

## Studiul cromatografic al *Euphorbia cyparissias*

### Chromatographic study of *Euphorbia cyparissias*

Romeo T. Cristina, Faltinski Flavius  
Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

#### Rezumat

Controlul populațiilor ectoparazitare este foarte dificil și include numeroase substanțe chimice și tehnici terapeutice. Deși inițial eficiente, folosirea repetată a unor substanțe acaricide duce la apariția rezistenței.

Eficacitatea din ce în ce mai redusă a arsenalului terapeutic pune serioase probleme practicienilor și face să crească necesitatea descoperirii unor substanțe noi. La aceasta se adaugă problema reziduurilor în ouă și carne, care constituie un impediment grav.

Din aceste considerente, recurgerea la extracte vegetale este o cale de cercetare deosebit de atractivă și promițătoare. Investigațiile legate de biocontrolul antiparazitar s-au diversificat studiindu-se numeroase surse de control (fungi, extracte vegetale, uleiuri volatile etc.).

În acest context, extractele de plante pot fi o sursă alternativă pentru controlul acarienilor cunoscându-se că ele constituie o sursă bogată în compuși bioactivi eficienți.

Din păcate deși la îndemână până în prezent, nu se cunosc încă foarte multe date despre ce determină activitatea acaricidă a unor extracte vegetale contra argasidelor.

Lucrarea descrie un studiu *in vitro* pentru testarea componenței *Euphorbia cyparissias* prin investigații CG-MS.

**Cuvinte cheie:** *Euphorbia cyparissias*, analiza biochimică, CG-MS

#### Abstract

The ectoparasitic population control is very difficult and includes numerous chemical substances and therapeutic techniques. Although efficient at first, the repeated use of acaricidal substances leads to the appearance of resistance.

The more and more reduced efficacy of the therapeutic arsenal puts serious problems for the practitioners and increases the need of newer substances on the market. Besides this appears the problem of residues in eggs and meat, which is a serious impediment.

Because of this the use of plant extracts is an attractive and promising research path.

The investigations tied to the parasitic biocontrol have diversified with the study of the numerous control sources (fungi, plant extracts, volatile oils etc.).

In this context, the plant extracts can become an alternative source for the acaricidal control knowing that they constitute a rich source of efficient bioactive compounds.

Unfortunately although at hand until today, not very much data is known about what determines the acaricidal activity of some plant extracts against the argasid ticks.

The present work describes an *in vitro* CG-MS study for identification of *Euphorbia cyparissias*' chemical composition.

**Key words:** *Euphorbia cyparissias*, biochemical analysis, CG-MS

În cercetări (contractuale) incipiente *in vitro* și *in vivo* s-au identificat efecte acaricide împotriva nimfelor și adulților<sup>1</sup> din genurile parazitare *Argas persicus* și *Ixodes* (speciile *Dermacentor marginatus* și *Haemaphysalis punctata*)<sup>(3, 4)</sup>.

Pe baza toxicității (cunoscute) a *quercetin-3-glucuronidei* și *camphorol-3-glucuronidei*, principalii flavonoizi cunoscuți din *Euphorbia cyparissias* s-a presupus că efectul acaricid se produce după traversarea cuticulei și consecutiv afectării sistemului nervos al acarienilor<sup>(5, 9, 10)</sup>.

Lucrarea descrie un studiu *in vitro* pentru testarea componenței *Euphorbia cyparissias* prin investigații CG-MS.

Protocolul stabilit nu și-a propus să scoată în evidență mecanismul intim de acțiune al principiilor activi din *Euphorbia cyparissias*, ci să aducă date certe în legătură cu componența în compuși flavonoizi, cei care sunt bănuți a avea activități acaricide.

Investigațiile vor completa cunoștințele despre modul de acțiune și eventual despre efectul repelent al compușilor antiparazitari din *E. cyparissias*.

#### Materiale și metode

##### Materialele

*Pregătirea materialului vegetal de Euphorbia cyparissias.*

Planta întregă a fost recoltată din zona Banatului în faza sa de vegetație maximă și apoi a fost mărunțită pe părți componente

<sup>1</sup> Căpușele argaside sunt implicate în transmiterea a numeroși agenți patogeni dintre care cei mai importanți sunt *Spirocheta gallinarum*, *Pasterurella multocida*, *Salmonella pullorum*.

(inflorescență, tulpină și rădăcină) de 0,5 - 1 cm și uscată la 20°C conform instrucțiunilor Farmacopeei Române Ed. a X-a.

#### Extractia

După uscare s-a trecut la extracție, solventul ales fiind hexanul din cele trei parti ale plantei: inflorescenta, tulpina si radacina, după cum urmează:

În recipiente din sticla bruna cu dop rodat de 200 ml s-au depus câte 10 g material vegetal mărunțit și 100 ml hexan/probă de plantă, agitandu-se energic din oră în oră, timp de o zi. Amestecurile lăsate apoi în repaos în contact cu hexanul (Merck&Co Inc., New Jersey). pentru extracția principiilor timp de 10 zile, conform instrucțiunilor de la monografia Tincturae din F.R. X la temperatura camerei.

#### Metoda

##### Analiza GC-MS

Pentru analiza compușilor volatili din *Euphorbia cyparissias* s-a folosit un sistem de analiză gaz cromatografică cuplată cu un sistem de detecție de spectrometrie de masă.

Pentru testare s-a utilizat un GC Hewlett Packard HP 6890 Series cuplat cu un spectrometru de masă (Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector).

##### Condițiile de analiză GC au fost:

- coloana (HP-5MS), lungime 30m, diametru interior 0.25mm, grosime film: 0,25μm;
- program de temperatură: 50°C la 250°C cu o viteză de 4°C/min;
- temperatura injectorului: 280°C;
- temperatura detectorului: 280°C;
- volum de injecție: 2 μl;
- gaz purtător: He.

Pentru detectorul MS s-a lucrat cu:

- energie EI de 70eV,
- la o temperatură a sursei de 150°C,
- domeniu de scanare 50–300 amu,
- viteză de scanare de 1s<sup>-1</sup> pentru spectrometria de masă.

##### Comparația spectrală:

Spectrele obținute au fost comparate cu baza de date NIST/EPA/NIH - Mass Spectral Library 2.0.

#### Rezultate

Compușii identificați în extractul din **inflorescența** de *Euphorbia cyparissias* au fost în număr de 13 (conform tabelului 1).

Compușii majoritari identificați au fost **sesquiterpenoidele**, in principal:

- **elemenul** (19.83%).
- **beta-carofilenul** (3,31%) și **compusul său de epoxidare**,
- **cariofilen-oxidul** (0,58%).

Au mai fost decelate la concentrații mai mici câteva **mono-terpenoide** și **compuși aromatici**:

- **limonenul** (13,3%),
- **o-cimenul** (9,58%),
- **alpha-pinenul** (5,81%).

Compuși similari se găsesc și în extractul din **tulpina** plantei, doar că apar doar sesquiterpenele și acestea în concentrații mai mari:

- **elemenul** 40,73%,
- **cariofilenul** (4,55%) și
- **epoxidul acestuia** (0,97%),
- **selinenul si guainenul**.

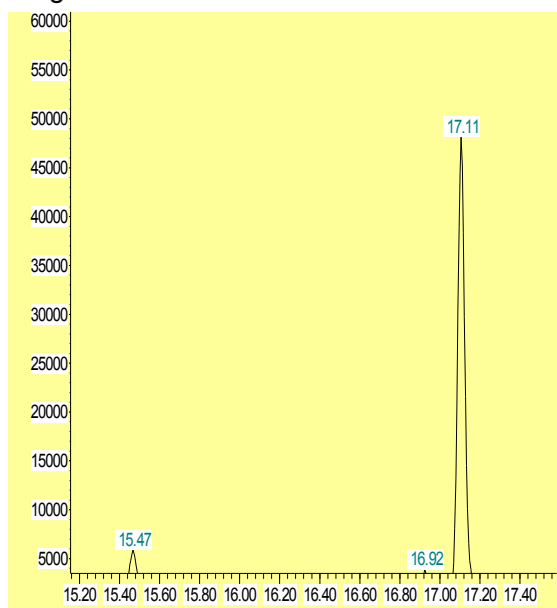
În extractul din **rădăcina** de *Euphorbia* au fost identificați **7 compuși** (tabelul 3), concentrația cea mai mare înregistrându-se tot pentru sesquiterpene:

- **elemenul** 64,49%,
- **cariofilenul** 7,2% și
- **epoxidul acestuia** (1,53%),
- **selinenul** 5,93% și
- **guaienul** 3,96%.

La concentrații mai mici au fost identificate și **monoterpene**:

- **cimenul** (6,21%) și
- **fenchenul** (10,67%).

Gaz cromatogramele si spectrul de masa din analiza GC-MS ale compușilor identificați pe părți ale plantei sunt prezentate în imaginile din anexele următoare:



Tabelul 1.

Compoziția extractului din planta de *Euphorbia cyparissias* (inflorescență)

Nr. crt.	Time	Area	A%	Compusul identificat spectral
1	5.076	21217	3.56	<i>1R-alpha-Pinene</i>
2	5.226	13428	2.25	<i>1R-alpha-Pinene</i>
3	7.352	57059	9.58	<i>o-Cymene</i>
4	7.443	78671	13.2	<i>d-Limonene</i>
5	16.925	5046	0.85	<i>gamma-Gurjunene</i>
6	17.107	118180	19.83	<i>beta-Elemen</i>
7	21.07	19726	3.31	<i>Caryophyllene</i>
8	21.75	3438	0.58	<i>Caryophyllene oxide</i>
9	30.27	159190	26.72	<i>Palmitic acid, ethyl ester</i>
10	32.78	23761	3.99	<i>Linoleic acid ethyl ester</i>
11	32.871	49185	8.25	<i>Linoleic acid ethyl ester</i>
12	33.186	13696	2.3	<i>Stearic acid, ethyl ester</i>
13	33.945	33231	5.58	<i>Betulin</i>

Tabelul 2.

Compoziția extractului din planta de *Euphorbia A.* (tuplina).

Nr. Crt.	Time	Area	A%	Compusul identificat spectral
1	17.104	97056	40.73	<i>beta-Elemen</i>
2	19.679	8922	3.74	<i>delta-Selinene</i>
3	19.914	5966	2.50	<i>delta-Guaiene</i>
4	21.08	10843	4.55	<i>Caryophyllene</i>
5	21.69	2310	0.97	<i>Caryophyllene oxide</i>
6	30.28	98123	41.18	<i>Palmitic acid, ethyl ester</i>
7	32.785	8563	3.59	<i>Linolenic acid, ethyl ester</i>
8	32.892	6481	2.72	<i>Linolenic acid, ethyl ester</i>

Tabelul 3.

