ($\chi^2=26,59$) decât la populația generală (Fig. 5).



$$\chi^2=26,59$$

Fig. 5. Infecția anamnestică produsă de VHB la cadre medicale și persoane din populația generală

Referindu-ne la totalul cadrelor medico-sanitare investigate, cadrele medii au avut frecvența cea mai mare a evidențelor pentru infecția B (12,4%), urmată de ponderea înregistrată la medici (10,3%) și la personalul auxiliar (8,7%), (Tabelul VII).

Din grupurile cu risc la infecții hepatitice B și C studiate de noi, *pacienții cu boli transmise sexual* ocupă locul al treilea ca frecvență pentru ambele infecții (42,7% pentru infecția B și 12,2% pentru infecția C).

Tabelul VII. Infecția anamnestică produsă de VHB la cadre medico-sanitare

Categoría investigată	Nr. examinări	Infecția anamnestică	
		anti-HBc (+) nr. (%)	AgHBs (+) nr. (%)
Medici	177	41 (9,6)	3 (0,7)
Cadre medii	147	47 (11,03)	6 (1,4)
Personal auxiliar	75	35 (8,2)	2 (2,8)
Alte categorii	27	11 (2,5)	2 (2,8)
Total	426	134 (31,4)	13 (3,1)

Pozitivitatea pentru VHB și VHC a fost sensibil egală la pacienții cu sifilis și la cei cu gonoree (54,1% și 59,1%) (Tabelul VIII).

Tabelul VIII. Infecțiile hepatitice B și C la pacienții cu sifilis și gonoree

Pacienți	VHB - pozitiv nr. (%)	VHC - pozitiv nr. (%)	Total infectați nr. (%)
Sifilis (nr. 253)	102 (40,3)	35 (13,8)	137 (54,1)
Gonoree (nr. 49)	27 (55,1)	2 (4,1)	29 (59,1)
Total (nr. 302)	129 (42,7)	37 (12,2)	166 (54,9)

Tabelul IX. Infecția cu VHB la pacienții cu sifilis în funcție de forma clinică

Forma clinică	Infecția cu VHB (nr. cazuri)		Total
	prezentă	absentă	
Sifilis primar și secundar	75	51	126 (49,8)
Sifilis latent recent	27	100	127 (50,1)
Total	102	151	253 (100,0)

$$X^2 = 38,3$$

$$OR = 5,45 (3,02 - 9,89)$$

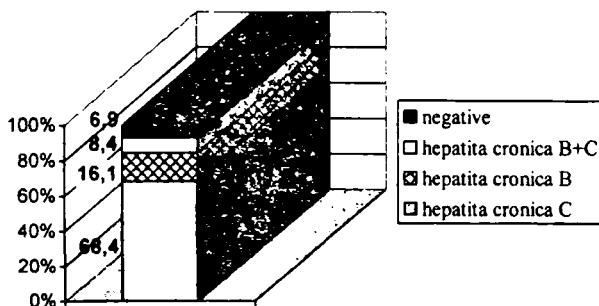


Fig. 4. Hepatitele cronice cauzate de VHB și VHC

Corelând infecția hepatică B cu formele clinice de sifilis (nr. 253) am constatat o afectare de 49,8% în sifilisul primar și secundar, pondere statistic semnificativă comparativ cu cea din sifilisul latent recent ($\chi^2=38,3\%$). Riscul pacienților cu sifilis primar și secundar de a contracta infecția cu VHB a fost de peste 5 ori mai mare față de riscul la pacienții cu sifilis latent recent (Tabelul IX).

Virusul hepatitei C a avut contribuția cea mai importantă (68,4%) în determinismul hepatitelor cronice (Fig. 4).

DISCUȚII

Datele obținute prin utilizarea unor tehnici cu sensibilitate redusă, cele utilizate în perioada anilor 1970-1980, se încadrează în limitele celor notate și de alți cercetători din țara noastră [4,5,15,25].

Considerăm însă că aceste rezultate nu exprimă gradul real de afectare al populației prin infecția cu VHB. În favoarea acestei afirmații vin rezultatele obținute ulterior, în care testarea unei game mai largi de markeri serici și utilizarea unor metode mai performante indică rate de infecție mai mari [4,13,18,23,24].

Faptul că 72,6% din persoane recrutate aleatoriu din populația generală sunt infectate cu unul din virusurile hepatice testate, demonstrează o circulație destul de intensă a virusurilor în teritoriul luat în studiu.

Structura etiologică a hepatitelor virale nu a suferit modificări notabile pe parcursul a 15 ani. Doar în cazul hepatitei acute A a fost remarcată o scădere semnificativă ($p=0,0452$). Această scădere a influențat probabil și reducerea frecvenței infecțiilor anamnestice. S-a remarcat astfel, o scădere a ponderii infecțiilor anamnestice produse de VHA, de la 77,5% la 52,4% procent apropiat de cel semnalat și de alte studii [5,24].

Circulația într-un teritoriu a mai multor virusuri hepatice, care imprimă infecțiilor pe care le induc o evoluție autolimitantă sau persistentă conformă cu istoria naturală proprie fiecărei hepatite, crează posibilitatea de apariție a infecțiilor hepatice multiple, 29% din hepatitele acute fiind de coinfectie sau de suprainfecție peste o hepatită de altă etiologie.

Același aspect a fost notat și în cadrul infecțiilor anamnestice la persoane sănătoase, 30,4% fiind infecții duble și 3,9 % triple.

Ponderile infecțiilor anamnestice notate în studiile noastre au fost mai ridicate ($p<0,05$) decât media înregistrată pentru 5 județe din Transilvania, dovadă în plus a existenței și circulației intense a virusurilor hepatice în județul nostru [18,19].

Infecțiile hepatice duble sau multiple semnifică un risc cunoscut pentru apariția formelor cu evoluție severă în cazul infecțiilor acute, respectiv pentru apariția infecțiilor cronice [11,16,17].

Cronicizarea produsă de VHC (68,4% din totalul hepatitelor cronice investigate), dar și de VHB (16,1%) poate fi pusă în legătură cu anumite incompetențe imunologice ale gazdei, progresele spre această formă de manifestare depinzând de conflictul existent între continuarea replicării virale și statusul imunologic al pacientului. În cadrul acestui conflict, virusurile hepatice pot adopta strategii diverse, cum sunt, integrarea genomului viral în genomul hepatocelular, apariția unor mutanți imunorezistenți, inhibarea limfocitelor helper, modificări ale interferonului endogen [1,17].

Cronicizarea infecțiilor hepatitice B și C este dependentă și de variabile legate de gazdă (vârsta infecției primare, anomalii metabolice, factori genetici, etc.) sau de variabile legate de mediul ambiental, respectiv de factori comportamentali (infecții hepatitice multiple, infecția HIV, alcoolul, drogurile) [1,3,20].

Delimitarea grupurilor populaționale cu / la risc pentru infecțiile hepatitice și aprecierea densității surselor de virus în cadrul fiecărui grup, au importanță pentru aprecierea extinderii infecțiilor și pentru precizarea modalităților de transmitere.

Gradul de afectare prin infecții hepatitice anterioare sau în curs a fost semnificativ mai ridicat decât la populație în general, la toate grupurile populaționale incluse în studiile noastre, excepție făcând gravidele, această secțiune populațională are însă un rol determinant în transmiterea infecției, cu precădere a infecției cu VHB la nou născuți.

Consecințele infecției transversale sau perinatale a nou născutului depind de evidențele serice ale sistemului antigenic „e” al mamei. Dacă gravida este AgHBe – pozitivă, acest antigen induce imunotoleranța fătului față de antigenele VHB, infecția copilului va deveni persistentă, posibil cu consecințe pe termen lung (aparitia portajului viral cronic, hepatita cronică, ciroza). Astăzi este unanim acceptat faptul că, rezervorul de VHB reprezentat de purtătorii de AgHBs se constituie perinatal sau în prima parte a copilăriei, purtătorii virali contribuind ulterior esențial la menținerea endemicității într-un anumit teritoriu [2,10,21,24].

Referitor la modalitățile de transmitere a virusurilor hepatitice în cadrul delimitat al unor grupuri cu risc, calculând excesul de risc (fracțiunea riscului atribuit) între pacienții dializați și populația generală, am stabilit că 64% din infecțiile B și C care au apărut la persoanele supuse tratamentului dialitic au fost atribuite transfuziilor. La acest factor de risc se mai adaugă condițiile din spital, unitățile de dializă crează posibilități de difuzibilitate orizontală a virusurilor, contribuind alături de ceilalți factori la apariția agregărilor de persoane purtătoare de virusuri, reale izvoare de infecție.

Nu considerăm că modalitatea de transmitere majoră în unitățile de plasament este modalitatea parenterală. Argumentul în favoarea acestei afirmații este adus de diferența mică între media tratamentelor injectabile la copiii infectați și neinfecțați.

Condițiile de sanitație mai precară din unitățile de ocrotire, condițiile sociale ale părinților, anumite boli asociate ale rezidenților instituționalizați, pot fi considerați cofactori amplificatori [6,13,23].

Ambianța de spital crează riscuri specifice pentru infecțiile hepatitice nu numai pentru pacienți ci și pentru cadrele medicale, riscul profesional al acestora, documentat de noi, este mare mai ales pentru infecția cu VHB.

Evaluarea riscului profesional real pentru infecțiile produse de virusurile hepatitice va permite adoptarea unor strategii de prevenție între care și vaccinarea antihepatită B, personalul medical fiind unul din grupurile eligibile pentru imunizarea activă.

Ponderea ridicată a markerilor serici ai VHB și VHC la pacienții cu boli transmise sexual (BTS) documentează că, aceste persoane se găsesc la risc atât de a contracta, cât și de a transmite infecțiile.

Se confirmă astfel faptul, semnalat și de alte studii că, transmiterea heterosexuale este o cale naturală de difuziune a infecțiilor hepatitice B și C, în condițiile în care BTS recunosc la noi în țară în ultimul timp o recrudescență [12,27].

Evoluția ascendentă a infecțiilor venerice reprezintă în consecință un semnal de alarmă și pentru evoluția infecțiilor cu VHB, VHC și HIV, infecții care au cale comună de transmitere, cea sexuală.

CONCLUZII

Existența unei circulații relativ intensă a virusurilor hepatitice A, B, C, D în zona investigată.

Infecțiile hepatitice multiple au avut o pondere relativ ridicată constituind un risc crescut pentru cronicizarea infecțiilor.

Grupurile cu risc, cu excepția gravidelor, au avut frecvențe ale infecțiilor B și C statistic semnificativ mai ridicate ($p < 0,05$), comparativ cu cele notate la populația generală.

Peste 65% din hepatitele cronice au fost cauzate de VHC.

BIBLIOGRAFIE

1. ALBERTI A, VARIO A, FERRARI & PITIS R – *Review Article: chronic hepatitis C – natural history and cofactors*, Aliment Pharmacol Ther 2005; 22 (suppl. 2): 74-78.
2. ALVAREZ-MUNOZ T, VASQUEZ-ROSALEZ J, TORRES-LOPEZ J et al – *Infection of pregnant women with hepatitis B and C viruses and risk for vertical transmission*, Arch Med Res, 1997, 28:415-419.
3. AZOICĂI D, IVAN A, CARASIEVICI E et al – *The prevalence of the possessors of serologic markers of hepatitis C virus in North-Eastern territory of Romania*, Rev Med Chir Soc Med Nat, Iași, 2001, 105:127-131.
4. BABEȘ V, STEIM N, BUZERNESCU G - *ABO blood groups and HBsAg subtypes in healthy carriers*, Vox Sang, 1997, 33:252-254.
5. BELDESCU N, BĂLAN A, POPA R - *Prevalența markerilor hepatitelor virale în populația generală*, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol, 1995, 40:101-108.
6. BOCȘAN I, RĂDULESCU A, ȘUTEU O et al – *Studiul prevalenței infecției cu VHB în colectivități de copii de tip închis – Leagănul de copii Cluj*, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol, 1994, 39:191-195.
7. BORTOLOTTI F, GUIDO M - *Hepatitis B in children*, Hepatology, 2007, 45: 831-835.
8. BOSETTI C, LEVI F, LUCCHINI F et al - *Worldwide mortality from cirrhosis: An update to 2002*, J Hepatol, 2007.
9. CHEN G, LIM W, SHEN F et al – *Chronic hepatitis B virus infection and mortality from non-liver causes*, Int J Epidemiol, 2005, 34:132-137.
10. CHEN CH, YANG PM, HUANG GT et al – *Estimation of Seroprevalence of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus in Taiwan from a Large-scale Survey of Free Hepatitis Screening Participants*, J Formos Med Assoc, 2007, 106:148-55.
11. CHU CM, SHEEN IS, LIAW YF: *The role of hepatitis C virus in fulminant viral hepatitis in an endemic area of hepatitis A and B*, Gastroenterology, 1994, 107:189-195.
12. GENTILINI G, PRIGMANO G, PASQUINI P, et al – *Risk factors for hepatitis B virus infection among heterosexuals attending a sexually transmitted diseases clinic in Italy*, J Med Virol, 1996, 40:262-266.
13. IANCU L, MORARU E, GOȚIA S et al – *Profil serologic particular în infecția cu VHB la copii*, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol, 1997, 42:55-56.
14. JACOBSEN KH, KOOPMAN JS – *The effect of socioeconomic development on worldwide hepatitis A seroprevalence patterns*, Int J Epidemiol, 2005, 34:600-609.
15. JEBELEANU L, MOLNAR G, MUREȘAN I, et al – *Incidența multianuală a sistemului HBs la diferite categorii de subiecți*, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol, 1982, 27:91-96.
16. LIN X, ROBINSON NJ, THURSZ M et al – *Chronic hepatitis B virus infection: Review of disease progression*, J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20:833-843.
17. MAGDER LS, FIX AD, MIKHAIL NN et al – *Estimation of the risk of transmission of hepatitis C and B*, Int J Epidemiol, 2005, 34:160-165.
18. MOLNAR G, POPA S, JEBELEANU L, DAMIAN C – *Studiul prevalenței markerilor serici ai infecției cu virusurile hepatitice în anamneza epidemiologică a populației*, Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol, 1994, 39:141-150.
19. NEAMȚU A, NEAMȚU D, GORGAN I, STATE D – *Serum prevalence of hepatitis D and C virus infection markers in asymptomatic HBsAg carriers from Transylvania, Romania*, Rom J Gastroenterol, 1995, 4:147-156.
20. PÉREZ MC, SUÁREZ E, TORRES EA et al – *Seroprevalence of hepatitis C and associated risk behaviours: a population-based study in San Juan, Puerto Rico*, Int J Epidemiol, 2005, 34:593-599.
21. PRASAD LR, MASSERY SPICHER V, KAMMERLANDER R, ZWAHLEN M – *Hepatitis C in a sample of pregnant women in Switzerland: seroprevalence and socio-demographic factors*, Swiss Med Wkly, 2007, 137:27-32.

22. QUOILIN S, HUTSE V, VANDENBERGHE H – *A population-based prevalence study of hepatitis A, B and C virus using oral fluid in Flanders, Belgium*, Eur J Epidemiol, 2007, 22:195-202.
23. RĂDULESCU A, RĂFIROIU C, BOCȘAN I, et al – *Horizontal transmission of the hepatitis B virus infection in Romanian orphanages*, Rom J Gastroenterol, 1996, 5: 159-163.
24. SABĂU M, DĂNILĂ M, GOLEA C, TOMA F, SIN A – *Acut și cronic în infecțiile hepatitice*, University Press, Târgu Mureș, 2001.
25. STEINER N, BABEȘ V, BERCA C – *Incidence of HBeAg in some areas of Romania*, Rev Roum Med Virol, 1978, 28:141-146.
26. WASLEY A, MILLER JT, FINELLI L; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) – *Surveillance for acute viral hepatitis – United States 2005*, MMWR Surveill Summ, 2007, 56:1-24.
- 27.*** Anuar de Statistică Sanitară, Ministerul Sănătății, Centrul de Calcul și Statistică Sanitară, București, 2006.



Isolation and structure elucidation of new diterpenoids from *Euphorbia pannonica* Host.

