

CZU: 582.949.27 : 633.85 : 543.544

## STUDIUL COMPLEX AL ULEIULUI VOLATIL DIN SPECIA *PEROVSCHIA ATRIPLICIFOLIA* BENTH.

Maricica COLȚUN, Elvira GILLE\*, Radu NECULA\*, Valentin GRIGORAȘ

Grădina Botanică (Institut) a AȘM

\*Centrul de Cercetări Biologice „Stejarul” Piatra-Neamț (România)

În lucrare sunt prezentate rezultatele unui studiu vast privind biologia, compoziția chimică, fitochimia cantitativă și calitativă a uleiului volatil din specia *Perovskia atriplicifolia*, care se comportă ca plantă perenă, erbacee din familia Lamiaceae. În R. Moldova nu este cercetată ca plantă aromatică și medicinală. Are o plasticitate ecologică mare, nu are cerințe deosebite față de factorii climaterici. Se utilizează pentru proprietățile sale febrifuge, în medicină – pentru scăderea febrei, deține proprietăți culinare dar și decorative ori de purificare a aerului.

**Cuvinte-cheie:** plantă, ulei volatil, componenți, cromatografie, compuși antioxidanți.

### THE COMPLEX STUDY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE SPECIES *PEROVSCHIA ATRIPLICIFOLIA* BENTH.

The paper presents the results of a vast study on the biology, chemical composition and qualitative phytochemistry of the essential oil of the species *Perovskia atriplicifolia*, which behaves like a perennial, herbaceous plant in the Lamiaceae family. In the Republic of Moldova, it has not been investigated as an aromatic and medicinal plant. It has a high ecological plasticity and no special requirements to climatic factors. It has febrifuge properties and is used in medicine to reduce fever. Besides, this plant is used for culinary, ornamental purposes and for air purification.

**Keywords:** plant, essential oil, components, chromatography, antioxidant compounds.

### Introducere

Genul *Perovskia* sp. este un gen de plante cu flori din familia *Lamiaceae*, membrii căruia sunt originari din Asia de Sud-Vest și Centrală. Acesta cuprinde nouă specii, printre care și specia denumită popular salvie rusească (*Perovskia atriplicifolia*). Materialul semincier a fost primit din Rusia. Plantele au fost cultivate pe teren deschis, în condiții ecologic echilibrate, pe fon agrotehnic general, fără folosirea îngrășămintelor. În Grădina Botanică a fost obținută din semințe recepționate prin schimbul internațional de semințe în anul 2006, în vederea: evidențierii particularităților de dezvoltare și a conținutului de ulei volatil, stabilirii procedurilor de înmulțire, selectării unor forme de plante cu o productivitate superioară de herbă și ulei volatil, elaborării procedurilor primare de creștere și cultivare, cercetării compoziției chimice a uleiului volatil, experimentării mostrelor de herbă și ulei volatil în industria de parfumuri și cosmetică, precum și în medicină.

### Material și metode

Uleiul volatil a fost izolat prin distilare cu vapori din părțile aeriene ale plantei și prin metoda extracției în fluide supercritice (SFE). Analiza fitochimică calitativă și cantitativă a plantelor a fost efectuată pentru a determina compușii antioxidanți de tip polifenoli și flavonoide. Pentru obținerea uleiului volatil au fost utilizate 50 grame de material vegetal uscat, care a fost hidrodistilat (metoda Neo-Clevenger) obținându-se un volum de 1,5 ml/100 g. Uleiul obținut a fost supus metodei gaz-cromatografice. Compoziția chimică a uleiului volatil a fost stabilită prin analiza gaz-cromatografică cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS) cu ajutorul cromatografului de gaze Agilent Technologies tip 6890N cuplat cu detectorul de masă (MSD) tip 5975 inert XL Mass Selective Detector.

### Rezultate și discuții

Rezultatele experimentale ale studiului efectuat au dovedit că specia *Perovskia atriplicifolia* se comportă ca plantă perenă, dezvoltă o tufă din 17-18 tulpini de culoare albicioasă și frunze lobate, adânc dințate de culoare gri-argintată cu o lungime de 5 cm și o lățime de 2,5 cm. Tulpinile mature sunt lemnoase la bază, iar cele tinere sunt ierboase. Tulpina este pătratică în secțiune transversală. Tulpinile și frunzele emană prin strivire