Compoziția extractului din planta de *Euphorbia A.* (rădăcina)

Nr. Crt.	Time	Area	A%	Compusul identificat spectral
1	7.35	9345	6.21	<i>o-Cymene</i>
2	7.446	16059	10.67	<i>alpha-Fenchene</i>
3	17.104	97056	64.49	<i>beta-Elemen</i>
4	19.679	8922	5.93	<i>delta-Selinene</i>
5	19.914	5966	3.96	<i>delta-Guaiene</i>
6	21.08	10843	7.20	<i>Caryophyllene</i>
7	21.69	2310	1.53	<i>Caryophyllene oxide</i>

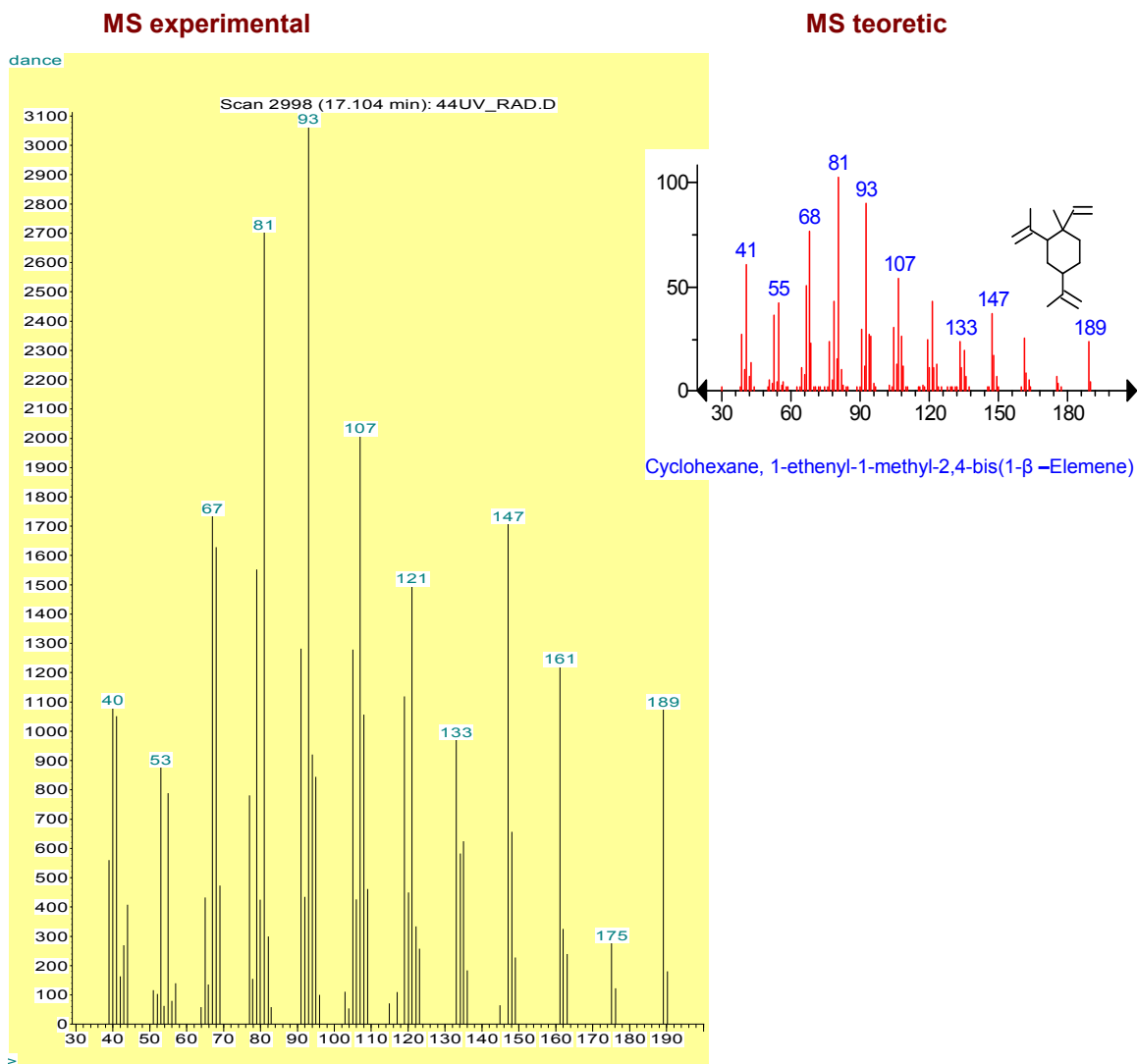
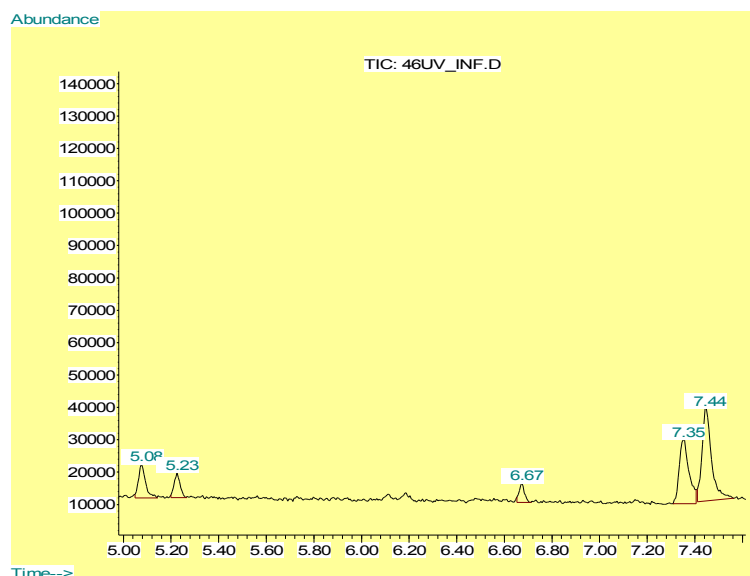


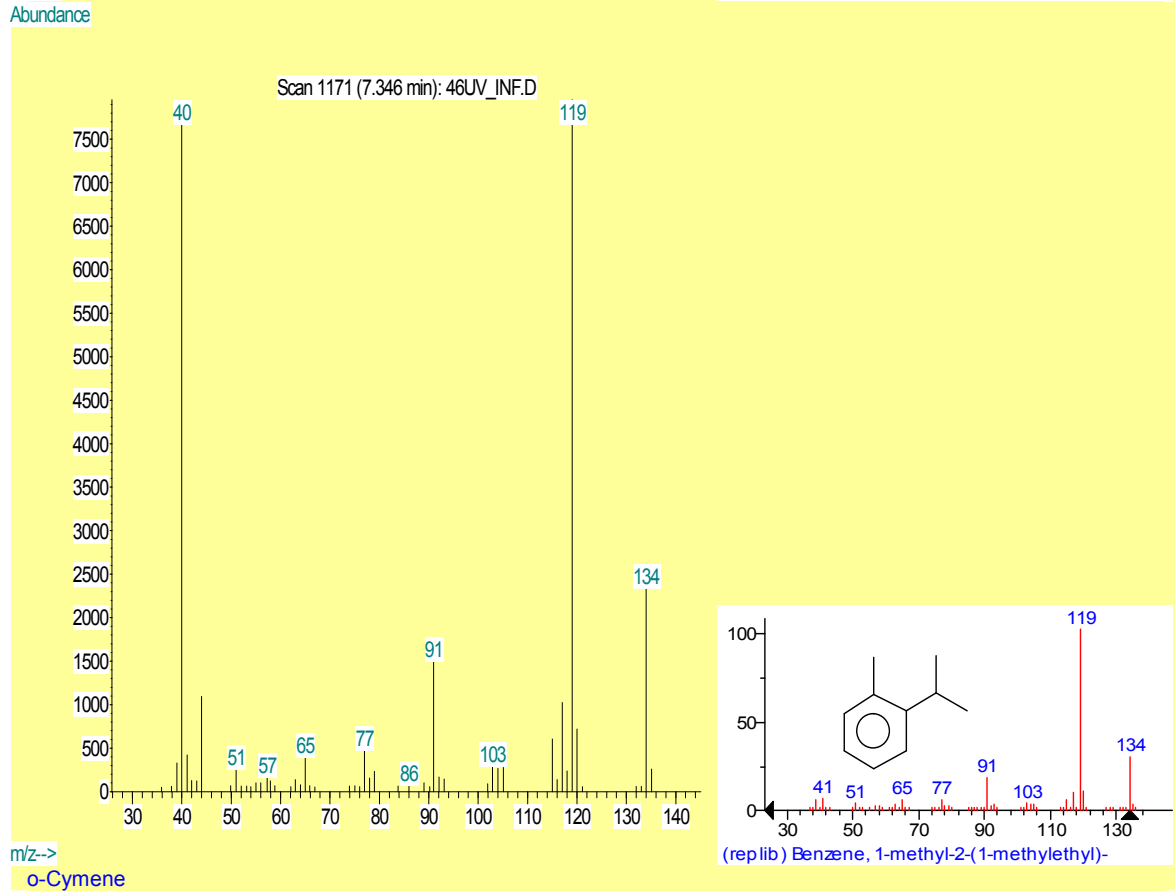
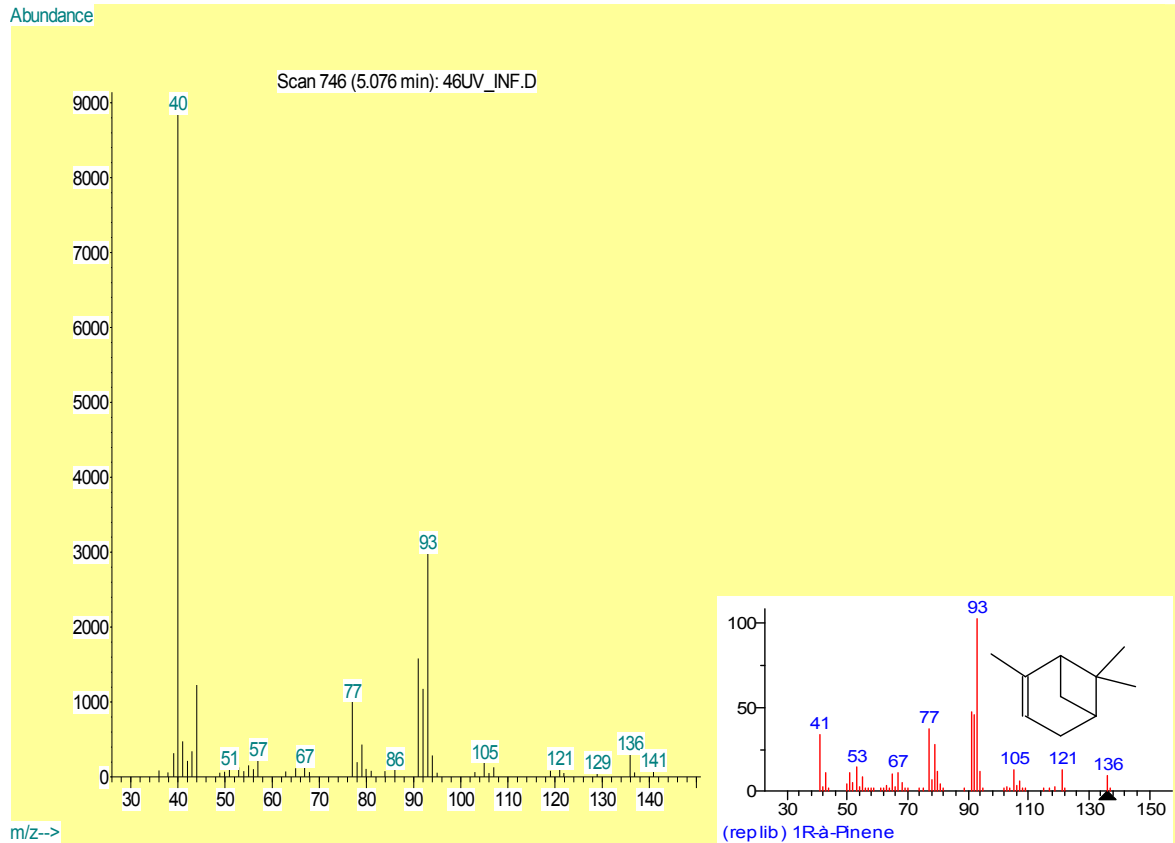
Figura 1. Gaz cromatograma si spectrul de masa din analiza GC-MS a β-elemenului