Edvárd Sulyok, Dóra Rédei, Judit Hohmann, Imre Máthé

Department of Pharmacognosy, University of Szeged, Eötvös u. 6, H-6720 Szeged, Hungary

Ingenane, tiglliane and daphnane diterpenes, called in common as phorboids, are typical constituents of the family Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. Earlier studies on these compounds focused mainly on their powerful skin irritant and tumour promoting activities, which are the result of protein kinase C activating potential. Further investigations have disclosed a much wider pharmacological activities e.g. cytotoxic, antileukemic, antiviral, sedative and analgesic effects. Among the phorboids ingenol 3-angelate is of special interest because of its strong PKC activating effect; this compound is now investigated in phase II clinical trial in the treatment of basal cell carcinoma and actinic keratosis.

As part of our ongoing search for biologically active compounds from Hungarian Euphorbiaceae, we report herein the isolation and structure determination of two new diterpenes from *Euphorbia pannonica* Host. This plant is a perennial herb native to south, eastern and central regions of Europe. Phytochemical or biological investigation on *E. pannonica* has not been reported previously.

The MeOH extract of the dried whole plants of *E. pannonica* was subjected to solvent partitioning to afford dichloromethane and water-soluble fractions. The organic phase was fractionated by column chromatography on polyamide with MeOH-H₂O mixtures as eluents, then by vacuum liquid chromatography on silica gel using a gradient system of cyclohexane-chloroform-acetone. Selected fractions from this separation were further purified by CPC, preparative TLC, NP- and RP-HPLC to yield two pure compounds. The structure elucidation was carried out by extensive NMR studies using advanced experiments (¹H NMR, JMOD, ¹H-¹H COSY, HSQC and HMBC). The isolated compounds were identified as 4,12-dideoxyphorbol-20-benzoate-13-isobutyrate and 4,12-dideoxyphorbol-20-benzoate-13-isovalerianate.

Phorbol esters and their 4- or 12-deoxy derivatives frequently occur in the Crotonoideae and Euphorbioideae subfamily of Euphorbiaceae, but other oxygenation pattern, such as 16-hydroxy-, 12-deoxy-16-hydroxy-, 12-deoxy-5-hydroxy-, 12,20-dideoxy- and 6,7-epoxy-5-hydroxy have limited distribution. 4,12-dideoxyphorbols, isolated in our experiment are also very rare diterpenes, only the parent alcohol and its two esters were isolated earlier from *Excoecaria bicolor* (Euphorbiaceae).

Phorbol esters occur naturally mainly in the form of 12,13-diester and 12,13,20-triesters of the polyhydroxylated tiglliane nucleus. Generally, the triesters do not exhibit pro-inflammatory activity on mammalian skin, but the 12,13-diester of phorbol (e.g. 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate = TPA) possess strong skin irritant, tumor-promoting effect due to their PKC activating effect, and have extensively been studied because of their pharmacological-toxicological importance. Investigation of the pharmacological potential of 4,12-dideoxyphorbol diesters, obtained from *E. pannonica* command particular interest.

Aanaliza flavonoidelor din frunzele de afin (*Myrtilli folium*)

M. Tămaș, L. Vlase, Cristina Pop

Facultatea de Farmacie, UMF Cluj-Napoca
Str. E. Isac Nr. 13, e-mail: mtbotanica@yahoo.com

Au fost analizate prin două tehnici CSS și CLIP/SM, flavonoidele din frunzele de afin (*Myrtilli folium*). Prin CSS am pus în evidență 5 glicozide flavonoidice din care am identificat hiperozida și quercitrina. Conținutul total de flavonoide determinat spectrofotometric este de 1,70%.

Prin CLIP/SM am separat 14 componente în produsul nehidrolizat și 17 în produsul hidrolizat. Am identificat și cuantificat hiperozida (54,74 mg%) și quercitrina (52,58 mg%) și, în urma hidrolizei acide, 104,97 mg% quercetol.

În frunzele de afin am mai identificat compuși fenil-propanici de tipul acidului cafeic și am determinat conținutul de proantociani (0,42%) și polifenoli tanoizi (9,09%).

Cuvinte cheie: flavonoide, *Myrtilli folium*, CSS, CLIP/SM.

The flavonoids from bilberry's leaves (Myrtilli folium), were analyzed by mean of two methods TLC and HPLC-MS. By mean of TLC 5 flavonoids were separated and identified. The total content of flavonoids is about 1.70%.

By mean of HPLC/MS 14 components were separated in the extract and 17 in the acid hydrolyzed extract. In the former we are identified the hyperoside (54.74 mg%) and quercitrine (52.58%) and the quercetol (104.97 mg%) in the hydrolyzed extract.

In the leaves of bilberry are present acid derivatives proanthocyan (0.42%) and tanoid polyphenols (9.09).

Key words: flavonoids, *Myrtilli folium*, TLC, HPLC-MS.

Frunzele de afin (*Myrtilli folium*) reprezintă un produs vegetal important pentru fitoterapie având proprietăți hipoglicemizante și antiidiareice [1,3,6,12,13] iar în flora României există suficiente resurse pentru valorificarea acestora. Afinul (*Vaccinium myrtillus* – *Ericaceae*), este un arbust pitic cu frunze caduce și fructe bace de culoare neagră-violacee ce vegetează în tot lanțul Carpatic și M-ții Apuseni și formează asociații caracteristice (afinișuri) de la limita inferioară a pădurilor de molid până în zona alpină.

În frunzele de afin s-au identificat flavonoide, proantociani, taninuri catechice și galice, o heterozidă a acidului galic (neomirtitina), acizi triterpenici, săruri de Cr și Mn [1,6,7,12,13]. Deși arbutozida a fost semnalată în lucrările mai vechi, cercetările recente au infirmat prezența ei în frunzele de afin sau se găsește doar în urme [9]. S-a determinat un conținut de 1,20% flavonoide [7] dar există mari variații în funcție de gradul de iluminare, frunzele plantelor de lumină având un conținut de 2-3 ori mai ridicat decât a celor ce vegetează în semiumbră [8].

ICE și WENDER [4] au semnalat pentru prima dată prezența în frunzele de afin a heterozidelor quercetolului iar GERHARDT [2] a izolat o glucuronidă a quercetolului.

Deoarece lipsesc studii analitice asupra flavonoidelor de afin din România, ne-am propus un studiu al acestor substanțe prin CSS și CLIP-SM.

MATERIAL ȘI METODĂ:

Am utilizat frunze de afin (*Myrtilli folium*) provenite de la "R.A. Plafar Cluj", măcinate la o pulbere fină (sita VI FR X).

Analiza calitativă prin CSS am efectuat-o în următoarele condiții experimentale [10,14]:

- faza staționară: silicagel G Merck, plăci gata trase de 10x15 cm;
- faza mobilă: acetat de etil:acid formic:acid acetic:apă (72:7:7:14);
- distanța de migrare: 7,5 cm;
- proba de analizat: 0,5 g *Myrtilli folium* se extrage pe baia de apă în firbere timp de 15 min cu 10 ml alcool metilic, într-un balon prevăzut cu refrigerent ascendent. După filtrare se aduce la 10 ml cu același solvent.
- substanțe etalon: rutozidă, hiperozidă, quercitrozidă, acid cafeic, acid clorogenic (Roth) soluții 0,1 % în alcool metilic;
- cantitatea aplicată: 20 μ l din probă și 10 μ l din soluția etalon;
- identificare: R. Neu-PEG [14].

Pentru analiza agliconilor flavonoidici obținuți după hidroliza acidă conform tehnicii descrise de Tămaș și al. [10] am modificat următoarele condiții față de tehnica de mai sus:

- faza mobilă: toluen:acetat de etil:acid formic (5:3:1) (faza organică);
- substanțe etalon: quercetol, apigenină, luteolină, acid cafeic (Roth) soluții 0,1 % în alcool metilic.

Conținutul total de flavonoide a fost determinat prin tehnica spectrofotometrică indicată de FR X pentru *Cynarae folium* [1,5] conținutul în proantociani după tehnica Labreton [5] iar polifenolii tanoizi după FR X [15].

Analiza CLIP cuplată cu spectrometria de masă s-a realizat după tehnica utilizată și în cazul flavonoidelor din *Origanum vulgare* [11], folosind ca standarde 18 substanțe etalon [Tabel I] iar identificarea componentelor pe baza timpilor de retenție și a spectrelor de masă.

S-a folosit un aparat cromatografic Agilent 1100 HPLC Series system (Agilent, USA) echipat cu o pompă binară, degazor, autosampler, termostat setat la 48°C și doi detectori, unul UV HP 1100 series iar celălalt pentru fluorescență. Coloană Zorbax SB-C18 100 mm x 3,0 mm i.d., 3,5 μ m, filtru on line 0,5 μ m.

Faza mobilă a fost preparată în gradient binar din metanol și o soluție de acid acetic 0,1% (v/v). Eluția a început în gradient liniar cu 5% metanol și în final cu 42% metanol timp de 35 min., eluție izocratică urmată apoi timp de 3 min. cu 42% metanol. Rata de curgere a fost de 1 ml/min și volumul injectat a fost de 5 μ l. Detectia substanțelor izolate s-a realizat în UV la 330 nm până la 17 min iar de la 17 la 38 min. la 370 nm apoi în UV la 350 nm.

Proba nehidrolizată a fost obținută din 0,25 g pulbere vegetală refluxată cu 25 ml metanol iar pentru proba hidrolizată 10 ml extract metanolic se tratează cu 10 ml HCl 2N pe baia de apă timp de 4 ore iar după răcire soluția se extrage de două ori cu 10 ml acetat de etil. Fazele organice se deshidratează peste Na₂SO₄ anh. se evaporă la sec iar reziduul se reia cu 5 ml metanol și se aduce la 10 ml cu apă. Se injectează 10 μ l din soluția centrifugată.

Condițiile de lucru MS: sursa de ioni ESI (electrospray), mod ionizare: negativ; nebulizator: azot, presiune 60 psi; gaz de uscare: azot, debit 12 l/min, temperatura 350°C; potențial capilară +3000 V; mod de analiză: monitorizare ioni specifici (pentru acizi polifenolicarboxilici și AUTO MS (flavonoide și agliconii acestora)).

REZULTATE ȘI DISCUȚII:

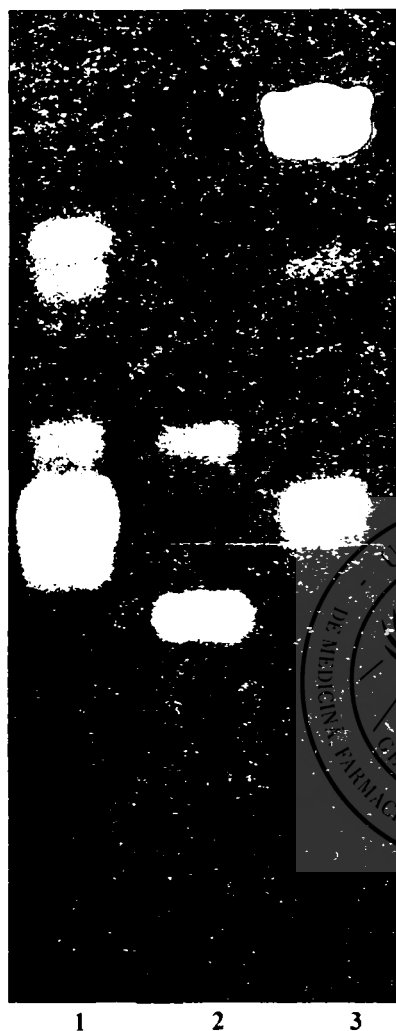


Figura 1. CSS pentru extractul nehidrolizat de *Myrtilli folium*.

1. extract *Myrtilli folium*;
2. rutozidă, hiperozidă, quercitrozidă,
3. acid clorogenic și acid cafeic.

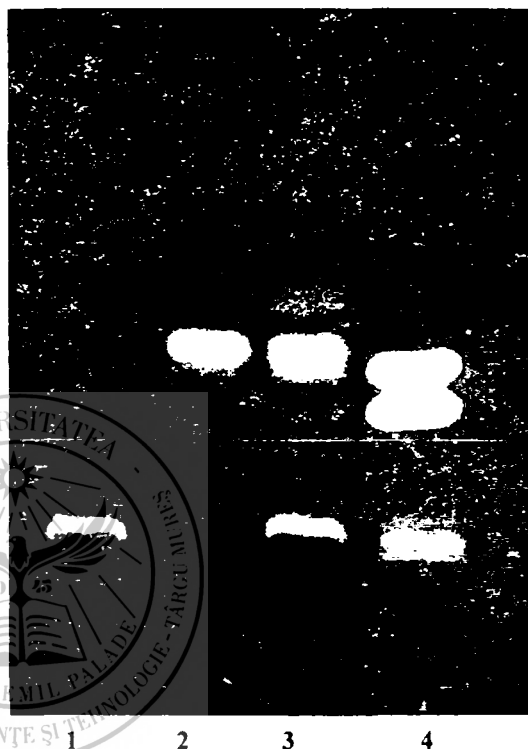


Figura 2. CSS pentru extractul hidrolizat de *Myrtilli folium*.

- 1: extract *Myrtilli folium* nehidrolizat;
- 2: quercetol;
- 3: extract hidrolizat *Myrtilli folium*
- 4: acid clorogenic și acid cafeic.

Din analiza cromatogramei pe strat subțire (fig. 1) am constatat că în frunzele de afin sunt prezente 5 fracțiuni flavonoidice cu fluorescență galbenă-portocalie dintre care una este identică cu hiperozida (R_f 0,48) și una cu quercitrozida (R_f 0,68). Alte fracțiuni flavonoidice apar la R_f 0,40 (parțial suprapusă cu acidul clorogenic), la R_f 0,60 și 0,75. este prezent și acidul clorogenic (R_f 0,35) și acidul cafeic (R_f 0,90), cu fluorescențe albastre.

Din analiza cromatogramei pe strat subțire a agliconilor flavonoidici (Fig. 2) rezultați în urma hidrolizei acide se poate afirma că în frunzele de afin există un singur aglicon principal – quercetolul la Rf 0,38, cu fluorescență galben-verzuie. Mai apar cantități reduse de acid clorogenic și acid cafeic.

Timpii de retenție ai substanțelor de referință obținuți prin CLIP sunt prezenți în Tab. I.

Tabelul I. Timpii de retenție (t_R) pentru polifenolii standard

Nr. picului	Compus fenolic	t _R ± SD (min)	Nr. picului	Compus fenolic	t _R ± SD (min)
1	Acid caftaric *	2,10± 0,06	11	Myricetin	20,70 ± 0,06
2	Acid gentisic *	2,15± 0,07	12	Fisetin	22,60 ± 0,15
3	Acid cafeic *	5,60± 0,04	13	Quercitrin	23,00 ± 0,13
4	Acid clorogenic *	5,62± 0,05	14	Quercetol	26,80 ± 0,15
5	Acid p-coumaric	8,7± 0,08	15	Patuletine	28,70 ± 0,12
6	Acid ferulic	12,2 ± 0,10	16	Luteolin	29,10 ± 0,19
7	Acid sinapic	14,3 ± 0,10	17	Kaempferol	31,60 ± 0,17
8	Hyperoside	18,60 ± 0,12	18	Apigenin	33,10 ± 0,15
9	Izoquercitrin	19,60 ± 0,10			
10	Rutoside	20,20 ± 0,15			

*Picurile corespunzătoare se suprapun pe semnalul UV pentru aceste substanțe s-a făcut doar determinare calitativă pe baza spectrelor MS înregistrate.

După timpii de retenție am identificat cele mai importante componente flavonoidice sub aspect cantitativ: hiperozida și quercitrozida în extractul nehidrolizat și quercetolul în cel hidrolizat (Tab. II și III) confirmând în acest fel rezultatele obținute prin CSS (Fig. 3,4). Dintre compușii fenil-propanici existenți în extractul nehidrolizat am identificat acidul glutisic, ac. cafeic, ac. clorogenic, ac. p-cumaric, ac. ferulic.

