

PROBLEME DE FARMACIE

STUDIUL CROMATOGRAFIC PE STRAT SUBȚIRE ȘI SPECTROFOTOMETRIC AL EXTRACTELOR DE RĂDĂCINI ȘI FRUNZE ALE SPECIILOR DE STACHYS

Silvia Dușa, Olga Stana, Isabella Foris, C. Csedő*

Disciplina de chimie analitică

*Disciplina de farmacognozie

Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș

Speciile *Stachys* au fost utilizate încă din antichitate, de vechii greci, egipteni și în Roma Antică.

Plantele sunt utilizate ca atare, ca ceai și ca distilat.

În Franța și în Mexic este oficială ca *Herba betonica*.

În țara noastră este utilizată în medicina populară sub diferite denumiri ca: vindecuța, buruiana de tăietură, iarba bubii, iarbă de rană, iarba tâlharului etc.

În prezenta lucrare sunt prezentate câteva rezultate practice privind conținutul în flavone și polifenoli de tip acid cafeic al speciilor de *Stachys*, și anume *Stachys lanata*, *Stachys officinalis*, *Stachys grandiflora* și *Stachys germanica*.

Plantele au fost recolate din grădina de plante medicinale din Târgu-Mureș.

Material și metodă

Ca material de studiu s-au folosit rădăcinile și frunzele speciilor de *Stachys* enumerate mai sus. Recoltarea plantelor a fost făcută spre sfârșitul perioadei de vegetație pentru rădăcini și diferite perioade ale anului pentru frunze.

Extragerea principiilor active s-a făcut conform F.R.X. (5).

Cromatogramele pe strat subțire s-au obținut pe plăci silicagel 60F-254 Merck, dezvoltantul utilizat fiind CHCl_3 : CH_3COOH 98%: H_2O în proporție de 50:42:8.

Probele au fost aplicate cu micropipete.

Substanțele etalon folosite au fost acidul cafeic, hiperozida, scopoletina, pirogarolul.

Determinarea cantitativă a o-dihidroxifenolilor s-a realizat prin spectrofotometrie în vizibil, folosind ca etalon acidul cafeic cu reactivul Arnou (4) la $\lambda = 500$ nm, și în UV la $\lambda = 290$ nm.

Determinarea spectrofotometrică a flavonoidelor s-a realizat prin spectrofotometrie în vizibil, cu $AlCl_3$ în prezență de acetat de sodiu, la $\lambda = 430$ nm.

Spectrele au fost înregistrate cu un Specord UV-Vis.

Rezultate și discuții

Separările cromatografice (fig.nr.1 și 2) indică prezența unui număr mare de componenți, atât pe cromatogramele identificate în vizibil cât și în UV, mai ales în cadrul speciei *Stachys lanata* (10) și *Stachys germanica* (8).

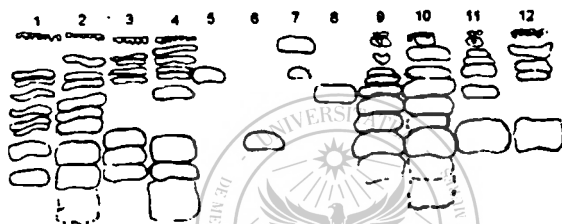


Fig.nr. 1: Cromatogramele extractelor alcoolice, identificare cu $FeCl_3$, soluție metanolică 1-2%. 1. *S. lanata* frunză; 2. *S. lanata* rădăcină; 3. *S. officinalis* frunză; 4. *S. officinalis* rădăcină; 5. Acid cafeic; 6. Hiperozida; 7. Scopoletin; 8. Pirogaroi; 9. *S. germanica* frunză; 10. *S. germanica* rădăcină; 11. *S. grandiflora* frunză; 12. *S. grandiflora* rădăcină.

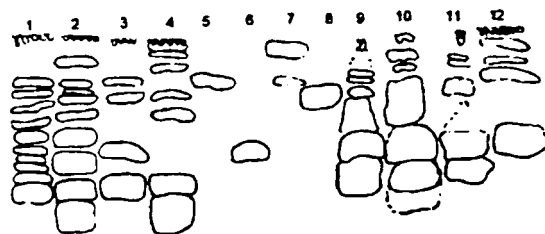


Fig.nr. 2: Cromatogramele extractelor alcoolice, identificare în UV $\lambda = 365$ nm. 1. *S. lanata* frunză; 2. *S. lanata* rădăcină; 3. *S. officinalis* frunză; 4. *S. officinalis* rădăcină; 5. Acid cafeic; 6. Hiperozida; 7. Scopoletin; 8. Pirogarol; 9. *S. germanica* frunză; 10. *S. germanica* rădăcină; 11. *S. grandiflora* frunză; 12. *S. grandiflora* rădăcină.