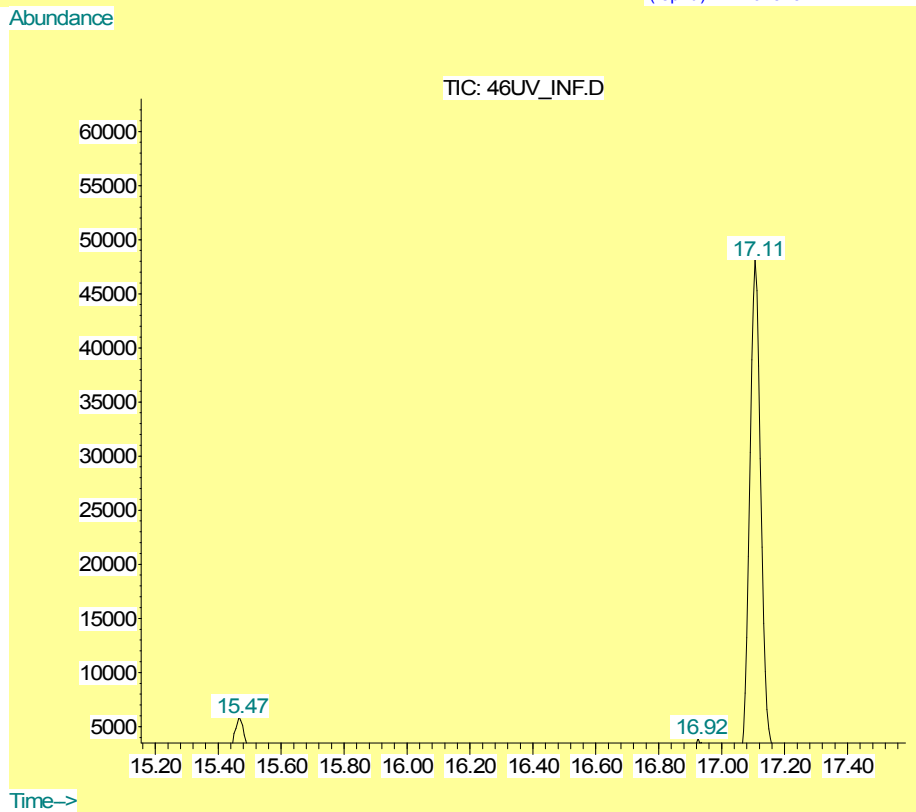
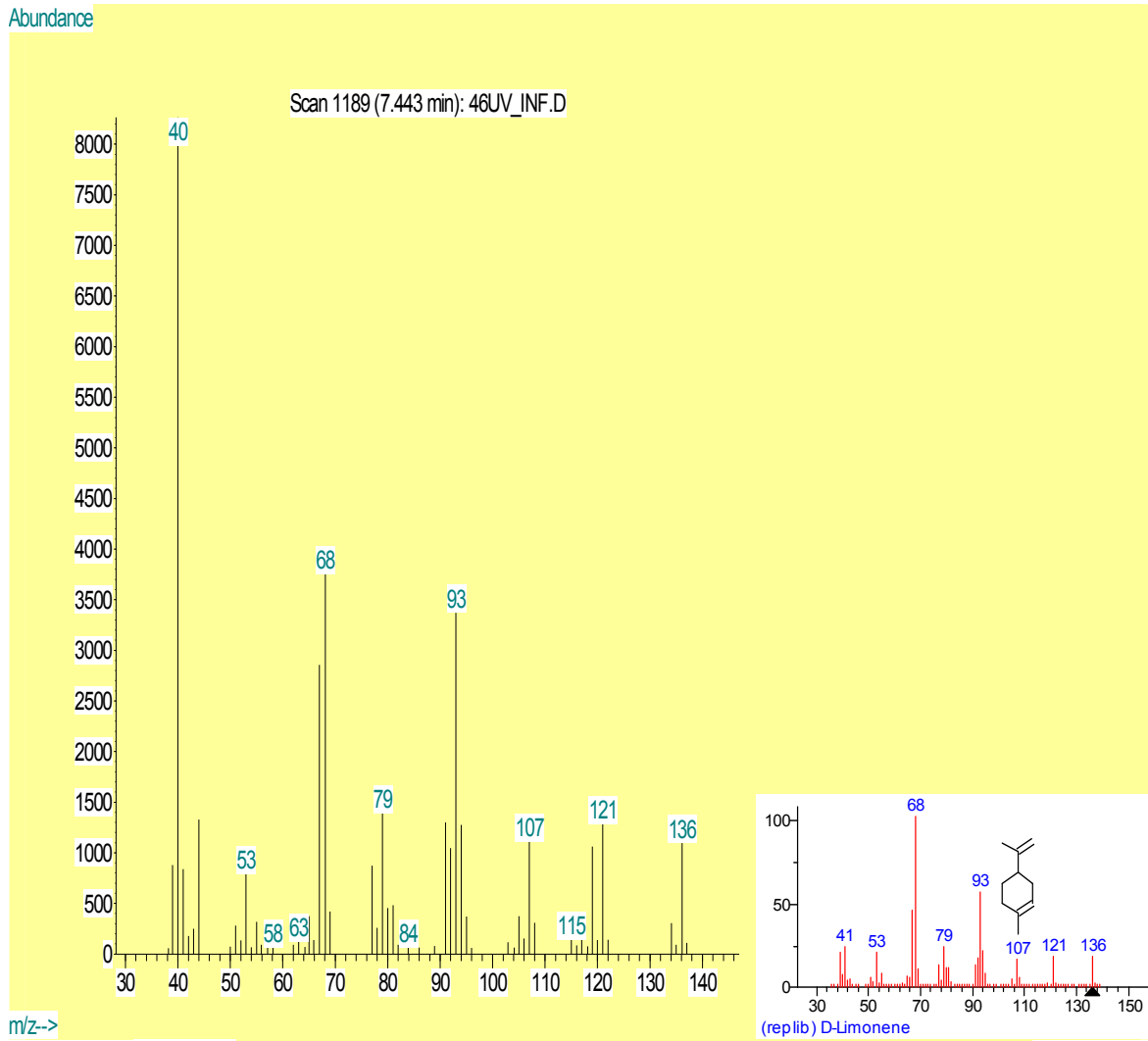
Gaz -cromatogramele si spectrele de masa experimentale pe proțiunile plantei sunt prezentate în Anexele 1, 2 si 3.