Tabelul II. Proba extract nehidrolizat 5% în metanol

Compus	Nr.	Identificat UV	Confirmat MS	Concentrație în extract(pg/ml)	Observații
Ac gentisic	2	NU	DA	-	a
Ac cafeic	3	NU	DA	-	a
Ac clorogenic	4	NU	DA	-	a
Ac p-cumaric	5	DA	DA	2.046	
Ac ferulic	6	DA	DA	0.257	
Hyperozid	8	DA	DA	35.664	
Rutozid	10	DA	DA	0.652	
Quercitrin	13	DA	DA	37.448	
Quercetol	14	DA	DA	0.569	

a=Determinare calitativă pe baza datelor MS

Tabelul III. Proba extract hidrolizat 5% în metanol

Compus	Nr.	Identificat UV	Confirmat MS	Concentrație în extract (μg/ml)	Observații
Ac caftaric	1	NU	DA	-	a
Ac gentisic	2	NU	DA	-	a
Ac cafeic	3	NU	DA	-	a
Ac clorogenic	4	NU	DA	-	a
Ac p-cumaric	5	DA	DA	9.097	
Ac ferulic	6	DA	DA	1.478	
Ac sinapic	7	DA	DA	1.364	
Quercetol	14	DA	DA	67.888	
Kaempferol	17	DA	DA	2.139	

a=Determinare calitativa pe baza datelor MS

Conținutul în flavonoide totale determinat prin tehnica spectrofotometrică este de 1,70% iar pentru proantociani de 0,42% în timp ce polifenolii tanoizi sunt în concentrație de 9,09%.

Conținutul în flavonoide individuale, determinat prin CLIP-SM, pe baza unor curbe de etalonare construite pe baza semnalului detectorului UV; iar confirmarea de structură s-a făcut calitativ pe baza semnalelor detectorului de masă. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tab. II (înainte de hidroliză) și Tab. III (după hidroliză). Și aceste rezultate confirmă că în frunzele de afin principalele heterozide flavonoidice sunt hiperozida (54,71 mg%) și quercitrozida (52,58 mg%) iar rutozida se găsește doar în urme. În extractul hidrolizat componentul flavonoidic principal este quercetolul (104,97 mg%).

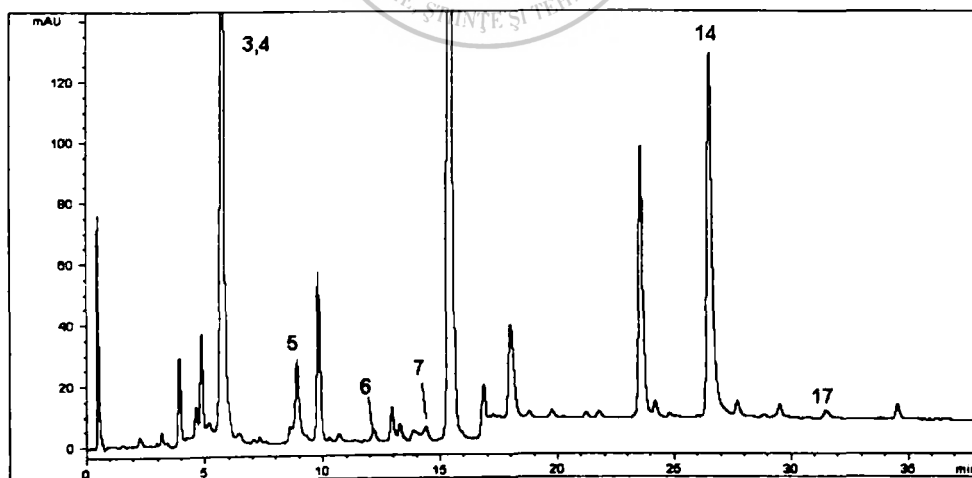


Figura 3. CLIP pentru extractul nehidrolizat de *Myrtilli folium*

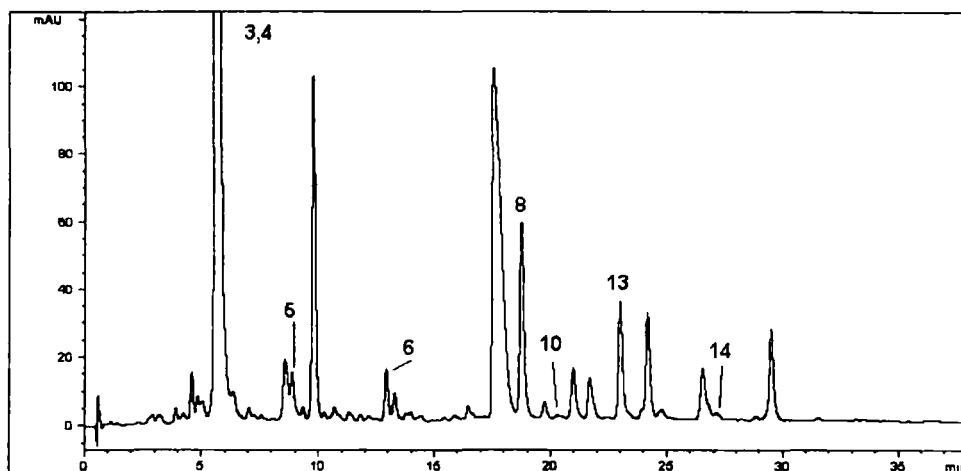


Figura 4. CLIP pentru extractul hidrolizat de *Myrtilli folium*

CONCLUZII:

Au fost analizate calitativ și cantitativ, prin două tehnici, flavonoidele din frunzele de afin (*Myrtilli folium*).

Prin CSS au fost puse în evidență 5 glicozide flavonoidice dintre care am identificat hiperozida și quercitrozida. Agliconul flavonoidic este reprezentat de quercetol. Conținutul total de flavonoide, determinat spectrofotometric este de 1,70%.

Prin CLIP/SM am pus în evidență 14 componente dintre care principalele sunt hiperozida (54,74 mg%) și quercitrina (52,58%) în timp ce în produsul de hidroliză am identificat agliconul quercetol în concentrație de 104,97 mg%, confirmând astfel analizele prin CSS.

Pe lângă flavonoide am identificat și cuantificat și derivați fenil-propanici între care acidul p-cumaric, acidul ferulic, acidul gentisic, acidul cafeic, acidul clorogenic și acidul sinapic.

Frunzele de afin mai conțin 0,42% proantociani și 9,09% polifenoli tanoizi.

BIBLIOGRAFIE:

1. BENIGNI R, CAPRA O, CATTORRINI PE - *Piante Medicinali. Chimia, farmacologia e terapia*, vol. II, Milano, Inverni della Beffa, 1962, 951-959.
2. GERHARDT G, SINNWELL V, KRAUS LJ - *Isolierung von Quercitrin 3-glucuronid aus Heidelbaere und Rauschbeerblaettern durch. DCC*, Planta Medica, 1989, 55:200-201.
3. GRIGORESCU E, LAZĂR MI, STĂNESCU U, CIULEI I - *Index fitoterapeutic*, Iași, [s.n.], 2001, 334-335.
4. ICE CH, WENDER SH - *Quercetrin and its glycosides in leaves of Vaccinium myrtillus*, I. J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75:50-52.
5. LEBRETON PH, JAY M, VOIRIN B - *Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoids*, Chim. Anal. Fr., 1967, 49:375-383.

6. STĂNESCU U, HÂNCIANU M, MIRON A, APROTOSOAIE C - *Plante medicinale de la A la Z*, vol. II, Iași, Ed. "Gr. T. Popa", 2004, 403-405.
7. TĂMAȘ M - *Determinarea cantitativă a flavonoidelor în frunzele speciilor indigene ale Ord. Ericales*, Farmacia, 1973, 31 (5):299-304.
8. TĂMAȘ M - *Variația conținutului de flavone în frunzele de Vaccinium myrtillus și V. vitis-idaea în funcție de gradul de iluminare*, St. cerc. biochim., 1974, 17 (1):77-81.
9. TĂMAȘ M; POP C - *Metode de analiză a arbutozidei din plante*. Analele St. Univ. de Stat de Med. și Farm. N. Testemițeanu (Chișinău), 2005, 1:456-461.
10. TĂMAȘ M, CRIȘAN G; DULFU C, PURTAN M - *Studiul comparativ al flavonoidelor din frunzele și mugurii speciilor indigene de plop*, Farmacia, 2002, 50 (3) 78-83.
11. TĂMAȘ M, OPREAN I, VLASE L - *Phytochemical research on Origanum vulgare L. (Lamiaceae) from Romania*, Proceedings from 3rd CMAPSEEC, Belgrade, Serbia 2006, 33-39.
12. WICHTL M; BISSET NG (ED.) - *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, Stuttgart, Medpharm. Sci. Publ., 1994, 348-350.
13. WEISS RF, FINTELMANN V - *Herbal Medicine*, 2nd ed., Stuttgart; New-York, 2000, 128-129.
14. YORK H, FUNK W; FISCHER W; WIHMER H - *Thin-Layer Chromatography*, Weinheim, VCH Verl., 1990, 277-280.
15. ***. *Farmacopeea Română*, Ed. X, București, Ed. Medicală, 1993.



Új 26-hidroxi Ekdiszteroidok izolálása a *Silene viridiflora*-ból

Tóth N.¹#, Simon A.², Tóth G.², Miklóssy Váry V.³, Máthé I.¹, Báthory M. I

¹Szegedi Tudományegyetem, Farmakognózi Intézet, Szeged Eötvös u. 6. - 6720

²Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Általános Analitikai Kémiai Intézet, Budapest, Gellért tér 4. - 1111

³MTA, Ökológiai és Botanikai Kutató Intézet, Vácrátót, Alkotmány u. 2-4. - 2163
#: toth.noemi@invitel.hu

Ecdysteroids represent a large family of polyhydroxylated steroids. They are widely distributed both in invertebrates and plants. There is a growing interest in ecdysteroids due to their important human pharmacological effects (1). Large amounts of ecdysteroids are presently being produced for human use (2). Silene viridiflora has been considered as a good source of ecdysteroids, including new, hitherto never identified compounds. We now report the isolation and structural identification of five minor ecdysteroids from this plant. The isolation procedure started with extraction. The crude extract was purified using simple separation techniques, such as fractionated precipitation and solvent-solvent partition. Further purification included vacuum column chromatography on C18 and cyano silica and HPLC. Structural identification was done by using mass spectrometry and NMR spectroscopy. Our sophisticated isolation procedure led to the discovery of some new 26-hydroxylated ecdysteroids, such as 20,26-dihydroxyecdysone 20,22-monoacetone, 2-deoxy-26-hydroxy-polipodine B, 26-hydroxy-polypodine B 20,22-monoacetone in addition to 2-deoxy-20,26-dihydroxyecdysone and 20,26-dihydroxyecdysone.

Az ekdiszteroidok, ezek a polihidroxi szteroidok széles körben elterjedtek mind a rovarok, mind a növények körében. A rovarokban vedlési hormon szerepet töltenek be, a növényekben valószínűleg részt vesznek a fejlődésükben, illetve védik a növényt a nem adaptálódott kártevőkkel szemben. Koncentrációjuk a növényekben két nagyságrenddel magasabb, mint a rovarokban, mely elérheti a szárított növény tömegének 3,4%-át. Az emlősökön tapasztalt értékes farmakológiai hatásai miatt számos ekdiszteroid tartalmú egészségjavító készítmény kereskedelmi bevezetésére került sor. Az ekdiszteroidok adaptogén, antiaritmiás és anabolikus hatással rendelkeznek. Anabolikus hatásuk timolitikus és androgén mellékhatások nélkül érvényesül [1,2].

A Caryophyllaceae család *Silene* fajai igen gazdag ekdiszteroid források, közülük a *Silene viridiflora* nagy mennyiségben és széles szerkezeti változatosságban tartalmazza az ekdiszteroidokat. Munkánk során számos ekdiszteroidot izoláltunk a növényből, melyek közül figyelemre méltó a 26-os szénatomon hidroxilezett ekdiszteroidok sora.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az 1-es ábra az előtisztítás, a 2-es ábra az izolálás menetét mutatja, az I. táblázat az oszlopkromatográfiás frakcionálások, a II. táblázat a HPLC elválasztásoknál használt álló és mozgó fázisok adatait tartalmazza.

EREDMÉNYEK

A *Silene viridiflora* herba metanolos kivonatának előtisztítása folyadék-folyadék közti megosztással és frakcionált kicsapással történt. Az így nyert kivonatot szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk tovább. A szilárd fázisú extrakciónál négy lépéses gradiens elúciót hajtottuk végre vizes metanol elegyekkel (30-60 %), a metanol koncentrációját minden lépésnél 10%-al emeltük. Az ekdiszteroidok elúciója 40-50% vizes metanollal ment végbe. A tisztítás teljes menetét mind TLC-s, mind HPLC-s ellenőrzéssel követtük.

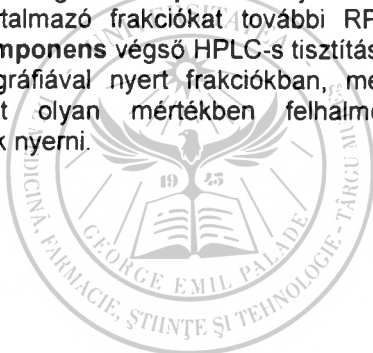
A 40%-os vizes metanollal eluálódott frakciókban feldúsult az **1. komponens**, melyet ismételt fordított fázisú, alacsony nyomású oszlopkromatográfiával tisztítottuk tovább. Az **1. komponens**t minden RP oszlopról 40%-os vizes metanollal tudtuk leszorítani. E vegyület végső tisztítását normál fázisú HPLC-vel (NP-HPLC) hajtottuk végre. A HPLC-nél kétlépéses elválasztást alkalmaztunk, az egymást követő lépésekben eltérő szelektivitású oldószert használtunk.

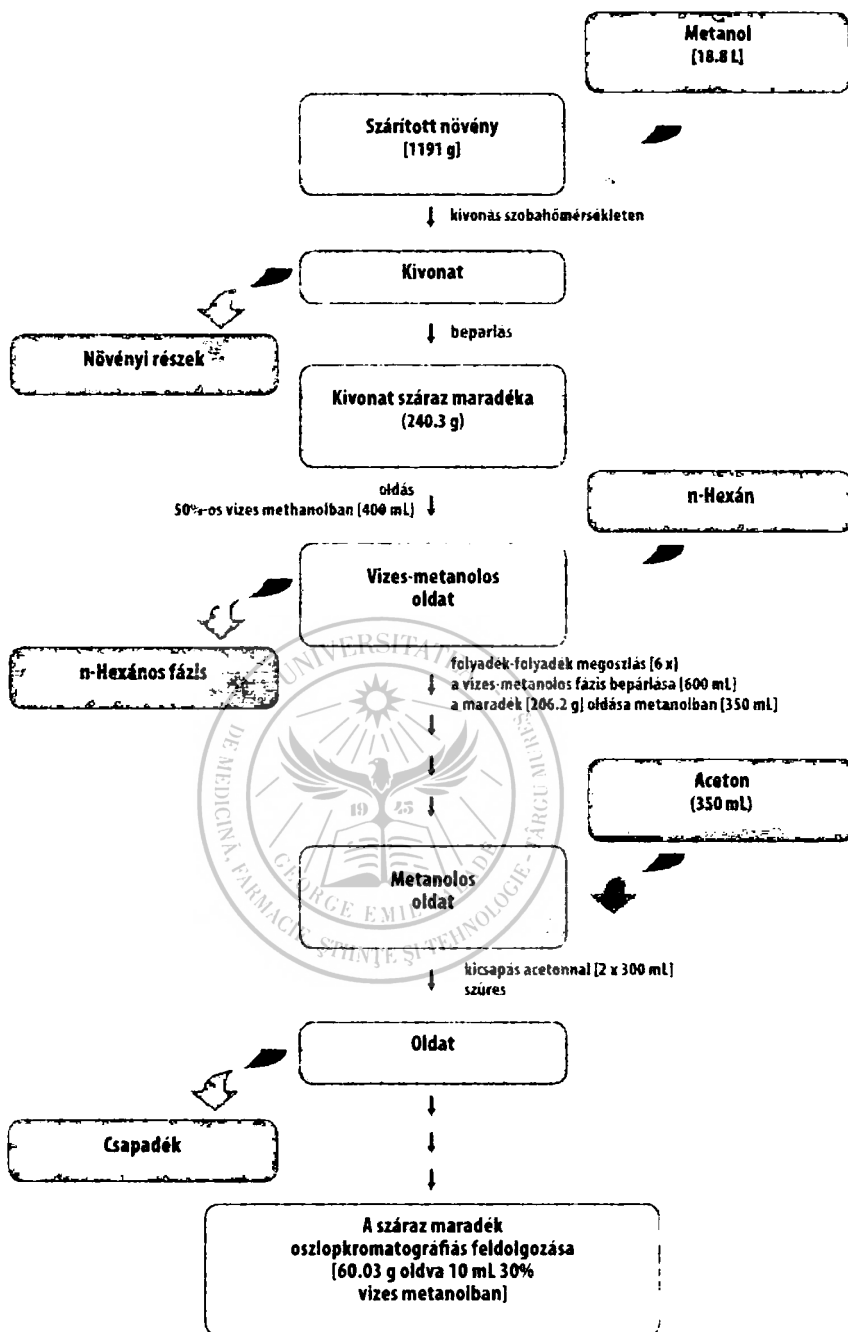
Az első fordított fázisú oszlopról 50%-os metanollal eluálódott ekdiszteroidokat ismételt fordított fázisú oszlopkromatográfiás elválasztásnak vetettük alá, majd ciano szilika (CN) álló fázisú oszlopkromatográfiát alkalmaztunk. Az ekdiszteroidokat kísérő fenoloidoktól poliamid álló fázisú oszlopkromatográfiával szabadultunk meg. A poliamid oszlopról vízzel eluálódtak az ekdiszteroidok, melyeket további CN-fázisú oszlopkromatográfiával választottuk el. A 3. ábrán az első CN-fázisú oszlopkromatográfiával nyert frakciók TLC kromatogramja látható.