Ca substanțe de referință s-au folosit: acidul cafeic ($R_f = 0.80$), hiperozida (0.48), scopoletina (0.92), pirogarol (0.73). După R_f culoarea spoturilor și fluorescență s-a identificat prezența acidului cafeic (polifenoli de tip acid cafeic) în rădăcinile de *S.lanata* și *S.grandiflora*, iar hiperozida la toate speciile studiate.

Stabilirea conținutului în polifenoli precum și în flavonoide s-a realizat prin metoda spectrofotometrică în vizibil și UV. Curbele de absorbție înregistrate la $\lambda = 500$ nm pentru acidul cafeic sunt redată în fig nr.3.

Din extincțiile obținute s-a construit curba de etalonare $E = f(c)$. Prin calcule de corelație s-a stabilit ecuația liniei de regresie:

$$c_{mg/ml} = 0.464 E - 0.0328 \quad (1)$$

$$n = 8 \quad r = 0.996 \quad S_0 = 0.0097$$

în care c reprezintă numărul de miligrame de acid cafeic în volumul probei măsurate, iar E extincția.

Din datele experimentale rezultă că legea Lambert-Beer se respectă în intervalul de concentrații 0.075-0.4 mg/ml. Efectuând dozarea o-dihidroxifenolilor din extractele obținute prin aceeași metodă se obțin curbele de absorbție redată în fig.nr.4.

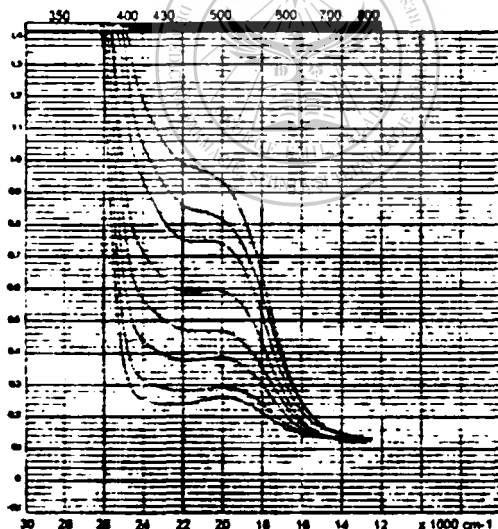


Fig.nr.3: Curbele de absorbție ale acidului cafeic între 0.10 și 0.45 mg/ml.

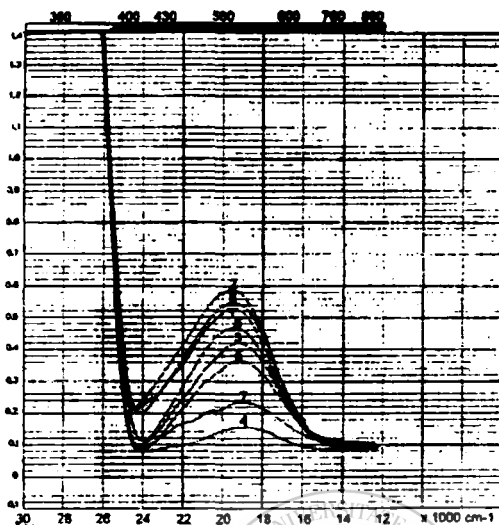


Fig.nr. 4: Curbele de absorbție ale polifenolilor de tip acid cafeic din speciile de *Stachis* (pentru repere, vezi tabelul nr. 1).

Extincțiile citite pe curbe, introduse în ecuația (1) permit calcularea directă a concentrațiilor de polifenoli din probele analizate. Aplicând corecțiile de diluție se poate exprima conținutul procentual în o-dihidroxifenoli; valorile obținute sunt redată în tabelul nr. 1.

Conținutul cel mai mare în o-dihidroxifenoli s-a înregistrat la *S. lanata*.

Dozarea spectrofotometrică în UV a o-dihidroxifenolilor de tip acid cafeic se poate realiza prin fotometrarea soluțiilor alcoolice la $\lambda = 290$ nm.