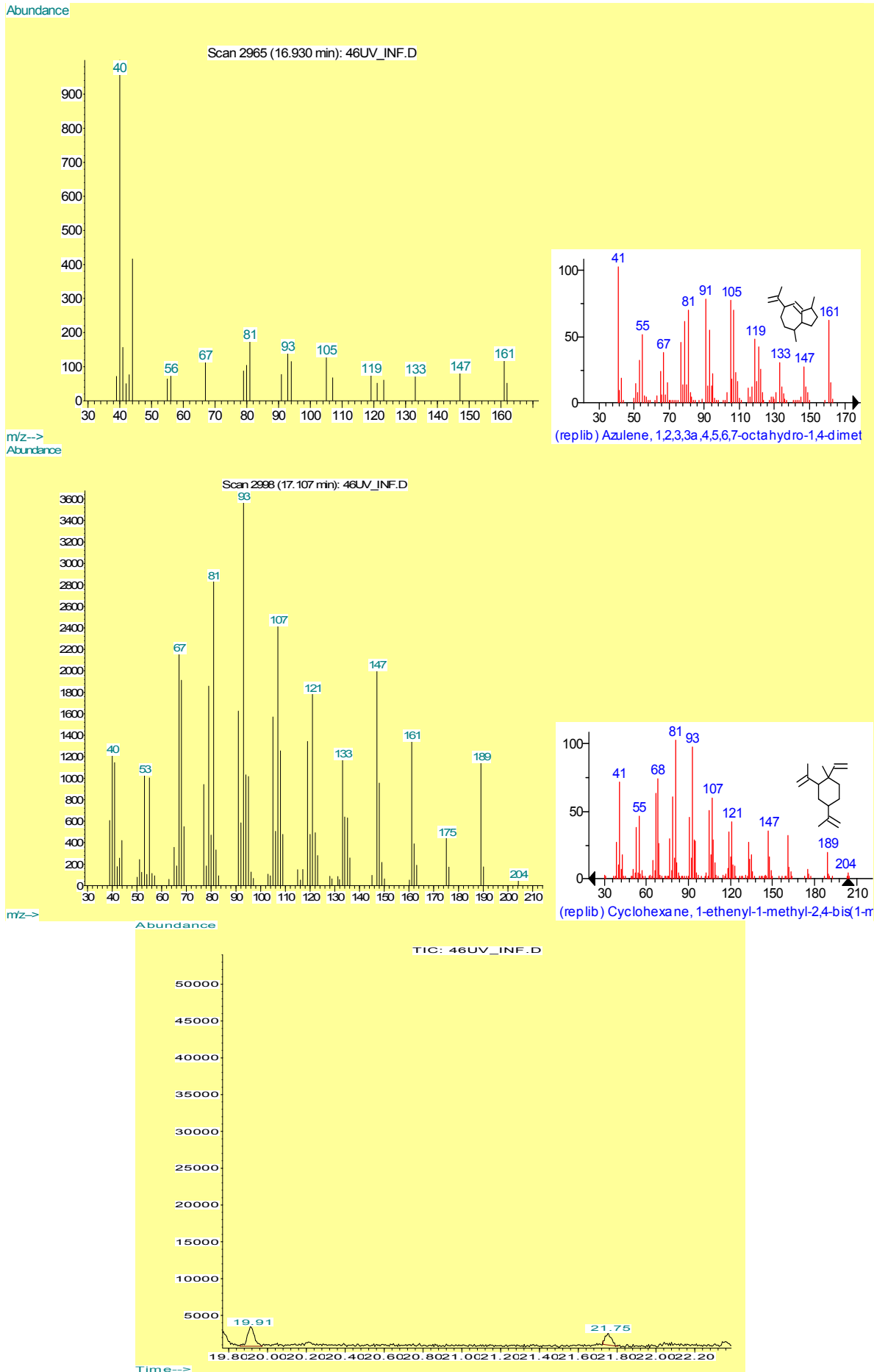
**Anexa I**

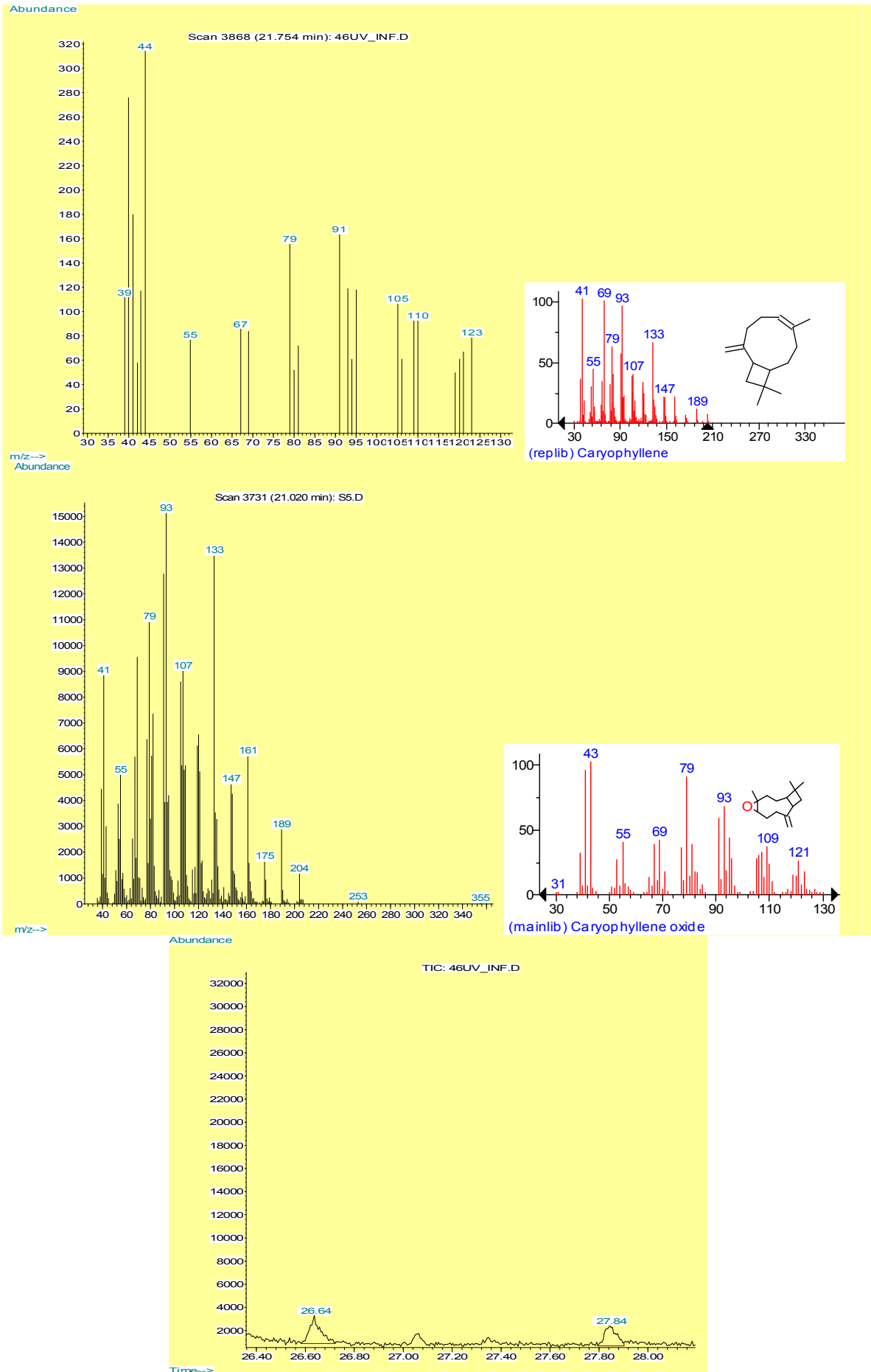
**Euphorbia inflorescenta – extract la rece**



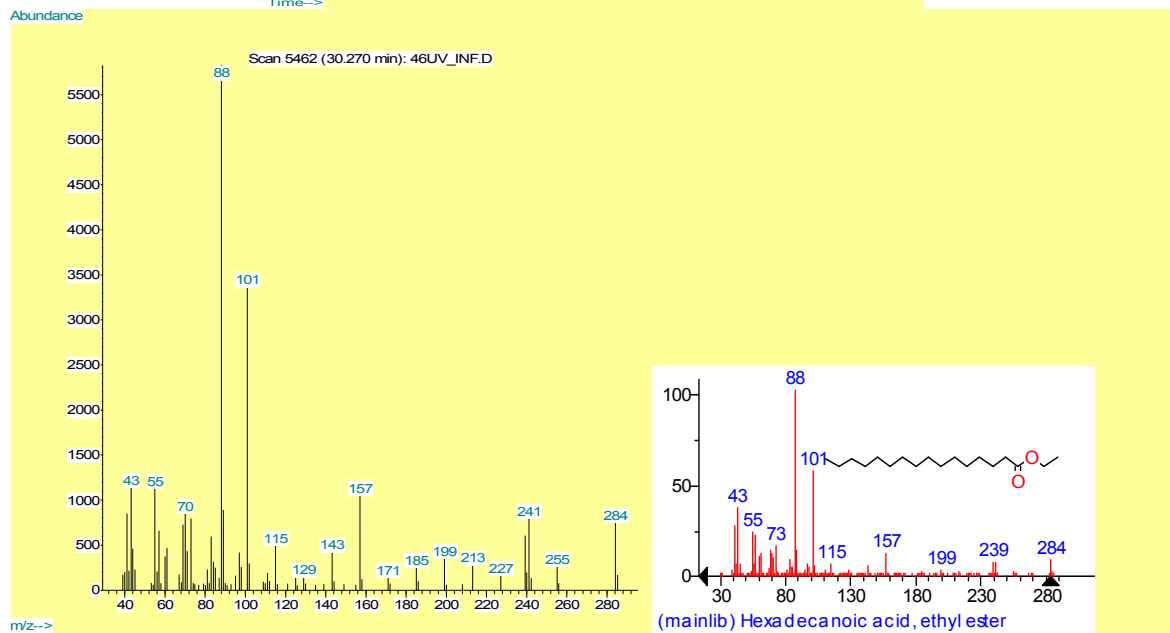
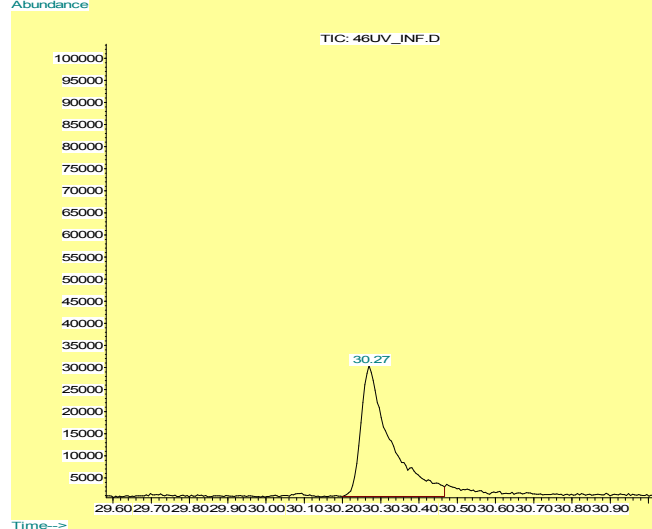
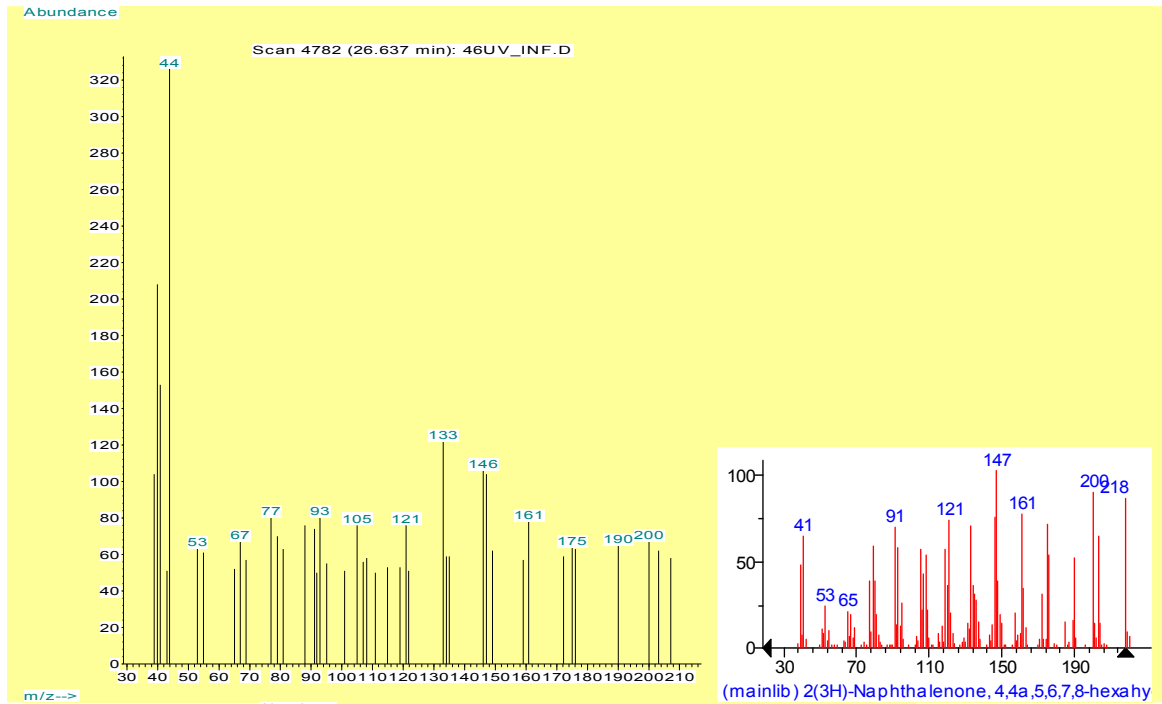