Azokat a frakciókat, melyek a **2. komponens**t tartalmazták NP-HPLC-vel tisztítottuk tovább, így spektroszkópiás tisztaságú **2. komponens**t nyertünk.

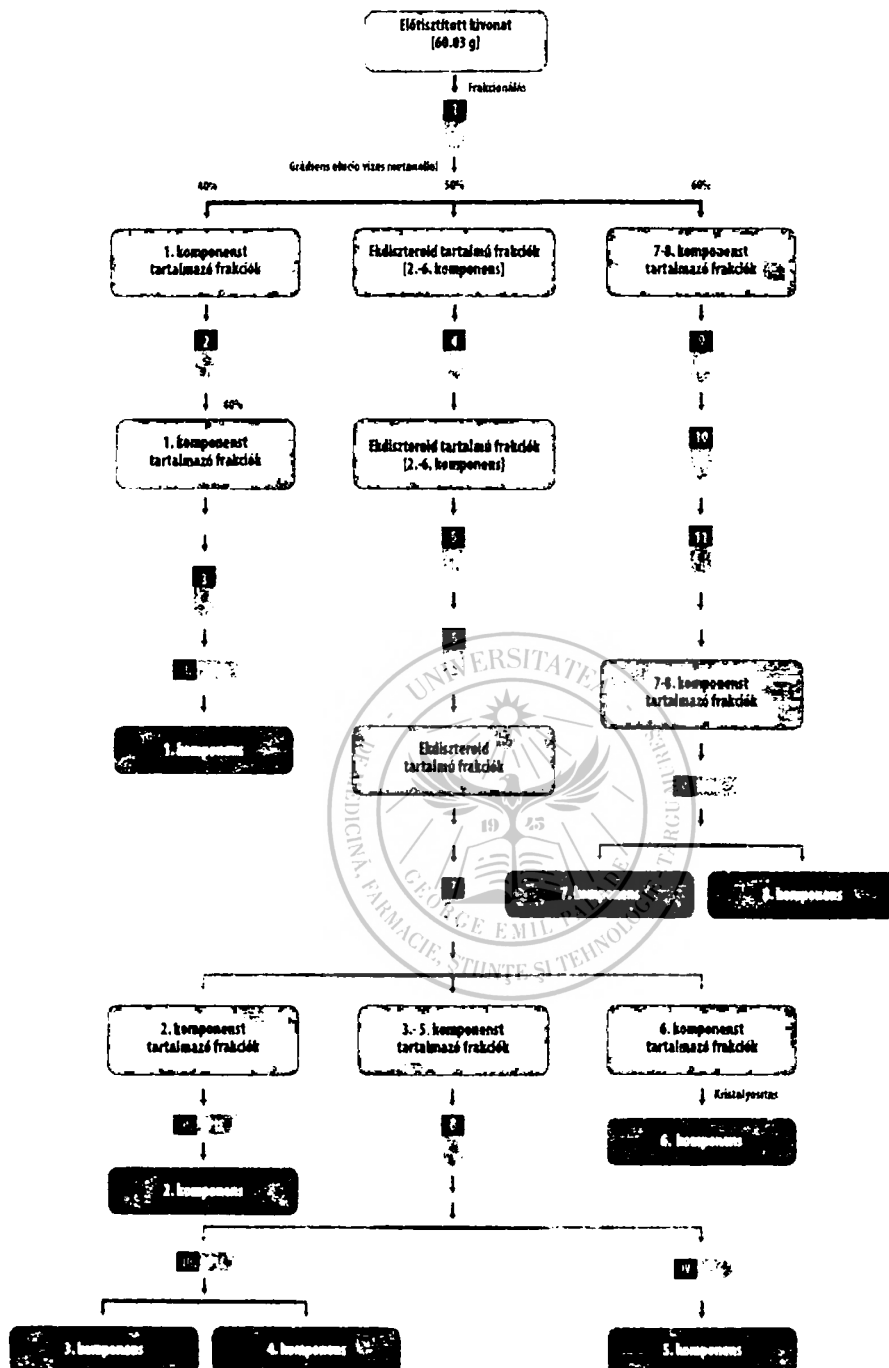
A **3. és 4. komponens**t tartalmazó frakciókat további RP-LC-CC-vel és HPLC-vel frakcionáltuk. A 4. ábra a **3. komponens** végső HPLC-s tisztítását szemlélteti.

Az CN-fázisú oszlopkromatográfiával nyert frakciókban, melyek az **5. komponens**t tartalmazták ez a vegyület olyan mértékben felhalmozódott, hogy egyszerű kristályosítással tisztán ki tudtuk nyerni.





1. Ábra. Az előtisztítás folyamata



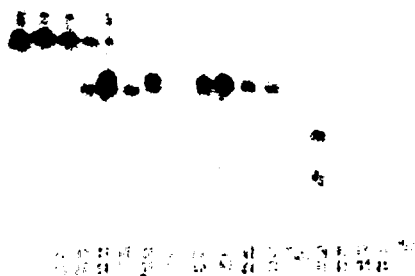
2. Ábra. Az izolálás folyamata

I. Táblázat. Az oszlopkromatográfiás frakcionálás és tisztítás adatai

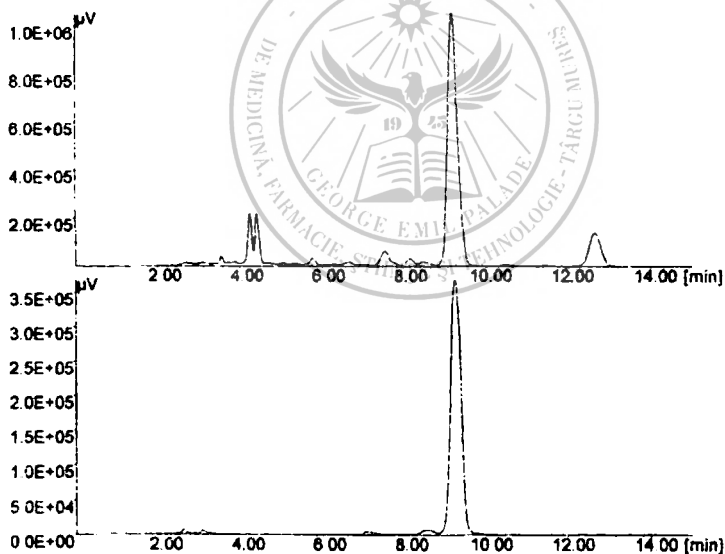
Oszlop jele	Adszorbens	Adszorbens tömege (g)	Felvitt anyag tömege (g)	Eluens	Frakciók térfogata (ml)
1	RP-18, 0,06-0,2 mm Chemie-Urticon-C-gel, C-650	540	60,03	Metanol:Víz	1000
2	RP-18, 0,06-0,2 mm Chemie-Urticon-C-gel, C-650	180	6,78	Metanol:Víz	250
3	RP-18, 0,06-0,2 mm Chemie-Urticon-C-gel, C-650	180	5,12	Metanol:Víz	300
4	RP-18, 0,06-0,2 mm Chemie-Urticon-C-gel, C-650	90	2,94	Metanol:Víz	300
5	Preparative cianó adsorbent, 0,063-0,200 mm, Omacht	12	0,63	DKLM:Etanol	50
6	MN- Polyamid SC 6	12	1,23	Metanol:Víz	150
7	Preparative cianó adsorbent, 0,063-0,200 mm, Omacht	12	1,16	DKLM:Etanol n- Hexán:Aceton	70

II. Táblázat. A HPLC rendszerek adatai

Jelzés	Kolonna töltet	Kolonna méret (mm×mm)	Aramlási sebesség (ml/min)	Oldószerrendszer
I/a. HPLC	HibarR 250-4 LiChrospherR Si 100 5µm, Merck	4,5×250	0,7	cHexán:Izopropanol:Víz (100:40:3 v/v/v)
I/b. HPLC	HibarRT 250-4 C18 5µm, Merck	4,6×250	1	DKLM:Izopropanol:Víz (125:40:2 v/v/v)
II. HPLC	Zorbax SB-CN 5µm, Agilent	4,6×250	1	cHexán:Izopropanol (100:15 v/v)
III. HPLC	Zorbax RX-Sil 5µm, Agilent	9,4×250	3	DKLM:Izopropanol:Víz (125:40:3 v/v/v)
IV. HPLC	Zorbax RX-Sil 5µm, Agilent	4,6×250	2	DKLM:Etanol:Víz (125:11:2 v/v/v)



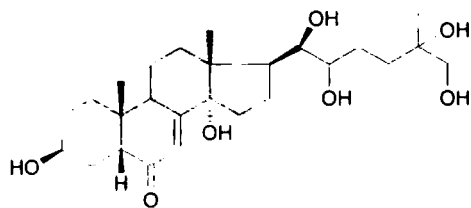
3. Ábra. A 7. Cianó-fázisú oszlopról gyűjtött és egyesített frakciók TLC képe látható fénynél, vanillinkénsavas előhívás után. Láthatók a frakciók melyekben a 2.-5. komponensek feldúsultak.



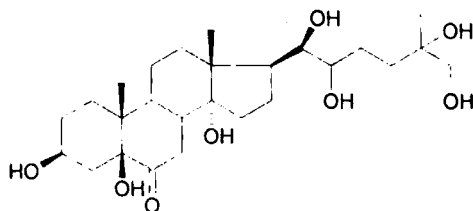
4. Ábra. A 3. komponens végső tisztítása a III. HPLC-s rendszerben

Az izolált ekdiszteroidok szerkezetvizsgálata MS és NMR spektroszkópiával (1D-, 2D-, HMQC, HMBC, COSY, TOCSY, NOESY, ROESY) történt.

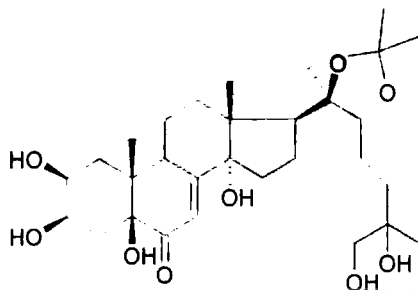
Az 5. ábra az izolált ekdiszteroidok kémiai szerkezetét ábrázolja.



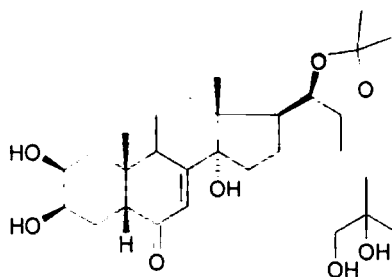
1. komponens: 2-dezoxi-20,26-dihidroiekdizon



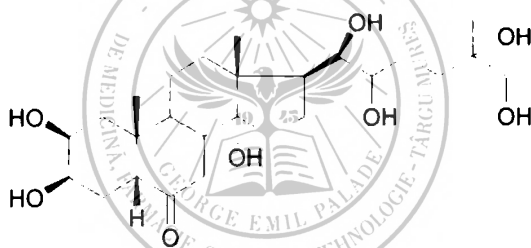
2. komponens: 2-dezoxi-5,20,26-trihidroiekdizon



3. komponens: 5,20,26-trihidroiekdizon-20,22-monoacetonid



4. komponens: 20,26-dihidroiekdizon-20,22-monoacetonid



5. komponens: 20,26-dihidroiekdizon

5. Ábra. Az izolált vegyületek szerkezeti képletei

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az előtisztításra egyszerű, preparatív léptékű tisztítási módszereket használtunk: folyadék-folyadék közötti megosztást és frakcionált kicsapást. Az apoláris szennyező anyagokat folyadék-folyadék közti extrakcióval a poláris szennyező anyagokat frakcionált kicsapással távolítottuk el [1]. Ezt követte a szilárd fázisú extrakció fordított fázison (C_{18}). Az előtisztítás ezen fázisában a minta nagy mennyisége és a tisztítandó vegyület alacsony koncentrációja miatt nagy terhelhetőségű módszert kellett alkalmazni. Így indokolt volt a szilárd fázisú extrakció ismételt alkalmazása fordított fázison. A módszernél és a későbbiekben használt fordított fázisú oszlopkromatográfiánál a vegyületek eltérő lipofilicitását és különböző megoszlási állandóját kihasználva történt az elválasztás. Az RP oszlopkromatográfia előnye, hogy nem kellett számolni az ekdiszteroidok álló fázishoz való irreverzibilis kötődésével, ellentétben az adszorpciós kromatográfiás módszerekkel. A fordított fázis újrahaználható és alacsony nyomáson is működtethető. Bizonyos ekdiszteroidok tiszta kinyerése viszont nem volt megvalósítható egy lépésben RP-CC-vel.

Az együtt eluálódott komponensek szétválasztását ismételt fordított fázisú oszlopkromatográfiával oldottuk meg. Esetenként HPLC, vagy CN-fázisú oszlopkromatográfia együttes alkalmazása segített a tiszta vegyületek kinyerésében. A CN-álló fázis egyedülálló előnyökkel rendelkezik más álló fázisokkal szemben, mivel mindfordított, mind normál fázisú módban alkalmazható. Ezt a tulajdonságát jól fel lehet használni az izolálásoknál. A CN-fázisú oszlopkromatográfia ismételt használata egyszerűen megoldható, az állófázis metanollal könnyen regenerálható. Sem a RP-LP-CC, sem pedig a CN-fázisú oszlopkromatográfia nem rendelkezik kielégítő komponenskapacitással. Így használatukat mindig HPLC elválasztás kell kövesse az ekdiszteroidok végső tisztítására.

Az izolált vegyületek közül a 2-deoxi-5,20,26-trihidroxi-ekdizon, 20,26-dihidroxi-ekdizon-20,22-monoacetonid, 5,20,26-trihidroxi-ekdizon-20,22-monoacetonid, új természetes vegyületek, míg a többi ekdiszteroidot: 2-deoxi-20,26-dihidroxi-ekdizont, 20,26-dihidroxi-ekdizont elsőként izoláltuk a *Silene viridiflora*-ból. Munkánk igazolta, hogy a *Silene viridiflora* alkalmas nyersanyagforrása a 26-os helyzetben hidroxilezett ekdiszteroidoknak.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

Munkánkhoz a T&T JAP-22/02 OMFB-00756/200 támogatás nyújtott anyagi segítséget.