un miros specific de salvie. Inflorescențele pot atinge o lungime de 30 cm și rezistă până la 3 luni. Planta formează o tufă, care în condițiile ei naturale atinge o înălțime de 1,5 m și o circumferință de 60 cm, în condițiile noastre – 80-90 cm înălțime. Este o plantă mai puțin capricioasă față de condițiile de creștere și dezvoltare. Preferă soluri alcaline, nicidecum acide și înmlăștinite. Rezistă bine la temperaturi scăzute, precum și la cele ridicate. Reacționează favorabil la un regim bogat în precipitații. Este o specie iubitoare de lumină. Primăvara devreme, ramurile anului trecut se taie la înălțimea 5-10 cm de la pământ. Plantele perene pornesc în vegetație la începutul lui aprilie. Creșterea și dezvoltarea plantelor este intensivă până în faza de butonizare. Tulpinile generative dezvoltă 12-15 ramuri de ordinul II. Primele flori pe axul central apar la începutul lui iulie. Faza de înflorire este de lungă durată, uneori până la începutul lunii octombrie, fapt ce oferă posibilitatea de a include specia în amenajarea spațiilor verzi de tip curativ-profilactic și decorativ. Se înmulțește generativ și vegetativ. Vegetativ prin butași detașați vara de la ramurile verzi sau puțin lignificate. Sunt plante rezistente la boli și dăunători. Plantele de *Perovskia atriplicifolia* Benth. acumulează ulei volatil pe parcursul deplinei perioade de vegetație în toate organele supraterestre. Conținutul de ulei volatil variază în funcție de faza de dezvoltare a plantelor și organul lor. S-a constatat că conținutul de ulei volatil în faza de înflorire în masă se notează la 0,54% în herba proaspătă.

**Compoziție chimică.** A fost analizat uleiul volatil, izolat prin distilare cu vapori din părțile aeriene ale plantei *Perovskia atriplicifolia* Benth. Dintre cei 39 de compuși identificați, componentele majore au fost 1,8-cineol și limonen (40,13%),  $\alpha$ -pinen (17,87%),  $\delta$ -3-carenă (9,13%),  $\beta$ -pinen (6,59%), camfen (6,17%) și camfor (5,36%). Într-un alt studiu efectuat asupra speciei *Perovskia atriplicifolia* Benth. au fost comparate rezultatele obținute prin metoda extracției în fluide supercritice (SFE) cu cele obținute în urma distilării cu vapori. A fost investigat efectul diferiților parametri, cum ar fi presiunea, temperatura, tipul de solvent și volumul solventului asupra randamentului de extracție a uleiului esențial. Extractele obținute prin cele două metode au avut compoziții foarte diferite. Principalii constituenți ai uleiului obținut prin distilare cu vapori au fost: 1,8-cineol, limonen, camfor,  $\beta$ -cariofilen,  $\alpha$ -pinen, camfen și  $\alpha$ -humulen. Pe de altă parte, componentele majore ale extractelor SFE au fost: 1,8-cineol, limonen, camfor,  $\beta$ -cariofilen,  $\gamma$ -cadinen,  $\alpha$ -pinen și acetat de  $\alpha$ -terpinil. Rezultatele au arătat că o creștere a temperaturii de la 35°C la 65°C (la o presiune constantă de 100 atm.) a redus drastic numărul de componente extrase. De asemenea, numărul de constituenți extrași și procentul de analiți principali au crescut atunci când au fost folosite presiuni mai mici. Utilizarea diferiților solvenți (de ex., metanol, etanol, diclormetan și hexan) pentru extragerea uleiului esențial la presiune scăzută (100 atm) și la o temperatură de 35°C a arătat că hexanul a fost mai selectiv decât ceilalți solvenți (Pourmortazavi *et al.*, 2003).

La *Perovskia atriplicifolia* Benth. colectată din Pakistan componentele volatile izolate au fost în număr de 19. Dintre acestea, monoterpenele  $\delta$ 3-carenă (22,3%) și 1,8-cineol (27,5%) reprezintă cca 50% din totalul uleiului, iar  $\beta$ -cariofilenul (10,8%) și  $\alpha$ -humulenul (5,7%) au fost sesquiterpenele dominante (Jassbi *et al.*, 1999).

Analiza fitochimică calitativă și cantitativă a plantelor de *Perovskia atriplicifolia*, cercetate și cultivate în colecția Laboratorului Resurse vegetale, a fost efectuată în scopul de a determina compușii antioxidanți de tip polifenoli și flavonoide, în mod special pentru analiza uleiului volatil.

Rezultatele obținute au evidențiat capacitatea biosintetică a plantei pentru compușii mai sus menționați. Analiza a fost efectuată prin cromatografie pe strat subțire (CCS), cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) și prin analiza gaz-cromatografie cuplată cu spectroscopie de masă (GC-MS).