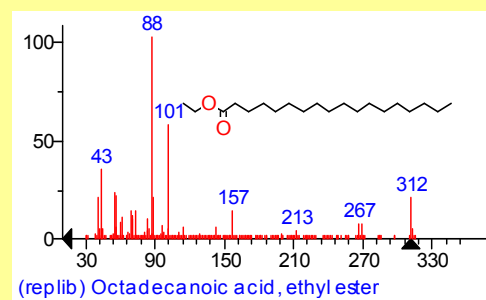
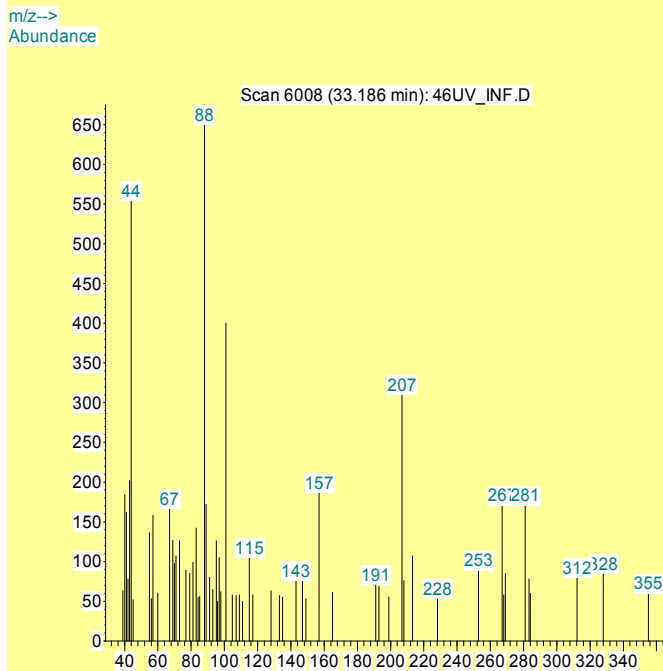
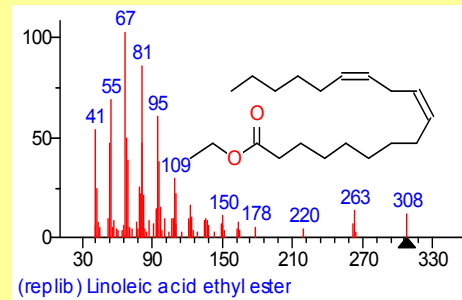
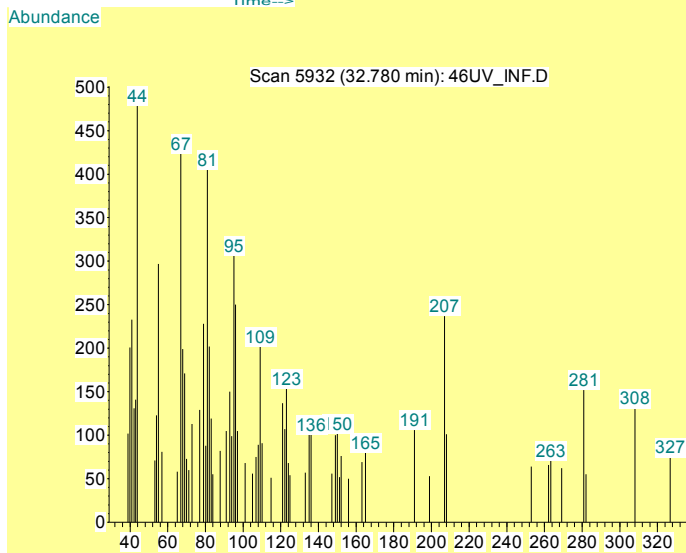
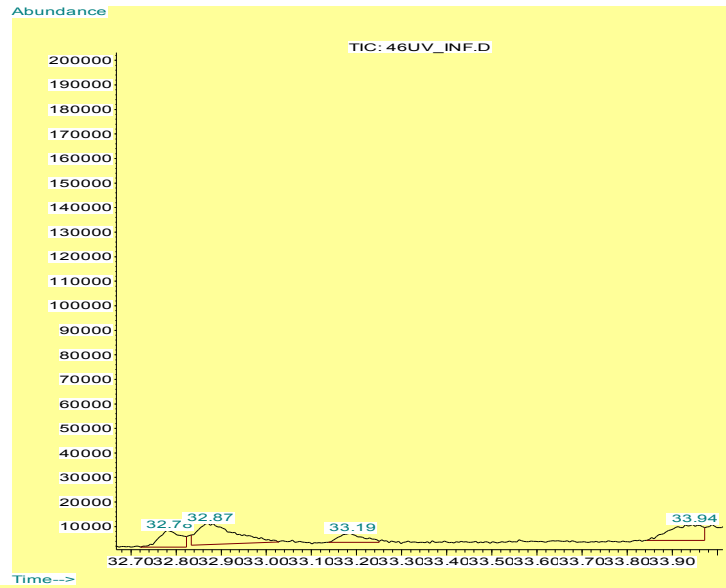