REFERENCIÁK

1. PONGRÁCZ Z., BÁTHORI, M. et al. - *Phytoecdysteroids - from isolation to their effects on humans*, Curr Med Chem. 2005, 12, (2):153-72.
2. LAFONT R. DINAN L., et al. - *Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update*, J Insect Sci. 2003, 3:7.

Fenolos típusú hatóanyagok vizsgálata Myrtilli- és Vitis-idaeeae foliumból. A talaj pH-jának hatása a fenolos anyagok mennyiségére.

Vancea Szende¹, Szabó Judit², Varga Erzsébet¹, Donáth-Nagy Gabriella¹

¹Marosvásárhelyi Orvostudományi és Gyógyszerészeti Egyetem, Romania

²Szent Anna Gyógyszertár, Kézdivásárhely, Romania

prep. drd. Vancea Szende: Marosvásárhely, 540139, Gh. Marinescu 38 szám.

e-mail: szende_17@yahoo.com

A *Vaccinium myrtillus* L. leveleit a fitoterápia elsősorban vércukorszintcsökkentőként ismeri, de Háromszék környékének népgyógyászata, termésével együtt, közkedvelt hasfogóként, bélfertőtlenítőként használja. A bélfertőtlenítő hatását a cserzőanyagok felelősek. A *Vaccinium vitis-idaea* L. leveleit húgyúti fertőzések kezelésére alkalmazzák. Ezt a hatást az arbutin biztosítja. Ami az arbutint illeti, egyes szerzők a Myrtilli foliumban is leírják jelenlétét, de az adatok ellentmondásosak és nem meggyőzőek.

Vizsgálatainkhoz Háromszék négy zónájából gyűjtöttük be a növényeket. Mivel ezen fajok kimondottan savanyú talajt kedvelő félcserjék, meghatároztuk a gyűjtési területek talajának pH-ját, keresve ennek hatását a különböző tartalmi anyagok mennyiségére (flavonoidok, polifenolok, cserzőanyagok). Ugyanakkor célul tűztük ki igazolni/ cáfolni az arbutin jelenlétét a különböző helyekről gyűjtött Myrtilli foliumban.

Meghatározásaink során nem sikerült arbutint kimutatni a Myrtilli foliumból. Az áfonya-állományok kémiai összetétele és a területek talajának pH-ja között jelentős összefüggés van. A savasabb talaj mindkét faj esetén negatívan befolyásolja a flavonoidok mennyiségét. A fekete áfonya esetén nagyobb polifenol és cserzőanyag tartalomhoz magasabb, míg a vörös áfonya esetén alacsonyabb pH-jú talaj szükséges. Ezért gyűjtéskor ajánlatos figyelembe venni a talaj kémhatását, ahhoz, hogy megfelelő hatást biztosító hatóanyagtartalmú drogot nyerjünk.

Kulcsszavak: Myrtilli folium, Vitis-idaeeae folium, fenolos vegyületek, talaj pH

The leaves of Vaccinium myrtillus are used in phytotherapy as hypoglycemic agents, but in folk medicine of Covasna County they are used together with fruits to treat diarrhea. The effect is due to the presence of tannins. The leaves of Vaccinium vitis-idaea are used in infections of the urinary tract. This effect is due to the arbutin content. Concerning the arbutin content in Myrtilli folium, the literature data are contradictory, some authors mention a low concentration. Leaves of both plants were collected from four different territories in Covasna County. As this bushes are growing on acidic soils, we have determined the pH of the soil on which they are growing, with the aim to see if there exists a correlation between the content of phenolic compounds (flavonoids, polyphenols, tannins) and the pH of the soil. The aim of our study was also to identify arbutin in Myrtilli folium. The results indicate that, there is no arbutin in Myrtilli folium. We found a significant relation between phenolic compounds and soil-pH. The increase of pH reduces the flavonoid content in both plants. The tannin content of Myrtilli folium is higher at a pH value about 5, while that of Vitis-idaeeae folium is higher at pH about 3. Therefore, to obtain products of high quality, it is recommended to pay attention to the soil pH.

Key words: Myrtilli folium, Vitis-idaeeae folium, phenolic compounds, soil pH

A hazai népgyógyászatban igen népszerűek az Ericaceae családba tartozó, vizsgálataink tárgyát képező áfonyafajok. Mindkét faj 750 m tengerszint feletti magasságon fordul elő és kimondottan savanyú talajt kedvelő félcserje [6, 4].

A *Vaccinium myrtillus* L. (fekete áfonya) leveleit a fitoterápia elsősorban vércukorszintcsökkentőként ismeri, de Háromszék környékének népgyógyászata, termésével együtt, közkedvelt hasfogóként, bélfertőtlenítőként használja. Számos szerző a

vércukorszintcsökkentő hatást a magas krómtartalommal magyarázza, viszont a bélfertőtlenítő hatásért minden valószínűséggel a cserzőanyagok felelősek [2, 7, 8, 9].

A *Vaccinium vitis-idaea* L. (vörös áfonya) leveleit széles körben húgyúti fertőzések kezelésére alkalmazzák. Ezen hatásért az arbutin felelős [2, 3, 5, 7, 8, 9]. Ami az arbutint illeti, egyes szerzők a Myrtilli foliumban is leírják jelenlétét, de az adatok ellentmondásosak és nem meggyőzőek [3, 4, 7, 8, 9].

Vizsgálatainkhoz Háromszék négy zónájából (Bálványosi Hidegfürdők, Torjai Büdös barlang, Lassúági Ezeréves erdő, Mohos tőzegláp) gyűjtöttük be a Myrtilli foliumot és a *Vitis idaeae* foiumot [16].

Meghatároztuk a gyűjtési területek talajának pH-ját, keresve ennek hatását a különböző tartalmi anyagok mennyiségére (flavonoidok, polifenolok, cserzőanyagok). Ugyanakkor célul tűztük ki igazolni/ cáfolni az arbutin jelenlétét a különböző helyekről gyűjtött Myrtilli foliumban.

KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK, MÓDSZEREK

A leveleket 2004 nyarán, száraz, napos időben gyűjtöttük, szobahőmérsékleten szárítottuk és tároltuk. Meghatározásainkat frissen porított drogból végeztük.

Minták gyűjtési helye és ideje.

1. fekete áfonya levél, Szent-Anna tó-Mohos (2004. július 9)
2. fekete áfonya levél, Torjai Büdös barlang környéke I (2004. július. 16)
3. vörös áfonya levél, Torjai Büdös barlang környéke I (2004. július. 16)
4. vörös áfonya levél, Lassúág-Ezeréves erdő (2004. augusztus. 15)
5. fekete áfonya levél, Lassúág-Ezeréves erdő (2004. augusztus. 15)
6. vörös áfonya levél, Bálványos-Hidegfürdők (2004. július. 16)
7. fekete áfonya levél, Bálványos-Hidegfürdők (2004. július. 16)
8. fekete áfonya levél, Torjai Büdös barlang környéke II (2004. július. 10)
9. vörös áfonya levél, Torjai Büdös barlang környéke II (2004. július. 10).

Talaj pH-jának meghatározása

A termőtalajok pH-ját potenciometriásan határoztuk meg [1]. A kapott pH értékeket a következő táblázat foglalja össze.

I. táblázat: A termőtalajok pH-ja

Gyűjtés helye	pH
Torjai Büdös barlang	3,54
Lassúág-Ezeréves erdő	5,20
Bálványos-Hidegfürdők	3,80
Szent-Anna tó-Mohos	3,95

Minőségi meghatározások

Az arbutin kimutatását vékonyréteg kromatográfiás (VRK) módszerrel végeztük metanolos kivonatból. Állófázis: Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Kifejlesztő elegy: etilacetát, metanol, víz (100:13,5:10). Előhívószerként a Gibb's reagent (2, 6 diklór-p-benzokinon-4-

klórimid 1%-os metanolos oldata) használtuk: az arbutin kékeslilára színeződött látható fényben ammóniás gőzölés után [10, 11].

A flavonoidok azonosítására szintén VRK módszert használtunk. A metanolos kivonatokat Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) állófázisra vittük fel. Az aglikonok vizsgálatára kloroform, aceton, hangyasav (75:16,5:8,5), míg a glikozidok vizsgálatára etilacetát, jégecet, víz, hangyasav (50:5,5:13:5,5) kifejesztő elegyet használtunk. Előhívószersz: Naturstoff reagens (1%-os metanolos difenil-bórsav-etilamin-észter oldat és 5 %-os etanolos polietilénlikol oldat keveréke). A lemezeket előhívás előtt UV_{254 nm}-en, előhívás után pedig UV_{365 nm}-en értékeltük ki [10, 14].

Mennyiségi meghatározások

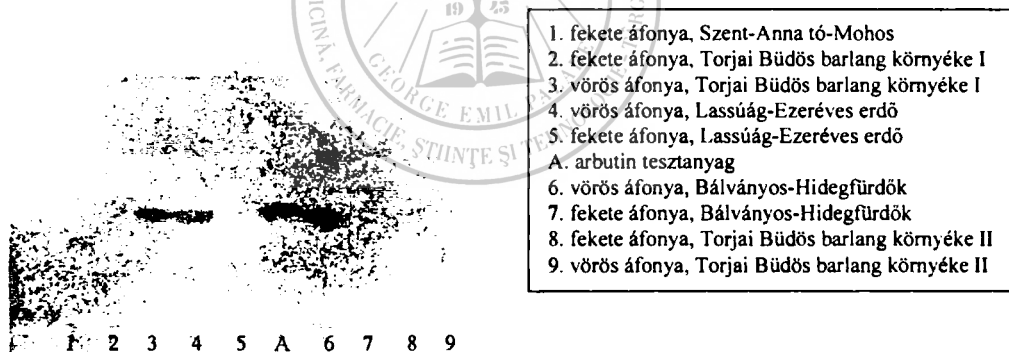
A flavonoid aglikonok spektrofotometriás mennyiségi meghatározása savas hidrolízis és alumínium kloridos komplexálás után történt. A mérőoldat abszorbanciáját 425 nm-en mértük és a flavonoid tartalmat hiperoxidban fejeztük ki [15].

Az összpolicenol és cserzőanyag tartalom meghatározására a Folin reagenst és bórpórt felhasználó spektrofotometriás módszert alkalmaztuk [14].

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

A minőségi és mennyiségi meghatározások során összehasonlítottuk Felső-Háromszék különböző területein gyűjtött vörös áfonya levél és fekete áfonya levél fenolos hatóanyagait. A meghatározásokhoz vékonyréteg-kromatográfiás, valamint spektrofotometriás módszereket használtunk.

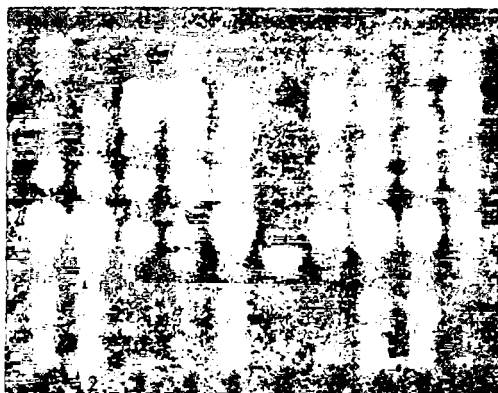
A drogok VRK vizsgálata során arbutint csak a vörös áfonya leveléből sikerült kimutatni. Az 1. ábrán a kék színeződés az arbutin jelenlétére utal ($R_f = 0,47$).



1. ábra: Myrtilli folium és Vitis-idaee folium arbutinos kromatogramja, látható fényben, Gibb's reagenssel való előhívás után

Kapott eredményeink összhangban vannak egyes szakirodalmi adatokkal, melyek szerint a Myrtilli folium nem, vagy esetleg csak nyomokban tartalmaz fenolglikozidokat (arbutint) [8].

Vizsgáltuk továbbá a levelekben jelen levő flavonoid glikozidokat és aglikonokat. A 2. és 3. ábrán látható kromatogramokból kiderült, hogy a flavonglikozidok közül a rutin ($R_f \sim 0,3$) csupán a Vitis idaeae foliumban található meg, viszont az aglikonok közül a quercetin ($R_f \sim 0,4$) úgy a Myrtilli foliumban mint a Vitis idaeae foliumban jelen van.



1. fekete áfonya, Szent-Anna tó-Mohos
2. fekete áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke I
3. vörös áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke I
4. vörös áfonya, Lassúág-Ezeréves erdő
5. fekete áfonya levél, Lassúág-Ezeréves erdő
- R. rutin tesztanyag
6. vörös áfonya, Bálványos-Hidegfürdők
7. fekete áfonya, Bálványos-Hidegfürdők
8. fekete áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke II
9. vörös áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke II

2. ábra: Myrtilli folium és Vitis-idaee folium flavonoid glikozidos kromatogramja, UV₃₆₅ fényben, Naturstoff reagenssel való bepermetezés után



1. fekete áfonya, Szent-Anna tó-Mohos
2. fekete áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke I
3. vörös áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke I
4. vörös áfonya, Lassúág-Ezeréves erdő
5. fekete áfonya, Lassúág-Ezeréves erdő
- Q- quercetin tesztanyag
6. vörös áfonya, Bálványos-Hidegfürdők
7. fekete áfonya, Bálványos-Hidegfürdők
8. fekete áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke II
9. vörös áfonya, Torjai Bűdös barlang környéke II

3. ábra: Myrtilli folium és Vitis-idaee folium flavonoid aglikonos kromatogramja, UV₃₆₅ fényben, Naturstoff reagenssel való bepermetezés után

A flavonoid mennyiségi meghatározás eredményeit az II. táblázat foglalja össze.

II. táblázat: A fekete és vörös áfonya összpolicfenol és cserzőanyag tartalma

Drogok	Gyűjtés helye	A	Flavonoid tartalom (%)
Fekete áfonya levél	Torjai Bűdös barlang I	0,232	0,29
	Torjai Bűdös barlang környéke II	0,566	0,71
	Lassúág-Ezeréves erdő	0,821	1,03
	Bálványos-Hidegfürdők	0,682	0,85
	Szent-Anna tó-Mohos	0,675	0,84
Vörös áfonya levél	Torjai Bűdös barlang I	0,375	0,47
	Torjai Bűdös barlang környéke II	0,414	0,52
	Lassúág-Ezeréves erdő	0,673	0,84
	Bálványos-Hidegfürdők	0,498	0,62

Amint a bemutatott értékekből látható a fekete áfonya flavonoid tartalma magasabb mint a vörös áfonyáé, de mindkét növény esetén a Lassúág-Ezeréves erdőből gyűjtött drog tartalmazza a legnagyobb mennyiségű flavonoidot. Ez azzal magyarázható, hogy ezen a területen a talaj pH-ja (5,20) magasabb a többi vizsgált területhez képest.

Mindkét tanulmányozott áfonyafajta számottevő mennyiségben tartalmaz polifenolokat, valamint cserzőanyagokat, de ezek mennyisége jelentősen eltér a különböző területek között. A kapott eredményeket a III. táblázat foglalja össze.

III. táblázat: A fekete és vörös áfonyában található flavonoidok mennyisége

Drogok	Gyűjtés helye	A ₁	A ₂	Összpolifenol tartalom (%)	Cserzőanyagtar- talom (%)
Fekete áfonya levél	Torjai Bűdös barlang I	1,067	0,378	7,94	5,13
	Torjai Bűdös barlang környéke II	1,173	0,432	8,73	5,51
	Lassúág-Ezeréves erdő	1,410	0,337	10,49	7,98
	Bálványos-Hidegfürdők	0,962	0,322	7,16	4,76
	Szent-Anna tó-Mohos	0,847	0,336	6,30	3,80
Vörös áfonya levél	Torjai Bűdös barlang I	1,816	0,546	13,51	9,45
	Torjai Bűdös barlang környéke II	1,051	0,340	7,82	5,29
	Lassúág-Ezeréves erdő	0,820	0,519	6,10	2,24
	Bálványos-Hidegfürdők	0,824	0,335	6,13	3,64

Ugyanakkor látható, hogy a Lassúág-Ezeréves erdőből (pH = 5,20) gyűjtött *Vitis idaeae* folium, valamint a Torjai Bűdös barlang környékéről (pH = 3,54) származó *Myrtilli* folium leggazdagabb polifenolokban és cserzőanyagokban. Ezek alapján elmondható, hogy a vörös áfonya magasabb pH-n, míg a fekete áfonya alacsonyabb pH-n termel többet ezekből az anyagokból.

