

CONTRIBUȚII LA STUDIUL UNOR PRINCIPII ACTIVI DIN SPECIILE DE LEUCOJUM, PRIN METODA ELECTROFORETICĂ

A. Gheorghiu, A. Constantinescu, E. Ionescu-Matiu

Cercetările făcute în ultimii ani în scopul lărgirii arsenalului terapeutic în domeniul afecțiunilor cardiace s-au extins și asupra plantelor medicinale din familia Amaryllidaceae și anume asupra speciilor din genurile *Galanthus* și *Leucojum*.

Astfel, s-au putut identifica în compoziția chimică a speciilor de *Galanthus* doi alcaloizi, pe care *Sokolov* (15) îi denumește leucină și leucocitină, *Boit* — facetină și licorină, iar *Proscurnina* și *Areșkina* (12) galantină și galantidină. Ultimul alcaloid menționat ar fi identic cu licorina. *Proscurnina* și *Jakovlea* (13) au izolat ulterior alcaloidul denumit galantamina pe care îl consideră un derivat al 1-etil-N-metilfenantrindei. *Bubeva—Ivanova* (2) constată prezența a doi alcaloizi: licorina și galantamina pe care o denumește nivalin.

În ceea ce privește acțiunea farmacodinamică a galantaminei, *Mașkovski* și *Kruglikova—Livova* (10) constată că acest alcaloid are proprietăți hipotensive, iar *Sank, Eidinova* și *Mitbrent* (17) atribuie aceluiași alcaloid o acțiune terapeutică valoroasă în tratamentul sechelelor poliomielitice. *Paskov* (11) subliniază acțiunea anticolinesterazică a acestui alcaloid cu o toxicitate de 20 ori mai redusă decât cea a eserinei și proserinei, având și o acțiune fiziologică asupra sistemului cardio-vascular, a sistemului nervos central etc.

Bubeva—Ivanova (2) constată identitatea galantaminei izolată din genul *Galanthus Woronowii* cu cea din *Leucojum vernum* L.

Ivanov și *Ivanova* (7) izolează două substanțe alcaloizice din *Leucojum*

aestivum, avind constante fizico-chimice identice și aceleași proprietăți farmacodinamice ca galantamina și licorina.

În comparație cu genul *Galanthus*, genul *Leucojum* este mai puțin studiat. În literatura de specialitate nu am întâlnit folosirea metodei electroforetice la separarea alcaloizilor din plantele menționate. De aceea ne-am propus să realizăm extragerea pe cale chimică, iar pe cale electroforetică separarea, punerea în evidență și identificarea alcaloizilor din speciile indigene de *Leucojum*, în scopul unei eventuale valorificări în terapeutică.

Pentru extragerea alcaloizilor din *Leucojum aestivum* L. și *Leucojum vernum* L. am procedat astfel: din părțile aeriene ale plantelor uscate s-au luat câte 100 g. După extragere în aparatul Soxhlet cu eter de petrol, pentru îndepărtarea substanțelor grase, s-a alcalinizat cu amoniac 10% și s-a uscat din nou. S-a adăugat oxid de magneziu materialului astfel pregătit, săpunându-l apoi extragerii în continuarea cu cloroform, timp de 48 de ore. După primele 24 de ore cloroformul utilizat pentru extragere, a fost reînnoit. Soluțiile cloroformice au fost reunite, iar soluția obținută distilată sub presiune scăzută pînă la un volum de cca 20 ml, trecută în pîlme de separație și luata de trei ori cu cca 50 ml soluție de acid formic 10%. Soluțiile acide au fost reunite, iar soluția obținută s-a concentrat sub presiune scăzută pînă la un volum de 20 ml. Această soluție filtrată a servit cercetărilor noastre de electroforeza, pentru separarea și punerea în evidență a alcaloizilor din speciile de *Leucojum aestivum* L. și *Leucojum vernum* L.