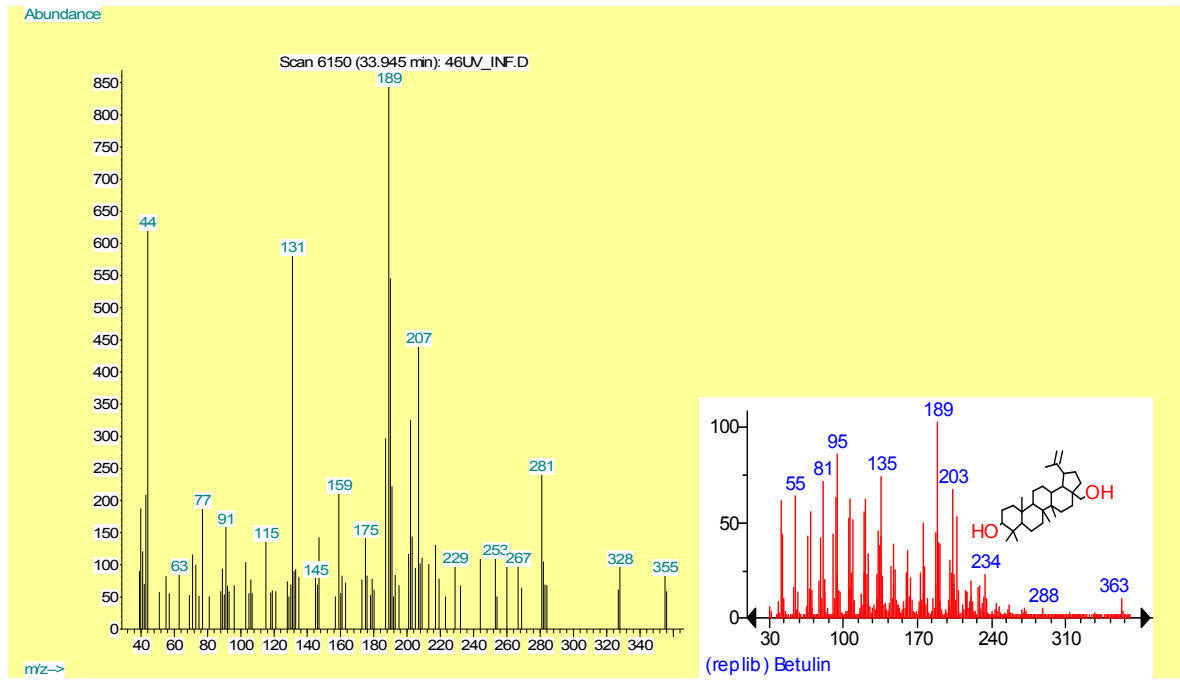






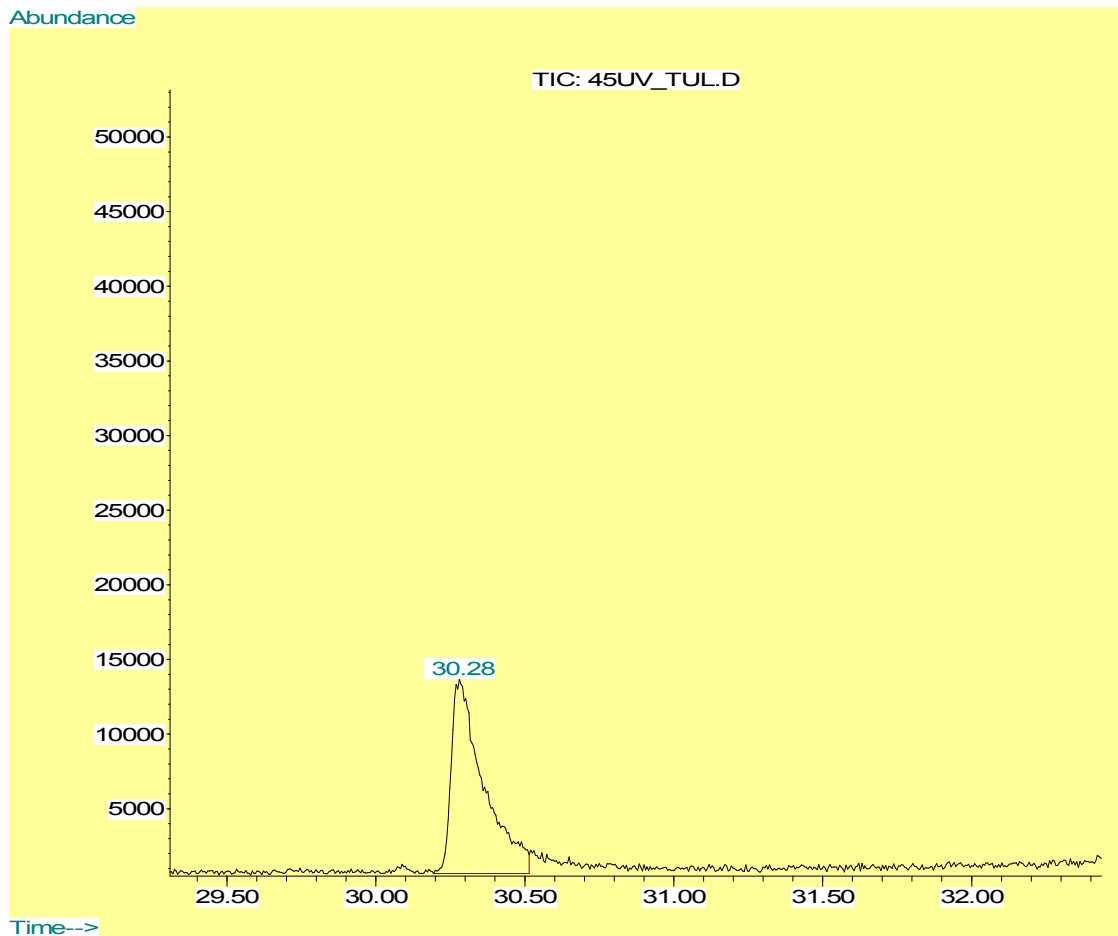


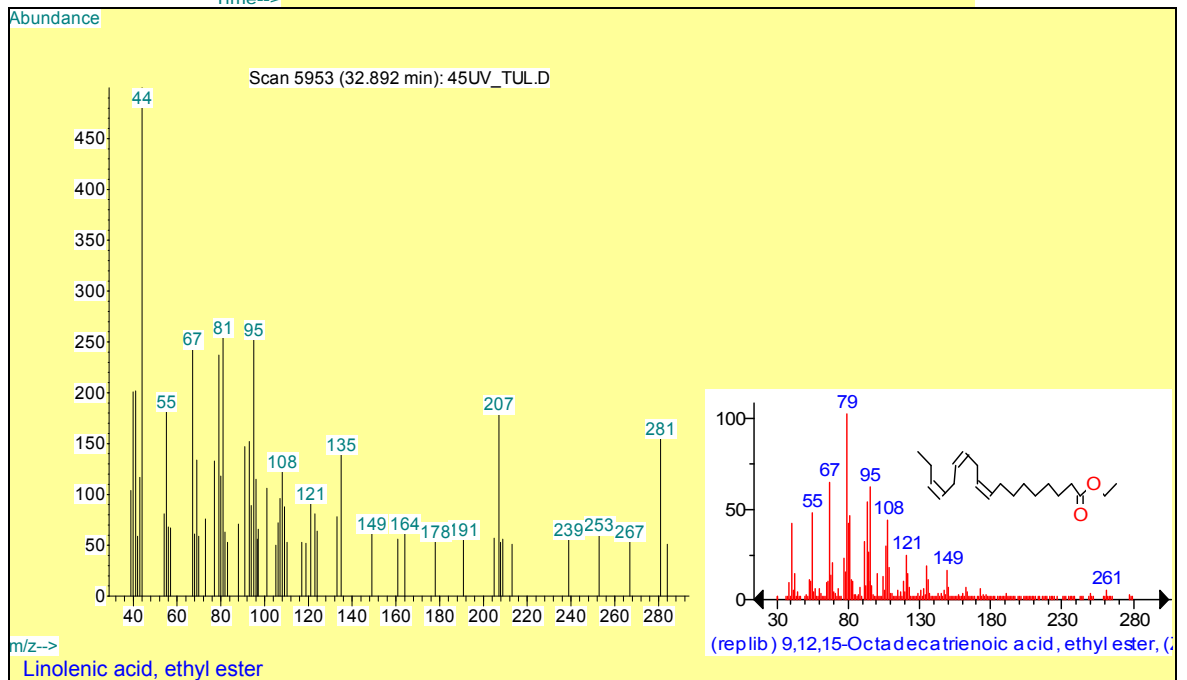
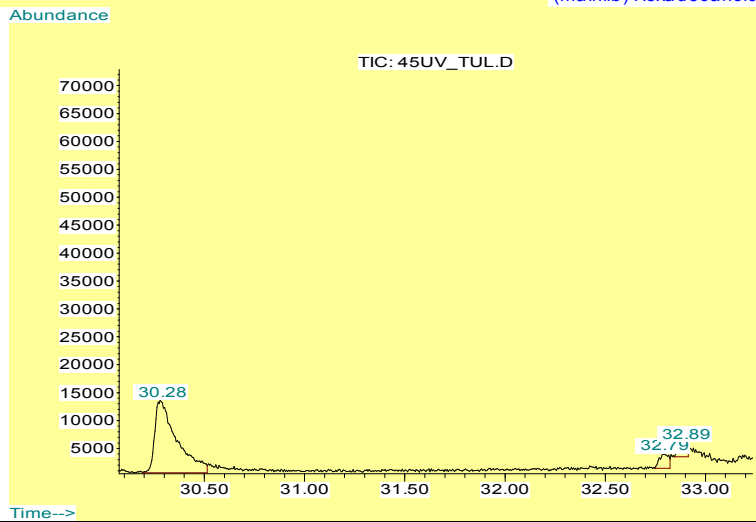
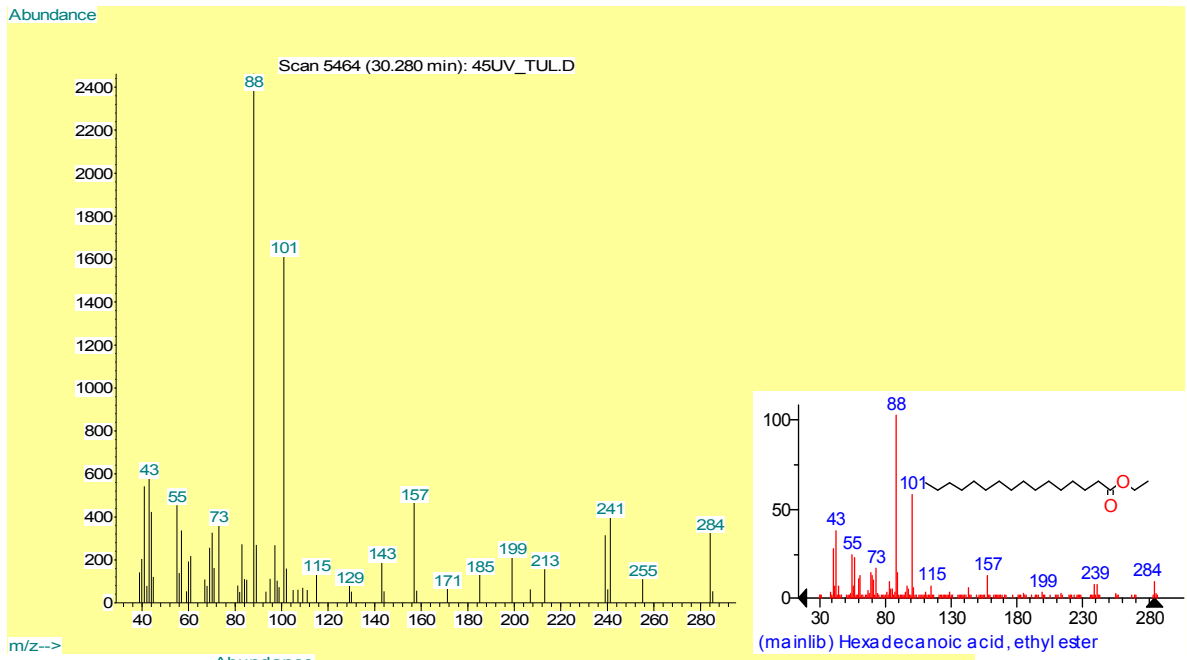
Stearic acid, ethyl ester