KÖVETKEZTETÉSEK

Meghatározásaink megerősítik azon irodalmi adatokat, melyek szerint a *Myrtilli* folium nem tartalmaz arbutint, így nem is használható eredményesen húgyúti fertőzések kezelésére.

Vizsgálataink bebizonyították, hogy az áfonya-állományok kémiai összetétele és a termőtalaj pH-ja között jelentős összefüggés van.

A savasabb talaj mindkét faj esetén negatívan befolyásolja a flavonoidok mennyiségét.

A fekete áfonya esetén nagyobb polifenol és cserzőanyag tartalomhoz magasabb, míg a vörös áfonya esetén alacsonyabb pH-jú talaj szükséges.

Ezért gyűjtéskor ajánlatos figyelembe venni a talaj kémhatását, ahhoz, hogy megfelelő hatást biztosító hatóanyagtartalmú drogot nyerjünk.

A drogok magas cserzőanyag tartalma magyarázza ezek bélfertőtlenítő, konstipáló hatását. Ezek biztosítják a *Myrtilli* folium hasmenésben való alkalmazását, ugyanakkor,

mellékhatásként székrekedést okozva, hátrányt jelentenek a *Vitis idaeae* foliummal való húgyúti fertőtlenítő kezelések esetén.

IRODALOM

1. BOJIȚĂ M, SÂNDULESCU R, ROMAN L et al – *Analiza și controlul medicamentelor*, Ed. Intelcredo, Deva, 2003, Vol 1., 163-168, Vol. 2., 174-177, 306-308.
2. CHEVOLIER A – *Encyclopedia of herbal medicine*, DK Publishing, 2000, 14-16, 31.
3. CIULEI I, GRIGORESCU E, STĂNESCU U – *Plante medicinale, Fitochimie și Fitoterapie*, vol.I. Editura Medicală, București, 1993, 103, 139-151, 526-535, 552-553.
4. CRĂCIUN F., BOJOR O., ALEXAN M. – *Farmacia naturii*, vol II, Editura Ceres, București, 1977.
5. EȘIANU SIGRID, CSEDÓ K – *Curs de farmacognozie* vol. I., Litografia UMF Târgu Mureș, 1999, 84-86.
6. KÁRPÁTI Z. – *A növények világa II.*, Gondolat Könyvkiadó, Budapest 1969, 261.
7. PÁRVU C. – *Universul plantelor*, Editura Enciclopedică, București, 1997, 19-20, 383-384.
8. STĂNESCU URSULA, MIRON ANCA ET AL – *Plante medicinale de la A la Z*, Editura "Gr. T. Popa", UMF, Iași, 2004, 403-405.
9. SZABÓ L. Gy. – *Gyógynövény-ismereti tájékoztató*, Schmidt und Co. – Melius Alapítvány, Baksa-Pécs, 2005, 284-284.
10. SZÓKE ÉVA, KÉRY ÁGNES – *Farmakognózia*, Gyakorlati Jegyzet, Budapest, 2000, 91, 95-99.
11. WAGNER H, BLADT S – *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography*, Atlas Springer, 1996.
12. ****European Pharmacopoeia*, Ed. a IV-a, Council of Europe, Strasbourg, 2002, pag.738-739.
13. ****European Pharmacopoeia*, Ed. a V-a, 2004. Vol II.
14. *** *VII. Magyar Gyógyszerkönyv*, Ed. Medicina, Budapest, 2004 vol. II:2225-2226.
15. ****Deutsches Arzneibuch*, Ed. a X-a.
16. ***<http://www.cosys.ro/haromszek/falvak/balvanyosfurdo/leiras.html>

A *Telekia speciosa* fitokémiai vizsgálata

Ványolós Attila^{*}, Csedő Károly¹, Báthori Mária², Máthé Imre³

^{*},^{2,3} SZTE GYTK Farmakognózi Intézet, Szeged 6720, Eötvös u. 6.

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem,
Farmakognózia és Fitoterápia Tanszék

Telekia speciosa (Schreb.) Baumg. (syn. *Bupththalmum speciosum*), a member of the Asteraceae family, is widely distributed in Eurasia. To date, little phytochemical work has been performed on *T. speciosa* (known as „yellow oxeye” in English); these investigations revealed the presence of sesquiterpene lactones, flavonoids, fatty acids and sterols.

20-hydroxyecdysone and two structurally related sterols were isolated from this species. The isolation protocol included simple separation methods such as solvent-solvent distribution and precipitation, multisteps chromatographic methods. Column chromatography on polyamide was used for the separation of phenolic compounds from sterols. The isolation was followed by reversed phase column chromatography on endcapped octadecyl silica and normal phase column chromatography on silica. The last purification step was performed by RP-HPLC.

Key words: *Telekia speciosa*, 20-hydroxyecdysone, sterols, isolation

A *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. (syn. *Bupththalmum speciosum*), a Teleki-virág az Asteraceae családba tartozó eurázsiai elterjedésű növény, amelyet fitokémiai szempontból eddig kevésbé vizsgáltak. Az eddig izolált és azonosított vegyületek a flavonoidok, a szeszkviterpén laktonok, a szterolok illetve az alifás zsírsavak csoportjából kerülnek ki. A szakirodalmi adatok alapján a szterolok közül a β -szitoszterol és a sztigmaszterol található meg a növényben.

Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a fent említett növényben potenciálisan előforduló ekdiszteroidokat és rokon vegyületeiket. A család számos faja gazdag ezekben az összetevőkben, pl.: *Leuzea carthamoides*, *Serratula wolffii* stb.

Az ekdiszteroidok mellett, hogy a rovarok vedlési hormonjaiként működve a metamorfózis különböző biokémiai folyamatait szabályozzák, változatos farmakológiai hatást fejtenek ki az emlősökben is: anabolikus, adaptogén, antiaritmiás hatás stb.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényi nyersanyagként a *Telekia speciosa* földfeletti részét használtuk, melynek gyűjtési helye Hargita (Tekerőfeje), míg ideje 2003 július volt.

Vizsgálataink során különböző kromatográfiai módszereket alkalmaztunk:

Rétegekromatográfia (TLC): normál fázisú réteg – DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck-Darmstadt-Germany). Detektálás: UV fényben 254 nm-en (CAMAG UV lámpa), majd vanillin-kénsavas előhívást követően 366 nm-en illetve természetes fényben.

Szilárd fázisú extrakció: poliamid oszloptöltet – MN-Polyamid SC 6 (Macherey-Nagel, Düren, Germany), szemcseméret: 0,05-0,16 mm.

Alacsony nyomású oszlopkromatográfia: reverz töltet (C₁₈) Chemie Ueticon-C-Gel, C-560, 0,06-0,2 mm szemcseméretű kémiaiag kötött szilikagél fázis

Légköri nyomású oszlopkromatográfia: szilikagél oszloptöltet, Kieselgel 60 (63-200 μ m) Merck Darmstadt, Germany;

Rotációs planár kromatográfia (RPC): készülék – Harrison (Model 8924) Chromatotron (Harrison Research, Palo Alto, CA); állófázis – szilikagél 60 GF₂₅₄ (E. Merck), 1 és 4 mm rétegben.

HPLC: pumpa - Agilent 1100, detektor - Jasco Model UV 2075, mozgófázis – víz-metanol (65:35 v/v), oszlop – Zorbax ODS 9,4x250 mm, szemcseméret 5 μ , frakciószedő - Isco Retriever 500 (Teledyne Isco, Inc., Lincoln, NE)

A rétegekromatográfiás elválasztások során az alábbi eluens elegyeket használtuk:

TLC: (1) toluol-aceton-etanol-ammonia (25%) (100:140:32:9 v/v/v/v); (2) etil-acetát-etanol-víz (80:10:5 v/v/v); diklór-metán-metanol-benzol (25:5:3 v/v/v)

RPC: gradiens elúció: (1) etilacetát-etanol-víz (80:2:1, 80:5:2, 80:10:5, 80:20:10 v/v/v), (2) diklórmétán-metanol-benzol (50:3:2, 50:5:3, 50:7:6, 50:8:6 v/v/v/v)

IZOLÁLÁS FOLYAMATA

A *Telekia speciosa* szárított földfeletti részét (787g) megdaráltuk, majd 8 liter metanollal szobahőmérsékleten perkoláltuk. A metanolos oldatot vákuum-desztillációval 40° C-on, 337 mbar nyomáson bepároltuk. Az így nyert száraz maradékot (113,3g) 450 ml metanolban oldottuk, majd 450 ml vízzel elegyítettük, a metanolos-vizes oldatot 3x500 ml n-hexánnal kiráztuk a klorofill eltávolítására, az így kapott metanolos-vizes fázist bepároltuk. A száraz maradékot (79,5 g) 150 ml metanolban oldottuk, 75 ml acetonnal kicsaptuk, a csapadékot szűrtük és metanol-aceton 2:1 arányú elegyével mostuk. A szűrletet bepároltuk, 120 ml metanolban feloldottuk, majd 240 ml acetonnal újra kicsaptuk, a csapadékot metanol-aceton 1:2 arányú elegyével mostuk, majd szűrtük és bepároltuk. Az így nyert száraz maradék tömege 27,7 g lett.

Az előtisztítás során nyert 27,7 g tömegű maradékot 2,5-szeres mennyiségű (70g) poliamidon adszorbeáltattuk, töltésként ugyanennyi állófázist használtunk. A poliamid oszlopról összesen négy frakciót szedtünk le: víz, víz-metanol (9:1), víz-metanol (1:1), metanol használatával (rendre 1000, 1300, 1000, 1000 ml). A frakciók bepárlásával a következő tömegű száraz maradékokat kaptuk: 18,58; 1,86; 3,6 illetve 1,56 g.

A fent említett kivonatokat fordított (C₁₈) fázisú oszlopkromatográfiával tisztítottuk tovább, az oszloptöltet tömege 150 g volt. A száraz kivonatokat 30% metanolt tartalmazó vizes oldatban feloldottuk, majd az oszlopra történő felvitele után gradiens elúciót alkalmaztunk víz-metanol (7:3, 65:35, 6:4, 55:45, 1:1 v/v) 500 ml térfogatú elegyeivel, 100 ml-es frakciókat szedve.

Az 1-13 egyesített frakciót tovább tisztítottuk fordított fázison, a fentivel azonos módon. A reverz fázisú tisztítás során nyert 4-13 frakciót bepároltuk (3,29 g) és 8,3 g szilikagéltre adszorbeáltattuk, oszloptöltésként 83 g mennyiségű szilikagélt használtunk. Eluensként diklórmétán-etanol változó arányú, egyenként 400 ml térfogatú elegyét használtuk: (1) 1:0, (2) 95:5, (3) 9:1, (4) 8:2, (5) 7:3, (6) 1:1.

A (3) ill. a (4) frakciókat RPC módszerrel tovább tisztítottuk. Mozgóféázisként az előbbieken már részletezett (1) és (2) eluáló rendszert használtuk. A rendszert alkotó minden egyes eluenskeverékkel 5, egyenként 25 ml-es frakciót szedtünk. Az így nyert frakciókat többszörös reciklizációval tisztítottuk tovább.

Az RPC szeparálás során nyert két frakciót fordított fázisú HPLC segítségével tisztítottuk tovább, percenként szedve a frakciókat.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

A növényi nyersanyagunk feldolgozásában az első lépés a kivonás volt, amelyre leginkább alkalmas oldószer a metanol az ekdiszteroidok és a rokon vegyületek középpoláris tulajdonsága miatt. A metanollal egyéb zavaró anyagokat is kivonódnak a

növényből, ezért van szükség az előtisztításra. A metanolos-vizes kivonatot hexánnal történő kirázás segítségével megtisztítottuk az apoláris szennyező anyagoktól (pl. klorofill). Ezután következett a metanolos kivonat frakcionált kicsapása növekvő arányú acetonnal, ezzel a poláris anyagokat, pl. cukrokat, fehérjéket távolítottuk el.

Mivel a kivonat viszonylag nagymennyiségű flavonoidot tartalmazott, a poliamid oszlopkromatográfia segítségével csoportelválasztást végeztünk az alkoholos, illetve fenolos hidroxil csoportokat tartalmazó vegyületek elkülönítésére. Ez az állófázis jóval nagyobb affinitással köti a fenolos hidroxil csoportokkal rendelkező anyagokat (pl. flavonoidokat), mint az alkoholos OH-csoportokkal rendelkezőket (ekdiszteroidok, szterolok stb.)

A normál és a reverz fázisú oszlopkromatográfia egymás utáni használatával jelentős szelektivitásbeli váltást értünk el: az előbbi módszer adszorpción alapszik, a fordított fázisnál, pedig a hidrofób kölcsönhatások a döntők, és az irreverzibilis adszorpció mértéke elhanyagolható, mivel a szilanol csoportok csaknem teljesen mértékben fedettek. Ez utóbbi állófázis regenerálhatósága miatt gazdaságosan újra felhasználható.

Az RPC módszer használata növelte a tisztítási és elválasztási folyamatok hatékonyságát, mivel a centrifugális erő hatására az elválasztás gyorsabb és jobb lesz, továbbá a vizsgált komponensek rövidebb ideig érintkeznek a réteggel, mint a TLC esetében, így az anyagok bomlásának veszélye kisebb.

Az ezt követő fordított fázisú HPLC használata újabb szelektivitásbeli váltást jelentett. Az UV elnyeléssel nem rendelkező szterolok HPLC elválasztásánál az UV detektálást nem lehet alkalmazni. Így percenként gyűjtöttük a frakciókat és az elválasztást TLC-vel ellenőriztük, kihasználva a módszer egyik előnyét, hogy a kifejlesztett kromatogram előhívható, még savat tartalmazó, drasztikus előhívó reagenssekkel is. A szterolok detektálását a TLC-nél vanilin-kénsav reagenssel végeztük. Ezen a módon két tiszta anyagot sikerült nyernünk. Az anyagok szerkezetvizsgálatáról a későbbiekben számolunk be.

Az izolált anyagok ekdiszteroidokhoz és más szterolokhoz hasonló kromatográfiás viselkedése (színreakció, polaritás) arra utal, hogy ezekhez közelálló vegyületekről van szó. Mindez a vegyületek többszörös hidroxilezettségét, vagy a szterolvázhoz cukor kapcsolódását valószínűsíti. Kettős kötéssel konjugált csoportot, ill. konjugált kettős kötésű rendszert nem tartalmaznak.

Vizsgálataink és a hozzáférhető szakirodalom alapján valószínűnek tartjuk, hogy izolált anyagaink nem szokványos, többszörösen hidroxilezett szterolok. Emellett először sikerült kimutatnunk a növényből az élővilágban legelterjedtebb ekdiszteroidot, a 20-hidroxiekdizont, s ez a tény felveti annak lehetőségét, hogy egyéb ekdiszteroid komponensek is találhatóak benne, mivel ezek az anyagok komplex keverékek formájában fordulnak elő a növényekben.

Betulin és betulinsav előfordulásának vizsgálata *Alnus glutinosa*, *Betula pendula* és *Platanus hybrida* fajokban

Gáva A.^{1,2,*}, Simándi B.³, Szarka Sz.¹, Kursinszki L.¹, Csedő K.⁴, Plander Sz.³, Szőke É.¹, Kéry Á.¹

¹Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognózia Intézet:
1085 Budapest, Üllői u. 26.