Pentru separarea electroforetică a alcaloizilor din soluția extractivă, am preferat utilizarea metodei electroforetice bidimensionale, care după cum se știe prezintă interes deosebit în separări de amestecuri complexe, realizîndu-se migrarea substanțelor după două direcții perpendiculare (3, 9).

Electroforeza bidimensională permite să se precizeze dacă este vorba de două substanțe diferite cu condiția ca substanțele de separat să posede mobilități diferite în cele două direcții de migrare.

Noi am utilizat ca suport de migrare hîrtia de filtru Whatman nr. 3 de formă patrata cu latura de 16 cm., împărțită în patru zone egale, după direcția a două perpendiculare. La intersecția acestor linii am depus substanța de cercetat într-un cerc cu diametrul de 4 mm. Pentru cele două examene electroforetice făcute după două direcții perpendiculare, am utilizat soluții de pH-uri diferite.

Astfel la prima migrare am folosit o soluție de acid formic cu un pH 2,5 care se poate îndepărta ușor prin evaporare. La migrarea făcută în direcția perpendiculară pe prima, am utilizat soluția tampon de borax cu un pH 8,6.

Rezultate bune am obținut folosind o tensiune de 18 V/cm o intensitate de 0,36 mA/cm și un timp de migrare electroforetică de 2 ore. După uscarea benzilor de hîrtie am efectuat dezvoltarea spoturilor de alcaloizi cu ajutorul reactivului Dragendorff modificat (R. Dragendorff 10 ml, acid acetic 20 ml, apă 100 ml), care a fost pulverizat lini pe electroforegrame. În mediu acid am obținut un singur spot de alcaloizi, avînd culoarea roșie-cărămizie, iar în mediul alcalin două spoturi net diferențiate la distanțele de 17 mm, și 31 mm, față de linia O (fig. 1). Menționăm că primul este fluorescent.

Controlul datelor electroforetice obținute prin metoda bidimensională s-a făcut utilizînd electroforeza verticală, tampon borax cu pH de 8,6 obținînd și de data aceasta două spoturi net separate, colorate de asemenea, în roșu-cărămiziu cu R. Dragendorff modificat (fig. nr. 2).

Pentru cercetarea naturii alcaloideice a spoturilor separate electroforetic din speciile de *Leucojum* ne-am propus utilizarea și a altor reacții generale de precipitare pentru alcaloizi, ca: R. Mayer, R. Sonnenschein, R. Bouchardat, R. Bertrand, precum și R. Pierotitic-glicerinat (6). Deoarece asemenea reacții necesită cantități mai mari de alcaloizi, am întrebunțat în continuarea cercetărilor noastre, metoda electroforetică preparativă, care ne-a permis obținerea unor cantități suficiente de substanțe pure.

După cum se știe, în principiu această metodă constă în aplicarea unui cîmp electric perpendicular față de migrea cromatografică a hîrtiei de filtru cu electrolit sub forma unui flux continuu de tampon, străbătînd hîrtia de sus în jos (1, 5, 8, 14, 16).

Această metodă se mai numește și electrocromatografie continuă, deoarece îmbină tehnica cromatografică cu cea electroforetică.

Am utilizat hîrtia de filtru Whatman nr. 3 de dimensiuni 20×22 cm, tăiată crenelat la partea inferioară și introdusă cu partea superioară într-o cuvă conținind soluție tampon de borax cu un pH de 8,6 folosită și la imbibarea hîrtiei. În fiola cu soluția de cercetat am introdus un fir de bumbac avînd cealaltă extremitate pe hîrtia de filtru, care era astel alimentată continuu cu soluție de analizat.

Tensiunea totală aplicată a fost 200 V, intensitatea totală 10 mA. Am colectat cele două fracțiuni alcaloizice separate electroforetic în eprubete la extremitatea inferioară a hîrtiei crenelate. Cantități mici din soluțiile obținute ne-au servit pentru reacțiile generale de identificare a alcaloizilor, la care am folosit reactivii menționați. Reacțiile pozitive au confirmat natura alcaloizică a acestor două substanțe separate. Restul soluțiilor obținute atît din *Leucojum vernum* cît și din *Leucojum aestivum* au fost supuse concentrării la sec sub presiune scăzută, obținîndu-se pentru fiecare o masă amorfă, care cristalizează din amestec hidroalcoolic la rece.