Curba etalon pentru acidul cafeic este redată în fig.nr.5, ecuația dreptei de regresie având expresia:

$$C_{mg/ml} = 0.254 E - 0.0156 \quad (2)$$

$$n = 6 \quad r = 0.970 \quad S_0 = 0.0309$$

indică o bună corelație între concentrație și extincție pe domeniul de concentrații 0.05-0.4 mg/ml

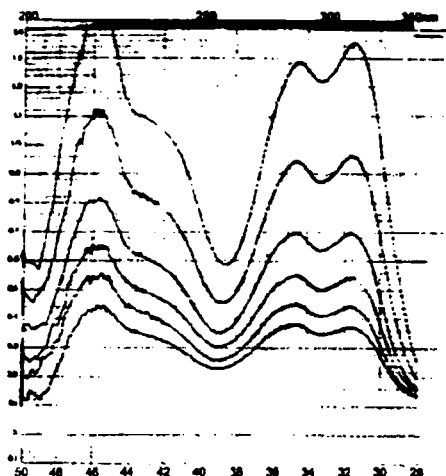


Fig.nr.5: Curbele de absorbție în UV ale acidului cafeic între 0.10 și 0.35 mg/ml.

Curbele de absorbție pentru extractele alcoolice din frunzele și rădăcinile speciilor studiate sunt redată în fig.nr.6.

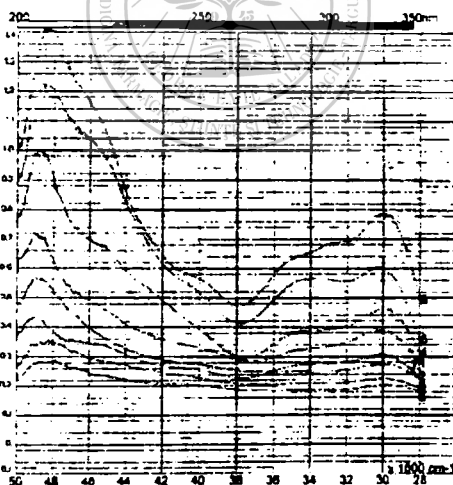


Fig.nr.6: Curbele de absorbție în UV ale extractelor alcoolice ale speciilor de Stachys (pentru repere vezi tabelul nr.1).

Conținutul procentual în polifenoli (tabelul nr.1) indică valori diferite de cele obținute prin spectrofotometria în vizibil, conținutul cel mai mare fiind în rădăcinile de *S. grandiflora* (4.13%), *S. germanica* (4.60%).

Determinarea spectrofotometrică a flavonoidelor s-a realizat în vizibil cu $AlCl_3$ în prezență de acetat de sodiu (1, 3, 5). Ca substanță etalon s-a folosit rutozidul. Curba de absorbție pentru rutozid este redată în fig.nr.7, iar pentru extractele alcoolice din speciile studiate este redată în fig.nr.8.

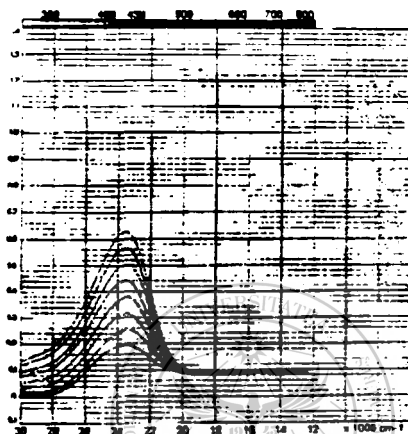


Fig.nr.7: Curbele de absorbție ale rutozidului între 0.10 și 0.45 mg/ml.

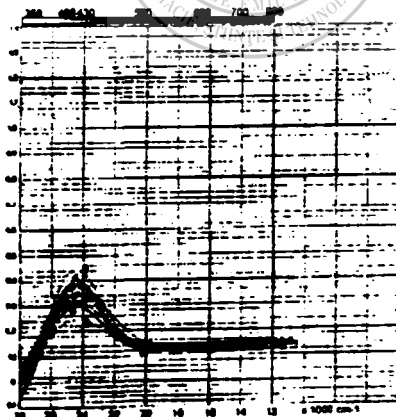


Fig.nr.8 Curbele de absorbție ale flavonoidelor din speciile de *Stachys* (pentru repere vezi tabelul nr.1).

$$C_{mg/ml} = 0.833 E - 0.0660 \quad (3)$$

$$n = 8$$

$$r = 1.000$$

$$S_0 = 0.0096$$

Indică o dependență lineară între concentrație și extincție, legea Lambert-Beer fiind respectată. Fotometrarea s-a făcut la $\lambda = 430$ nm, față de o probă oarbă.