²Richter Gedeon Nyrt; Budapest

³Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki Kar

⁴Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Marosvásárhely

* Kapcsolattartó szerző

Tel.: 36-1-431-4683; e-mail: ganiko@mailbox.hu

Among the biologically active pentacyclic triterpenes, betulin and betulinic acid exhibit a high anti-inflammatory, antiviral and antitumor effect. The activity of betulin against HSV-1 and HSV-2 viruses as well as concentration dependent synergistic or antagonistic antiviral effect between betulin and acyclovir were confirmed. Betulinic acid combined with vincristine induce apoptosis in melanoma cells, furthermore its anti-HIV and antiviral activity is also well known. The betulin content of Betulae cortex was described, although quantitative results have not been published. The aim of our work was to reveal further sources of betulin and betulinic acid, to gain experiences concerning their accumulation and the optimal phytotechnology. We examined the betulin, betulinic acid and β -sitosterol content in the bark of Betula pendula Roth, Alnus glutinosa (L.) Gaertn. and Platanus hybrida Brot. by TLC, GC, VRK, GC and GC-MS methods. We found that betulin presents as main component in Betulae- and Platani cortex samples. Alni cortex contains other triterpenes also in considerable amount beyond betulin. Betulinic acid occurred as minor component in all samples, while there was no significant difference in β -sitosterol content.

Keywords: betulin, betulinic acid, β -sitosterol, further sources, GC-MS, HPLC

BEVEZETÉS

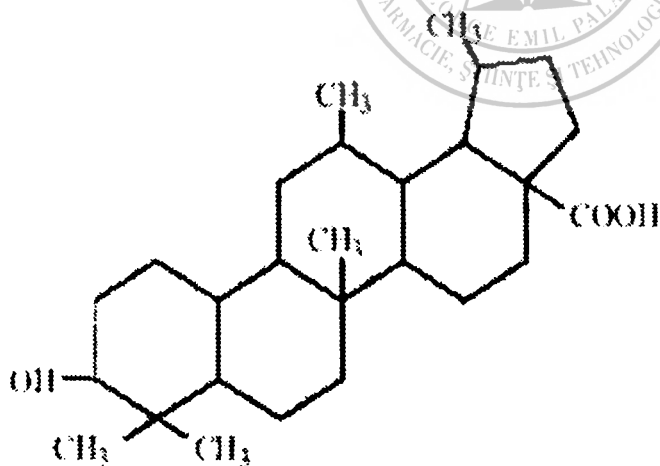
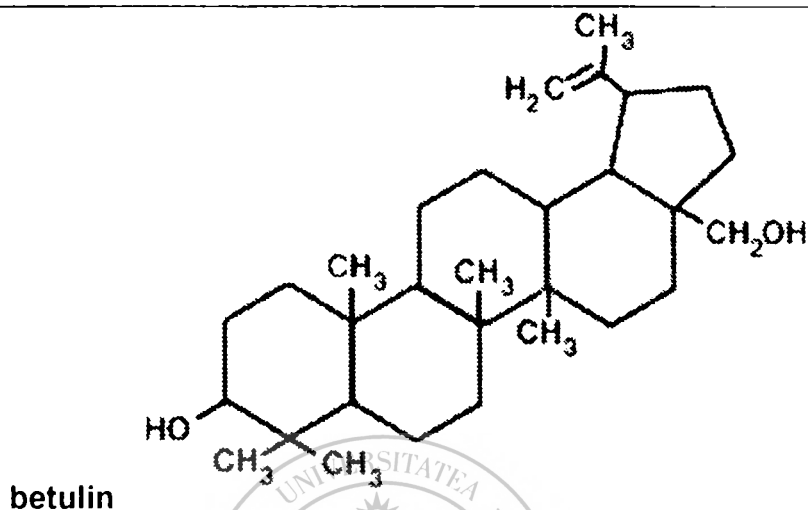
A biológiailag aktív pentaciklikus triterpének közül a betulin és betulinsav jelentős gyulladásgátló, antivirális illetve daganatellenes hatású. Mindkét vegyület HSV-1 és HSV-2 vírus elleni aktivitását igazolták [Yunhao Gong, Karim M. Raj, Carolyn A. et al]. A betulin aciklovirral koncentrációtól függően szinergista vagy additív hatást fejt ki, emellett antioxidáns, májvédő, valamint antibakteriális tulajdonságait is leírták.

A betulinsav vincristinnel együtt adva szinergista hatásának bizonyult, a melanoma sejtekben apoptozist indukál [N Sawada, K Kataoka, K Kondo et al]. Mivel citotoxikus hatása specifikus a daganatsejtekre, és a terápiás indexe is kedvező, emiatt nagyon ígéretes vegyületnek tekinthető többek között az AIDS és a rosszindulatú daganatos betegségek terápiájában [Rama Mukherjee, Manu Jaggi, Praven Rajendran et al].

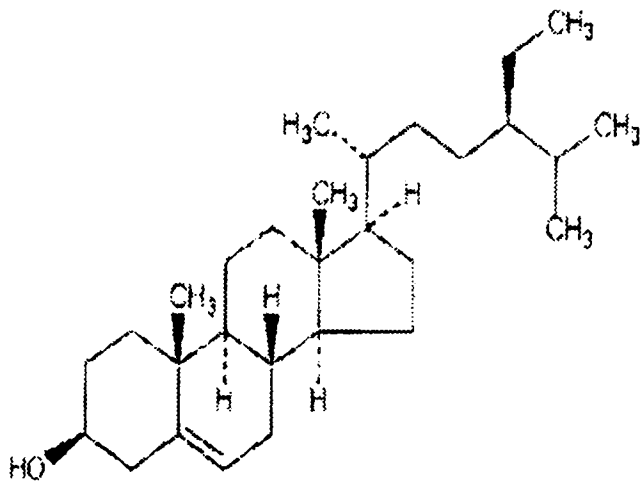
A *Betulae cortex* betulin tartalma a szakirodalomból jól ismert. Munkánk célja a betulin és betulinsav újabb forrásainak feltárása, felhalmozódásuk sajátosságainak alaposabb megismerése és az optimális fitotechnológiára vonatkozó adatgyűjtés volt.

ANYAGOK, MÓDSZEREK

TLC, CC, HPLC, GC és GC-MS módszerekkel vizsgáltuk a *Betula pendula* Roth, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. és *Platanus hybrida* Brot. szárított kéreg és levél drogok betulin, betulinsav és β -szitoszterol tartalmát.



betulinsav



β -szitoszterol

Méréseink során hagyományos Soxhlet extrakcióval valamint szuperkritikus fluid extrakcióval előállított drogvonatokot használtunk.

Kivonatok előállítása Soxhlet extrakcióval:

Pontosan mért, 3,0 g tömegű porított drogot 6 órán át 60 °C-on 100 ml hexánnal extraháltunk. A hexános kivonatokot tovább extraháltuk 100 ml metanollal 90 °C-on.

A kálium-hidroxidos elszappanosítást (Ph.Hg.VIII.), majd petroléteres kirázást követően semlegesre mosott és bepárolt mintákat az összkivonatokkal együtt vékonyréteg-kromatográfiásan ellenőriztük betulin, betulinsav és β -szitoszterol standardok alkalmazása mellett.

Kivonatok előállítása szuperkritikus fluid extrakcióval

A kivonást 5 l térfogatú extrakciós tartályhoz kapcsolt nagynyomású készülékkel végeztük 350 bar nyomáson és 40 °C hőmérsékleten. Oldószerként szuperkritikus CO₂-ot, kószolvensként alkoholt alkalmaztunk. Pontosan mért, 1000,0 g tömegű drogot extraháltunk, melynek teljes mennyiségét visszanyertük.

A szuperkritikus fluid extrakcióval előállított kivonatokból 96%-os etanollal készített oldatokat használtunk fel a további vizsgálatok céljából.

Vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatok körülményei:

Réteglap: Kieselgel 60 F254

Eluens: hexán-etil-acetát (3:1)

Vizsgálati oldat: égerfa, nyírfa, kéreg és levél valamint platán kéreg kivonatok

Osszehasonlító oldat: betulin, betulinsav, β -szitoszterol standard

Reagens: kénsavas CeSO₄

Előhívás: szárítószekrényben 120 °C-on 10 percig szárítva, értékelés látható fényben

GC-GC/MS analízis:

Az analízishez elszappanosított mintákat használtunk, kiküszöbölve ezzel a zsírsavak mérést zavaró hatását. A mintákból kb. 0,5 mg/ml koncentrációjú kloroformos oldatokat készítettünk. Belső standardként 5- α -cholestan-3-on-t alkalmaztunk.

A gázkromatográf készülék típusa Agilent 6890N. DB-5MS kolonna FID (lángionizációs) detektorral kapcsolva.

Kolonna: 25 m x 200 μ m I. D x 0,33 μ m filmvastagság.

Vivőgázként kromatográfiás tisztaságú héliumot alkalmaztunk 1,0 ml/perc áramlási sebességgel.

Fűtési program: 120 °C-ról (1p.) 10 °C/perc fűtési sebességgel 300 °C-ra (14p.), majd 10 °C/perc fűtési sebességgel 310 °C-ra (10p.).

A készülékbe 1,0 μ l térfogatú mintát injektáltunk 0,7 mg/ml sebességgel, splitless üzemmódban. Az injektor hőmérséklete 280 °C, a detektoré 330 °C volt. Az azonosítás retenciós idő és standard addíció alapján történt.

A tömegspektrometriás méréseket Agilent 6890N típusú készüléken végeztük, 30 m x 250 μ m I.D. x 0,25 μ m, HP-5MS típusú kolonna alkalmazásával.

Vivőgázként kromatográfiás tisztaságú héliumot alkalmaztunk 1,0 ml/perc áramlási sebességgel.

Fűtési program: 140 °C-ról (1p.) 10 °C/perc fűtési sebességgel 270 °C-ra (20p.), majd 10 °C/perc 300 °C-ra (6p.).

A készülékbe 1,0 μ l térfogatú mintát injektáltunk 0,7 mg/ml sebességgel, splitless üzemmódban. Az injektor hőmérséklete 280 °C, a detektoré 330 °C volt. Detektálásra 5973N típusú tömegszelektív, elektron impakt üzemmódú (70eV) detektort alkalmaztunk. Az azonosítás retenciós idő és tömegspektrum alapján történt.

HPLC analízis:

Vizsgálati mintáinkban a betulin és betulinsav előfordulását HPLC-s módszerrel is igazoltuk.

A kromatográfiás készülék típusa Surveyor HPLC rendszer, kvaterner gradiens pumpa integrált gázmentesítővel, automata mintaadagolóval.

Oszlop: Eurospher 5 μ m, C18, 250 x 3,0 mm I.D., Knauer, Németország.

Mozgó fázisként acetonitril – víz 22:78 v/v arányú elegyét alkalmaztuk.

Az áramlási sebesség 1,0 ml/min volt, a detektálás 205 nm hullámhosszon, diódasoros detektorral történt. A kromatogramok kiértékelését Chromquest 4.0 szoftverrel végeztük el.

VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK

Vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel összehasonlítottuk az égerfa (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) és a nyírfa (*Betula pendula* Roth) kéreg és levél valamint a platán kéreg (*Platanus hybrida* Brot.) kivonatait elszappanosítás előtt és után. A bepárolt kivonatokat alkalmas oldószerben (CHCl₃) visszaoldva vittük fel a rétegre, betulin, betulinsav és β -szitoszterol standardok mellett.

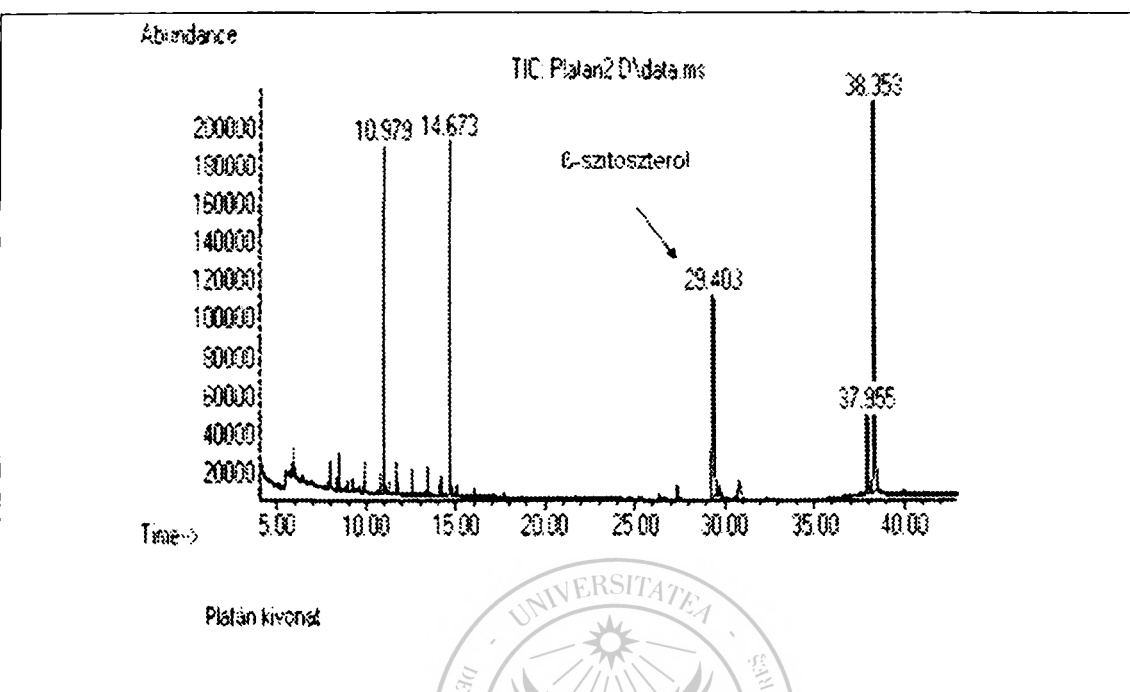
A β -szitoszterol minden mintában azonosítható volt ($R_f=0,43$), a betulin jellemzően a kéreg mintákban fordult elő ($R_f=0,28$). A levéldrogokban a β -szitoszterol jelenléte igazolható VRK módszerrel.

GC-GC/MS

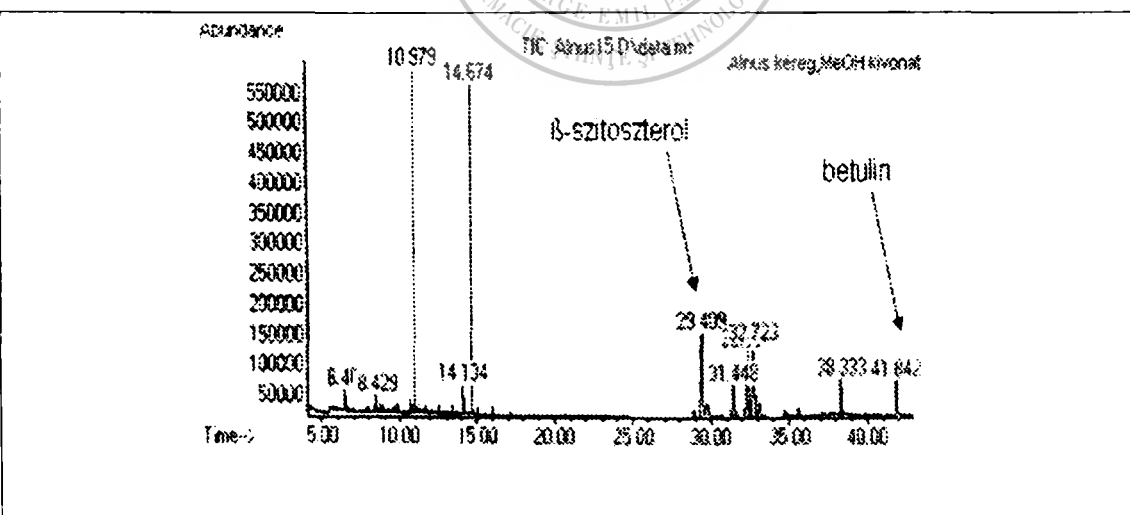
Az *Alnus glutinosa* valamint a *Platanus hybrida* kéreg kivonatait elszappanosítást követően gázkromatográfiával és GC-vél kapcsolt tömegspektrometriás módszerrel analizáltuk betulin és β -szitoszterol standardok egyidejű vizsgálatával.