**Anexa 2**

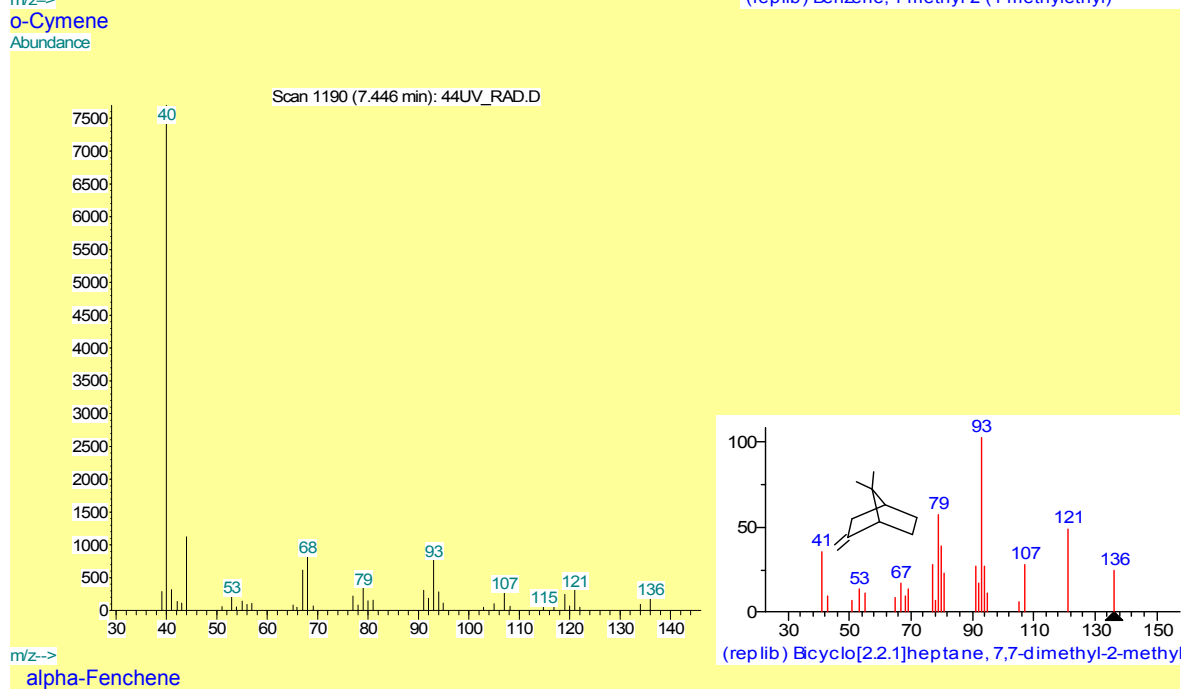
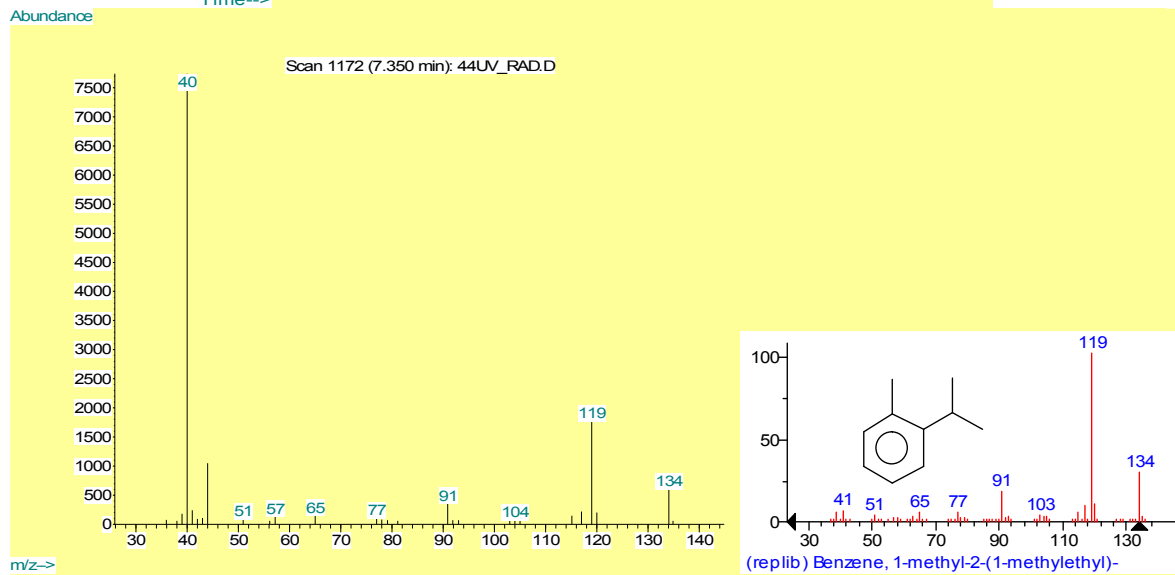
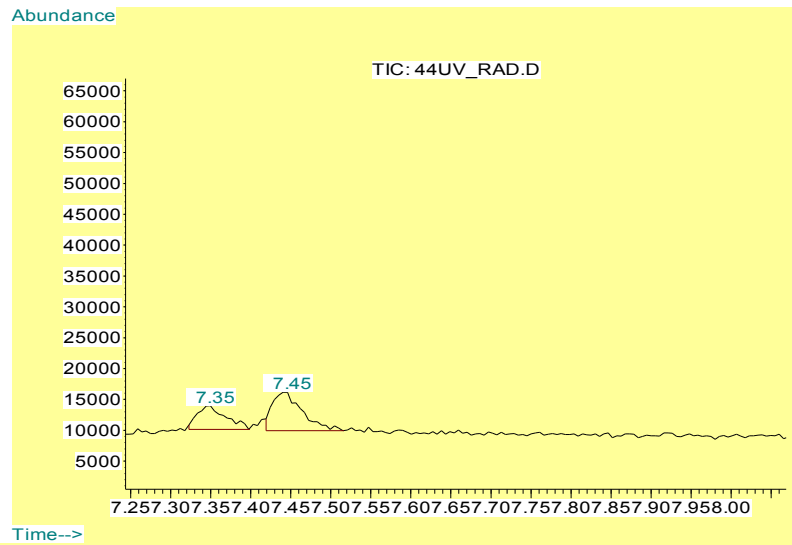
***Euphorbia tulpina* – extract la rece**

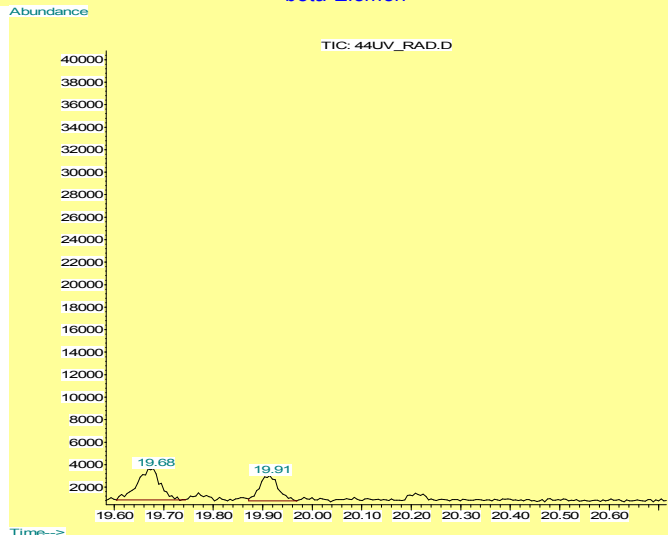
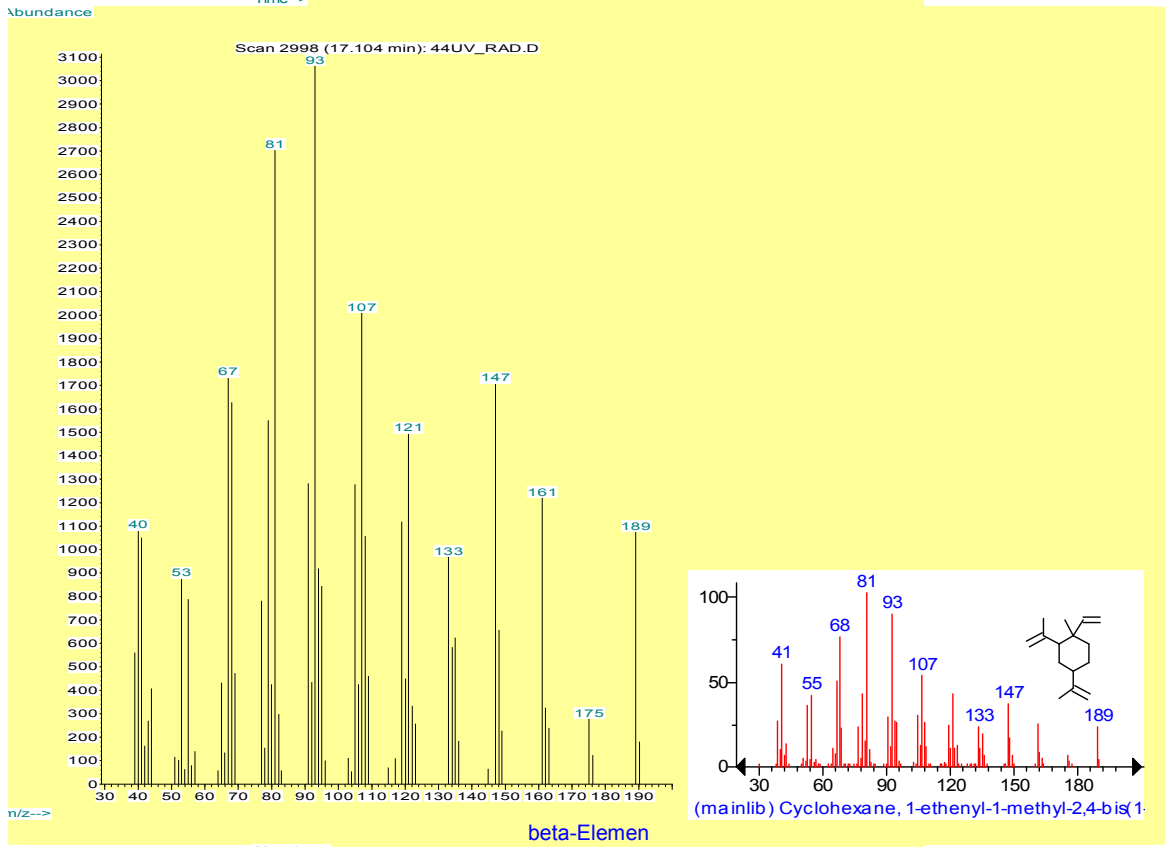
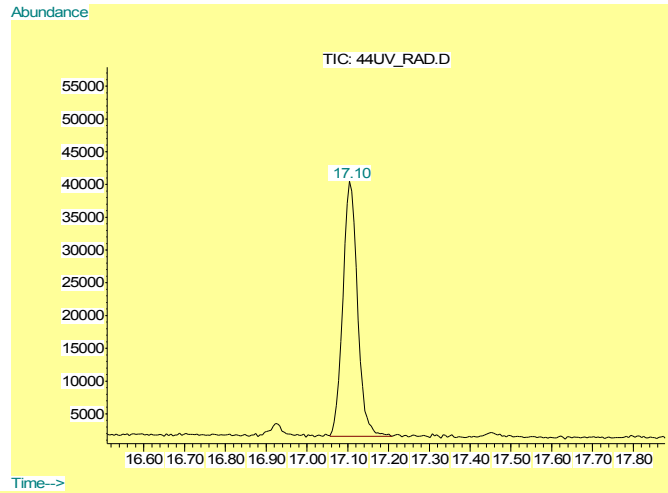