Conținutul de flavonoide este prezentat în tabelul nr.1. Cel mai mare conținut de flavonoide al speciilor studiate îl prezintă *S.lanata* și *S.officinalis* (3.34%), *S.grandiflora* frunze (3.23%), *S.germanica* rădăcini 3.76%).

Tabelul nr.1

Conținutul în o-dihidroxifenoli și flavonoide al extractelor

Specia	o-dihidroxifenoli Flavone			
	Spectrofotometrie	Vis	UV	Vis
1. <i>S.lanata</i>	frunze	3.30	2.50	3.03
2. <i>S.lanata</i>	rădăcini	3.00	1.60	3.13
3. <i>S.officinalis</i>	frunze	2.00	1.30	1.67
4. <i>S.officinalis</i>	rădăcini	0.94	3.40	3.34
5. <i>S.grandiflora</i>	frunze	2.10	1.10	3.24
6. <i>S.grandiflora</i>	rădăcini	2.30	4.13	2.40
7. <i>S.germanica</i>	frunze	0.93	1.97	2.40
8. <i>S.germanica</i>	rădăcini	2.70	4.60	3.76

Concluzii

Din studiul cromatografic și spectrofotometric al extractelor celor patru specii de *Stachys* se desprind următoarele:

1. Cromatografia pe strat subțire a indicat prezența unui număr mare de fracțiuni în fiecare specie. Cele mai multe fracțiuni s-au evidențiat în specia *S.lanata*.

2. Din fracțiunile separate s-au indicat cu certitudine polifenoli de tip acid cafeic și flavonoide de tip hiperosid.

3. Compoziția în polifenoli de tip acid cafeic și hiperosid este asemănătoare pentru toate speciile studiate.

4. Metoda spectrofotometrică în vizibil și UV pentru determinarea o-dihidroxifenolilor este adecvată și reproductibilă, permitând o evaluare cantitativă a conținutului în acești derivați din speciile analizate.

5. Dozarea spectrofotometrică în vizibil a extractelor alcoolice indică o deplasare a maximumului de absorbție de la 500 la 520 nm, presupunând o diferență de structură a compusului optic activ.

6. Determinarea spectrofotometrică a flavonoidelor s-a dovedit de asemenea reproductibilă, conținutul în flavonoide fiind între 1.67-3.76%.

7. Din punct de vedere fitochimic lucrarea contribuie la o mai bună evaluare a speciilor analizate.

8. Relațiile teoretice dintre concentrațiile în mg/ml și extincție redată de formulele (1), (2), (3) pot fi utilizate în calculul concentrației în alcoolii o-dihidroxifenolici și în flavonoide, dacă sunt respectate condițiile impuse de metodă (2).

Bibliografie

1. Ciulei I., Grigorescu E.M., Ursula Stănescu: *Plante medicinale. Fitochimie și fitoterapie*, vol I, Editura Medicală, București, 1993, 406;

2. Dușa Silvia, Cornea Olga, Eșeanu Sigrîd: Cercetări fitochimice ale speciei *Stachys lanata*. Analiza spectrofotometrică a acidului cafeic și a derivaților săi, Simpozionul de fitoterapie Tg.-Mureș, 27-28 ianuarie 1994, vol.rez. 32;

3. Lamasson J.L., Petitjean-Freyet C., Carnat A.: Teneur en principaux flavonoides des parties aériennes de *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. subsp. *ulmaria* et subsp. *denudata* (J. and C.Presl) Hayek. *Pharm. Acta Helv.* (1992), 67, 218-222;

4. Nichiforescu E.A., Cucu I.: Sur la dosage des o-dihydroxyphenols de type acide caféyque présents dans les feuilles d'Artichaut (*Cynara Scolymus* L.) *Ann. Pharm. Franc* 1965, 23, 419;

5. ***Farmacopeea Română, Ediția X, 1063.

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AND SPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF ROOT AND FOLIAGE EXTRACTS OF STACHYS

Silvia Dușa, Olga Stana, Isabella Foriș, C. Csedő

The paper presents the experimental results obtained in the TLC analysis of alcoholic extracts from the roots and the foliage of four *Stachys* species: *S. lanata*, *S. officinalis*, *S. grandiflora*, *S. germanica*.

The o-dihydroxy-phenol and flavonoid content is determined by visible and UV spectrophotometry. The greatest content is presented by *S. lanata*.

The research continues for obtaining more efficient separation and assaying methods.

Sosit la redacție: 2.06.1995