A betulint a vizsgált kéregminták mindegyikében azonosítottuk. Példaként a *Platanus* és *Alnus* kéreg minta gázkromatogramját, az *Alnus* kéreg 41,842 retenciós idejű

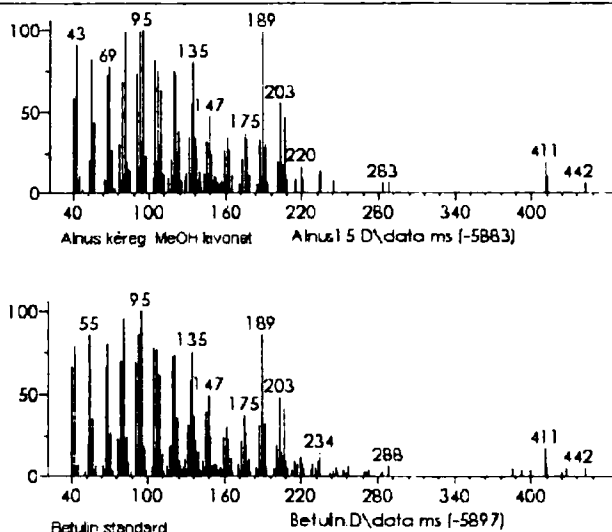
komponensének tömegspektrumát, valamint a betulin testanyag tömegspektrumát mutatjuk be (1.,2.,3. ábra).



1. ábra: A *Platani cortex* kivonat gázkromatogramja

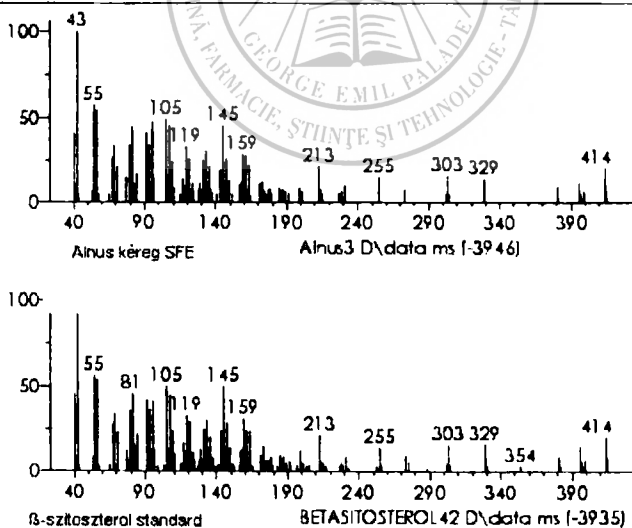


2. ábra *Alni cortex* kivonat gázkromatogramja



3. ábra Az *Alni cortex* (metanolos kivonat, el nem szappanosítható rész) betulin komponensének illetve a betulin standard tömegspektruma

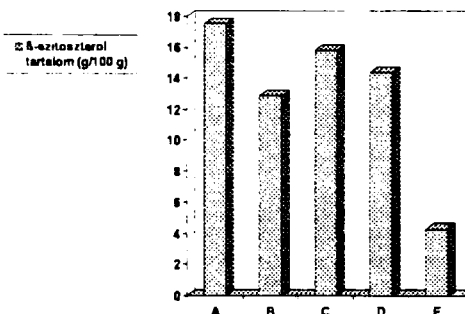
A β -szitoszterol jelenlétét valamennyi kéreg és levélmintában igazoltuk. Példaként az *Alnus*- és *Platanus* kéreg gázkromatogramját, az *Alnus* kéreg 29,403 retenciós idejű komponensének tömegspektrumát, valamint a β -szitoszterol tesztanyag tömegspektrumát mutatjuk be (1., 2., 4. ábra).



4. ábra Az *Alni cortex* SFE kivonat β -szitoszterol komponensének illetve a β -szitoszterol standard tömegspektruma

Kvantitatíve meghatároztuk az *Alnus*- kéreg és levélminták β -szitoszterol tartalmát. Mind a szuperkritikus, mind pedig a Soxhlet készülékkel előállított *Alni* cortex kivonatokban a β -szitoszterol jelentősen feldúsult. Az *Alni* folium kivonatok β -szitoszterol tartalma a kéreghez képest alacsonyabb, de nem elhanyagolható. Mérési eredményeinket táblázatban, illetve grafikonon összegezzük (5. ábra).

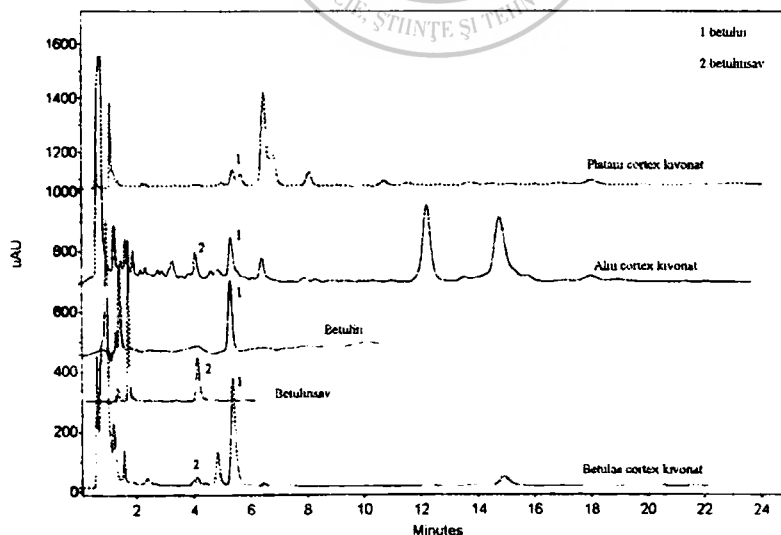
<i>Alni</i> glutinosae cortex	β -szitoszterol tartalom (g/100 g)
A: szuperkritikus kivonat, oldószer CO_2	17,53
B: szuperkritikus kivonat, oldószer CO_2 + alkohol	12,88
C: hexános kivonat	15,8
D: metanolos kivonat	14,37
<i>Alni</i> glutinosae folium	
E: metanolos kivonat	4,28



5. ábra: *Alni* cortex és *Alni folium* minták β -szitoszterol tartalma

HPLC

Minden vizsgált kéregdrogban standard minta alkalmazásával igazoltuk az 5,9 retenciós idővel jellemezhető betulint. Az *Alnus* kéreg kivonata összetett, jellemzően nagyobb mennyiségben tartalmaz betulinsavat (retenciós idő 4,2 amely megegyezik a standard minta retenciós idejével), mint a *Betula* és *Platanus* kéreg (6. ábra).



6. ábra Betulin, betulinsav és a vizsgált kéreg drogok HPLC kromatogramja

Összefoglalás

A biológiai aktivitása miatt érdeklődés előterébe került betulint az ismert alapanyag, *Betulae cortex* mellett *Alni cortex* és *Platan cortex* mintákban azonosítottuk VRK, GC, GC/MS és HPLC módszerekkel autentikus teszt minták felhasználásával.

A *Betulae cortex*-ben és *Platan cortex*-ben minor komponensként előforduló betulinsavat jelentős tartalomanyagként igazoltuk *Alni cortex* mintában. A β -szitoszterol mind a kéreg, mind a levélminták jellemző komponense. A β -szitoszterol kvantitatív előfordulása nem mutat jelentős különbséget. A szuperkritikus extraktumokban a vizsgált komponensek jelentősen feldúsulnak.

Köszönetnyilvánítás:

A munka a GVOP-3.1.1.-2004-05-0397/3.0 támogatásával készült.

Irodalomjegyzék:

1. N. SAWADA, K. KATAOKA, K. KONDO et al - *Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice*- British Journal of Cancer 2004, 90:1672-1678
2. RAMA MUKHERJEE, MANU JAGGI, PRAVEN RAJENDRAN et al - *Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents*-Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2004, 14: 2181-218
3. YUNHAO GONG, KARIM M. RAJ, CAROLYN A. LUSCOMBE et al - *The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses*- Antiviral Research, November 2004, 64, 2: 127-130



The Alkaloids and Polyacetylenes in Hairy Root Cultures of *Lobelia inflata* L.

Éva Szőke¹, István Bálványos¹, Anna Krajewska², László Kursinszki¹, Ákos Máthé³

¹ Department of Pharmacognosy, Semmelweis University, Üllői str. 26, H-1085 Budapest, Hungary

² Research Institute of Medicinal Plants, Libelta str. 27, 61707 Poznan, Poland

³ Department of Botany, West Hungarian University, Vár 2., H-9200 Mosonmagyaróvár Hungary

Corresponding author: Éva Szőke, Department of Pharmacognosy, Semmelweis University, Üllői str. 26, H-1085 Budapest, Hungary

Lobelia inflata L. contains pharmacologically important secondary metabolites. More than 20 piperidine alkaloids were detected in the herb. The main piperidine alkaloid is lobeline which has a stimulatory effect on the respiratory centre. Lobeline is also used in anti-smoking preparations. Recent studies have shown that lobeline analogues have good potential effective treatments also for psychostimulant abuse. Pharmaceutical importance of *Lobelia* would be improved by the polyacetylenes (lobetyol, lobetyolin, lobetyolinin). With the aim of increasing the secondary metabolite production genetically transformed cultures were produced

Hairy roots were obtained by direct infection of the sterile plants with *Agrobacterium rhizogenes* strain R1601. About 62 hairy root clones were isolated and cultivated on solid and liquid media (MS, B5). Cefotaxime and ampicillin were added to the medium for several subcultures to eliminate the bacteria. The cultures grew intensively and had good biosynthetic ability.

Hairy roots were cultivated in a cylindrical, 10 L bubble column bioreactor. A cylindrical nylon net was placed in the middle of the reactor. The sterile air was laid on through the bottom of the bioreactor.

Lyophilised and powdered hairy roots were extracted with 0.1 N HCl:methanol (1:1, v/v) using a Labsonic U ultrasound device (Braun). Aliquots of this extract were used directly for polyacetylen analysis. For alkaloid analysis, aliquotes of the crude extract were purified by solide phase extraction on C18 microcolumn.

Analysis of alkaloids and polyacetylenes was performed by HPLC. Analysis was performed on a Surveyor (Thermo Finnigen, San Jose, CA, USA) HPLC system consisting of a quaternary gradient pump, a PDA detector and an autosampler. The compounds were identified by the addition of authentic standards and by diode-array detection. Quantitative determination was performed by external standard method.

HPLC analysis of lobeline

Compounds were separated on an Eurospher 100-C8 (5 µm) reversed-phase Vertex column (250 x 3 mm i.d.), using 30:70 (v/v) acetonitrile:0.1% trifluoroacetic acid as a mobile phase at a flow-rate of 1 mL/min. The lobeline peak was identified by standard addition and diode-array detection.

HPLC analysis of polyacetylenes

The analytical column was Hypersil MOS-2 (250 x 4.6 mm i.d.). Acetonitrile: water (23.1: 76.9; v/v) was used as a mobile phase (flow rate 1 mL/min). Lobetyolin and lobetyolinin peaks

were identified by addition of authentic standards and diode-array detection. Quantitative determination of polyacetylenes was performed by external standard method at 270 nm.

The polyacetylene content of hairy root clones was prominent and the total alkaloid content of the cultures was similar to the intact plant (but the lobelin content in the hairy roots was less than in the intact plants). With the aim of increasing of secondary metabolite production of hairy roots, their cultural conditions were optimized (macroelements, sucrose, hormones, precursor amino acids: Lys, Phe). Prominently high quantities of polyacetylenes (131mg/g lobetyolin, 24 mg/g lobetyolinin) were detected in the hairy roots cultivated in liquide B5 medium containing 1% sucrose.

The hairy roots were cultivated also in bioreactor (264 mg/cult. lobetyolin and 59 mg/cult. lobetyolinin production was obtained).

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by GVOP 3.1.1-2004-05-0309/3.0.

LITERATURE

1. BÁLVÁNYOS, I., KURSINSZKI, L. AND SZÖKE, É. - *The effect of growth regulators on the biomass formation and lobeline production of Lobelia inflata L. hairy root cultures.* Plant Growth Regulation, 2000, 34: 339-345.
2. GAMBORG, O.K., MILLER, R.A. AND OJIMA, K. - *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.* Exptl. Cell. Res., 1968, 50: 151-158
3. ISHIMARU, K., SADOSHIMA, S., NEERA, S., KOYAMA, K., TAKAHASHI, K. AND SHIMOMURA, K. - *A polyacetylene gentiobioside from hairy roots of Lobelia inflata.* Phytochemistry, 1992, 31: 1577-1579.
4. ISHIMARU, K., YONEMITSU, H. AND SHIMOMURA, K. - *Lobetyolin and lobetyol from hairy root culture of Lobelia inflata.* Phytochemistry, 1991, 30:2255-2257.
5. MURASHIGE T. AND SKOOG F. - *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.* Physiol Plant., 1962, 15:473-497.
6. SZÖKE, É. - *In vitro culture and the production of lobeline and other related secondary metabolites.* 1994, p.289-327. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 28, Medicinal and Aromatic Plants VII. Springer, Berlin, Heidelberg
7. YONEMITSU, H., SHIMOMURA, K., SATAKE, M. et al - *Lobeline production by hairy root culture of Lobelia inflata L.* Plant Cell Rep., 1990, 9:307-310.

Index alfabetic

ALBERTI Á.	196
ANGELOW L	15
ANKE M	15,
ANTAL D	170, 215
ARNHOLD W	15
BÁLAN J	84
BÁLVÁNYOS I.....	269
BÁTHORI M	62, 182, 203, 244, 258
BODÓ E	84
BORCSA B	46
BRÂNZANIUC K	160
CÎNTĂ-PÎNZARU S	170
CODREANU M-V	133
CSEDŐ C	46, 147, 154, 160, 196, 220, 258, 261
CSUPOR D	46
CSUPOR-LÖFFLER BOGLÁRKA ..	181
DEHELEAN C	170, 215
DINU M	133, 141
DONÁTH-NAGY G	84, 252
DUŞA S	84
DUȚU LE	79, 171, 175
ECHIM I	160
FALKAY GY	181
FERENCZ L	84
FORGÓ P.....	46
GÁVA A	261
GÁLEA C	147, 154
GÎRD CE	79, 171, 175
GOLEA C	224
HAJDŰ ZSUZSANNA	181
HEVESI TÓTH B	196
HOHMANN J	46, 181, 236
HUNYADI A	182
ILCUȘ R	224
IONESCU-TÂRGOVIȘTE C	79
ISTUDOR V	79
JANICSÁK G	189

KAKASY A. Z	189
KÁTAY G	51
KAYCSA A	215
KÉRY Á	196, 261,
KIRÁLY-VÉGHÉLY Zs	51
KRAJEWSKA A	269
KURSINSZKI L	261, 269
LIKTOR-BUSA E	203
MARKUS M	220
MÁTHÉ Á	269
MÁTHÉ I	1, 46, 62, 147, 181, 189,
	203, 236, 244, 258
MIKLÓSSY VÁRY V	244
MOLNÁR A	46
MÓRICZ M Á	51
MÜLLER R	15
NEGREŞ S	133
NEMETH S	209
NEMETH T	209
OLARIU M	165
OROIAN S	97
OŞAN A	165
OTT P. G	51
PAVEL M	79, 129, 175
PEEV C	170, 215
PÎRVU L	79
PLANDER SZ	261
POLGÁR L	182
POP C	237
POP I	165
POPA R	224
POPESCU H	209
POPESCU ML	79, 141
REBEGEA O	133
RÉDEI D	236
RÉTHY B	181
RUSU M	220
SABÁU M	224
SCHÄFER U	15

SIMÁNDI B	261
SIMON A	182, 203, 244
ȘOICA C	170
SULYOK E	236
SZABÓ J	252
SZAKÁCS J.	84
SZARKA SZ.....	261
SZÁVA J	84
SZENDREI K	75
SZŐKE É.....	196, 261, 269
TÁMAȘ M	224, 237
ȚARĂLUNGĂ GH.	79
TARCEA M	224
TATU C.A	170
TÓTH G	182, 203, 244
TÓTH K	84
TÓTH N	182, 244
TÓKÉS B	84
TUDOR I	141
TYIHÁK E	51
VANCEA SZ	252
VÁNYOLÓS A	258
VARGA E	252
VERES K	147, 189
VINTILĂ A	84
VLASE L	154, 209, 237
VOICU M	129
VUKICS V	196
ZUPKÓ I	181