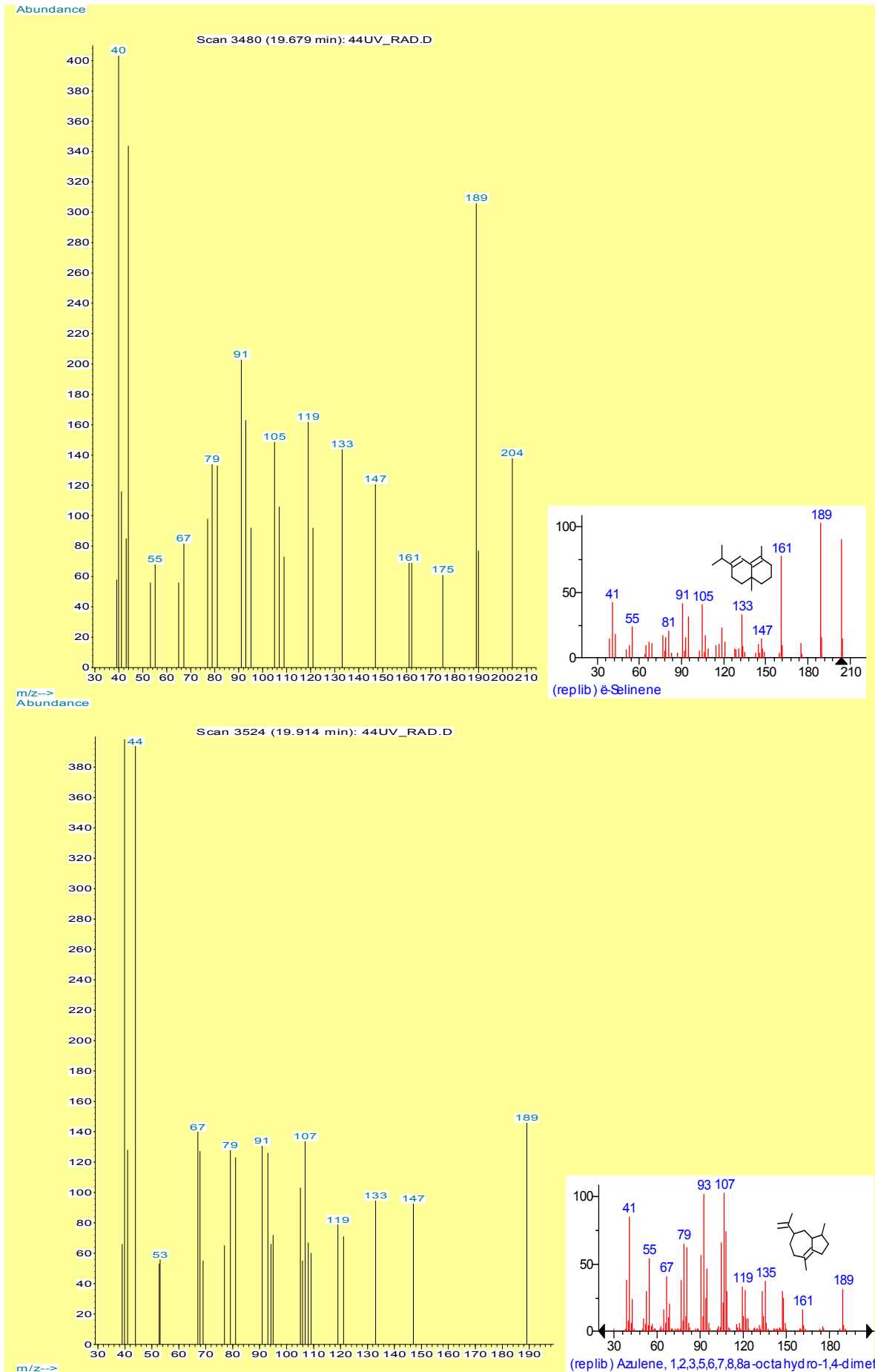


Anexa 3

**Euphorbia rădăcina – extract la rece**







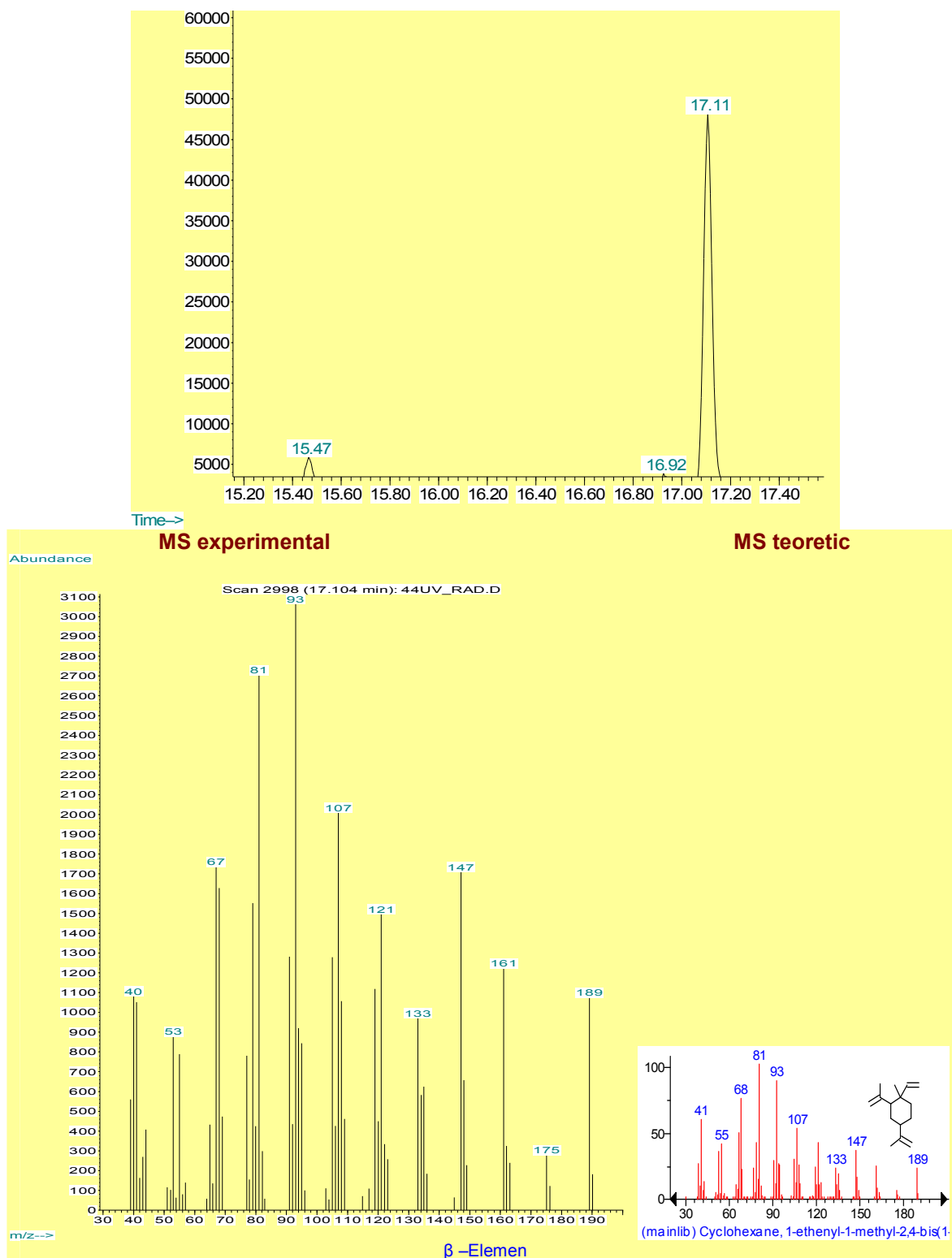


Figura 3. Gaz cromatograma si spectrul de masă din analiza GC-MS a  $\beta$ -elemenului

### Discuții

În lucrarea lor EVANICS F și col. (2001)<sup>(5)</sup> au identificat în *Euphorbiacee* 16 poliesteri diterpenici, structuri de tip jatropanic similari și chiar au denumit ca structură nouă diterpenoidul, *euphekinezina*. Structurile

identificate evidențiază importanța zonei geografice de unde se recoltează plantele.

Numărul structurilor noi identificate demonstrează marele interes (cel puțin în domeniile parazitologiei și oncologiei umane și veterinare, acesta este imens), pentru identificarea componentelor cu activitate terapeutică (1, 2, 6, 7, 8, 11).



## Concluzii

În urma analizei fizico-chimice efectuate se pot trasa următoarele concluzii:

- în extractul hexanic de *Euphorbia* din toate cele trei părți ale plantei (rădăcina, tulpina și inflorescența) s-au identificat drept componente majoritare *sesquiterpenoidele* (preponderent elementul și cariofilenul);
- o mare parte din cariofilen s-a identificat în stare epoxidată (cariofilen oxidul), care este posibil să fi rezultat și în condițiile procesării materiilor prime și a depozitării;
- concentrația de compuși sesquiterpenoidici scade în seria de probe din rădăcină-tulpină-inflorescență (concentrația de element se reduce la o treime în extractul din inflorescență comparativ cu cel din rădăcină), în timp ce concentrația de monoterpene și compuși aromatici crește în probele preparate din inflorescență.

## BIBLIOGRAFIE

1. AHMAD, V.U. and JASSBI, A.R. (1999). "New diterpenoids from *Euphorbia teheranica*" *J. Nat. Prod.*, 62, 1016-1018
2. AKIHISA, T., KITHSIRI, W.E, TOKUDA, H., ENJO, F., TORIUMI, M., KIMURA, Y., KOIKE, K., NIKAIIDO T, TEZUKA Y, NISHINO (2002). *H. Eupha*, 7,9(11), 24-trien-3beta-ol ("antiquol C") and other triterpenes from *Euphorbia antiquorum* latex and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J Nat Prod* 12, Feb;65(2):158-62
3. CRISTINA, R.T, LIDIA CHIȚIMIA, COSOROABĂ, J. (2006). Acaricidal activity of Cypress Spurge (*Euphorbia Cyparissias* L.) alcoholic extracts against *Argas Persicus* ticks. *Timișoara Medical Journal* p. 339-342.
4. CRISTINA, R.T., COSTESCU, CORINA, HĂDĂRUGĂ, NICOLETA, PÂRVU, D., DUMITRESCU, EUGENIA. (2006). Studiul unor compuși volatili de *Euphorbia cyparissias* L. cu activitate ectoparazitara. In press. *Rev. Chim.*
5. EVANICS, F., HOHMANN, J., REDEI, D., VASAS, A., GUNTHER, G., DOMBI, G. (2001). New diterpene polyesters isolated from Hungarian *Euphorbia* species *Acta Pharm Hung.* 71(3):289-92
6. FERRIERA, M., LOBO, J.U., WYLER, A.M. (1993). *Triterpenes of Euphorbia mellifera. Fitoterapia*, 64, 377
7. LIU, L.G., MENG, J.C., WU, S.X., LI, X.Y, ZHAO X.C., TAN, R.X. 2002 New macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia esula*. *Planta Med Mar*, 68(3), p. 244-8
8. MATSUNAGA, S., MORITA, R., ISHIDA, T., INOUE, M. (1984). "The structure of spiro suopinanonediol, a triterpenoid bearing a novel skeletal system from *Euphorbia supine*" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 16, 1128-1129
9. PAPP, N., VASAS, A., HOHMANN, J., SZABÓ, L.G. (2005). Morphological and flavonoid pattern variations within some *Euphorbia cyparissias* L. Populations. *Acta Biol Szeged* 49(1-2):171-172 .
10. SCHURCH, S., PFUNDER, M., ROY, B.A. (2000). Effects of ants on the reproductive success of *Euphorbia cyparissias* and associated pathogenic rust fungi. *Oikos* 88(1): 6-12.
11. TANAKA, R, KASUBUCHI, K, KITA, S, TOKUDA, H, NISHINO, H, MATSUNAGA, S. (2000). Bioactive steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. *J Nat Prod Jan*; 63(1):99-103.