Astfel am obținut două substanțe cristalizate, solubile mai ales la cald în solvenții organici uzuali: alcool, clorofom, eter, acetona, una cu p. t. 272–274° corespunzătoare primului spot fluorescent pe electroforegramă, iar a doua cu p. t. 128–130° corespunzătoare celui de al doilea spot.

În cercetările ulterioare vom face studiul și al altor constante fizico-chimice ale alcaloizilor separați de noi din speciile de *Leucojum*.

Concluzii

Am realizat prepararea unei soluții extractive conținînd un total de alcaloizi din speciile de *Leucojum vernum* L. și *Leucojum aestivum* L.

2. Electroforeza bidimensională a acestei soluții extractive practică în mediu de acid formic ne-a permis separarea unui spot, iar în mediu alcalin a două spoturi net diferențiate care s-au colorat în roșu-cărmaziu la tratarea electroforegramelor cu R. Dragendorff modificat.

3. Cu ajutorul electroforezei preparative am obținut în cantități suficiente cele două fracțiuni electroforetice, ceea ce ne-a permis să efectuăm și alte reacții de precipitare cu reactivii generali ai alcaloizilor. Restul soluțiilor ne-au servit la obținerea în stare pură a celor doi alcaloizi.

Cercetarea unor proprietăți fizico-chimice a substanțelor izolate ne-a arătat identitatea celor doi alcaloizi din speciile de *Leucojum*.

Sosit la redacție: 21 octombrie 1961.

Bibliografie

1. BOIT H. G.: Ber. d. chem. Gesch. (1954), 87, 724; 2. BUBEVA-IVANOVA L.: Farmacia (1957), 2, 23; 3. DURRUM E. L.: J. Coll. Sc. (1951), 6, 674; 4. DURRUM E. L.: J. Am. Chem. Soc. (1951), 73, 4975; 5. GROSMANN W., HANNIG K.: Naturwiss. (1950), 37, 397; 6. IONESCU-MATIU AL., ILIESCU E.: Pharm. et chim. (1936), 13, 117; 7. IVANOV V., IVANOVA L. B.: Farmacia (1959), 3, 24; 8. LEDERER M.: Anal. Chim. Acta (1954), 11, 145; 9. MARINI-BETTOLO G. B., LEDERER M., JANO M. A., PIMENTA A.: Gazz. Chim. Ital. (1954), 34, 1155; 10. MASCOVSKII M. D., KRUG-LIKOVA-LIVOVA R. P.: Farmakologija i Tokikologija (1951), 14, (6), 27–30; 11. PASKOV D. S., NIVALIN: Medicina i Fizcultura, Sofia (1959); 12. PROSKURNINA N. F., ARESCINA L.: Jurnal obs. himn. (1947), 17, 1216; 13. PROSKURNINA N. F., JACOVLEVA A. P.: Jurnal obs. himn. (1952), 22, 1899; 14. SATO T., NORRIS P., STRAIN H.: Anal. Chem. (1952), 24, 776; 15. SOKOLOV V. S.: Alkaloidosomie rastenia U.R.S.S. (1952); 16. SVENSON H., BRATTSTEN L.: Arkiv. Kem. (1949), 1, 401; 17. SENK N. A., EIDINOVA M. B., MITBRENT I. M.: Farmakologija i Tokikologija (1956), 4.



Figura nr. 1. - a) Electroforeza bidimensională a alcoolizilor extrași din speciile de Leucojum, în mediu acid.

b) Electroforeza bidimensională a alcoolizilor extrași din speciile de Leucojum, în mediu alcalin.



Fig. nr. 2. - Electroforeza verticală a alcoolizilor extrași din speciile de Leucojum în mediu alcalin.