Au fost analizate două tipuri de extracte: metanolice și etanolice obținute din material vegetal uscat. Pentru extracte au fost folosite 2,5 grame, care au fost extrase de 3 ori cu câte 30 ml alcool metanolic și etanolic, iar extractul s-a adus la cantitatea de 100 ml. Aceste extracte au fost analizate fitochimic.

Pentru obținerea uleiului volatil au fost utilizate 50 grame de material vegetal uscat, care a fost hidrodistilat (prin metoda Neo-Clevenger), obținându-se un volum de 1,5 ml/100g. Uleiul obținut a fost supus metodei gaz-cromatografice.

Analiza HPLC-UV constă în separarea pe un cromatograf de lichide cu înaltă performanță, tip Agilent 1200, prevăzut cu o coloană de fază inversă Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) și detector UV-Vis cu multidiode. Separarea s-a efectuat folosind o fază mobilă formată din acetonitril și acetat de sodiu 2 mM (ajustat la pH = 3,5 cu acid acetic glacial).

Gradientul de concentrație utilizat este următorul:

Timp (minute)	% CH <sub>3</sub> COONa 2 mM (pH=3,5)	% CH <sub>3</sub> CN
0	98	2
20	86	14
40	80	20
50	70	30
60	75	25
65	98	2
70	98	2

Deteția s-a realizat în UV, la mai multe lungimi de undă (220, 240, 260, 280, 300, 320, 350, 370 nm). Pentru identificarea picurilor, au fost comparate atât valorile timpului de retenție din cromatograma probei cu cele ale etaloanelor, cât și spectrele de absorbție pentru picurile obținute cu cele ale etaloanelor analizate în ambele cazuri în aceleași condiții cromatografice. Astfel, după optimizarea condițiilor de lucru cromatografice în vederea separării, au fost injectate soluții etalon de acid galic, acid clorogenic, acid cafeic, acid salicilic, acid ferulic, acid *p*-cumarinic, acid *o*-cumarinic, acid rozmarinic, acid cinamic, rutozidă (cvercetin-3-O-rutinozidă), hiperozidă (cvercetin-3-O-galactozidă), luteolină, luteolin-7-glucozidă, apigenol, apigenin-7-glucozidă, cvercitol. Pentru aceste etaloane s-a înregistrat spectrul de absorbție în UV, spectrul fiind salvat în biblioteca de spectre. Acesta a fost utilizat în continuare pentru identificarea compușilor din diverse probe.

În Figura 1 sunt prezentate cromatogramele obținute pentru aceste etaloane, la o lungime de undă de detecție de 320 nm.

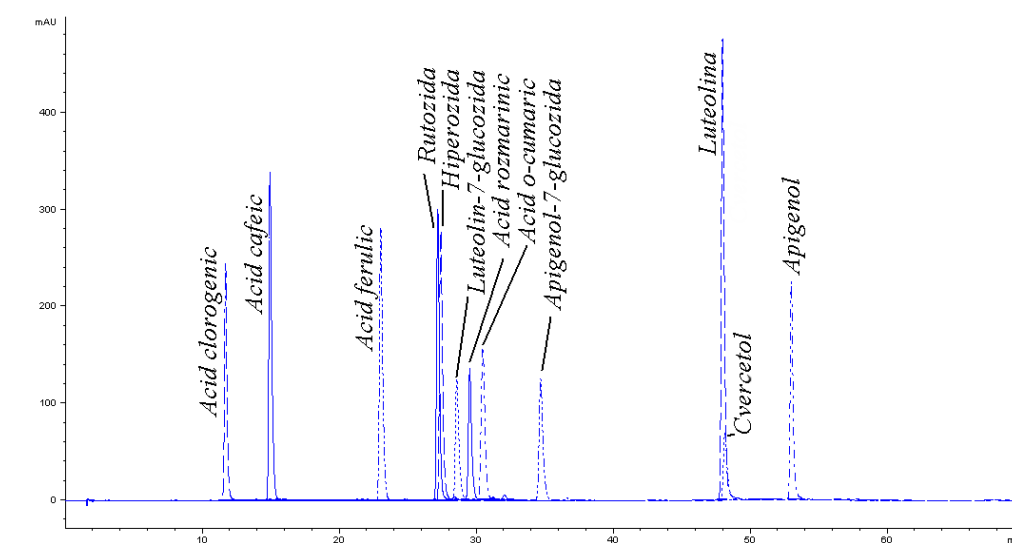


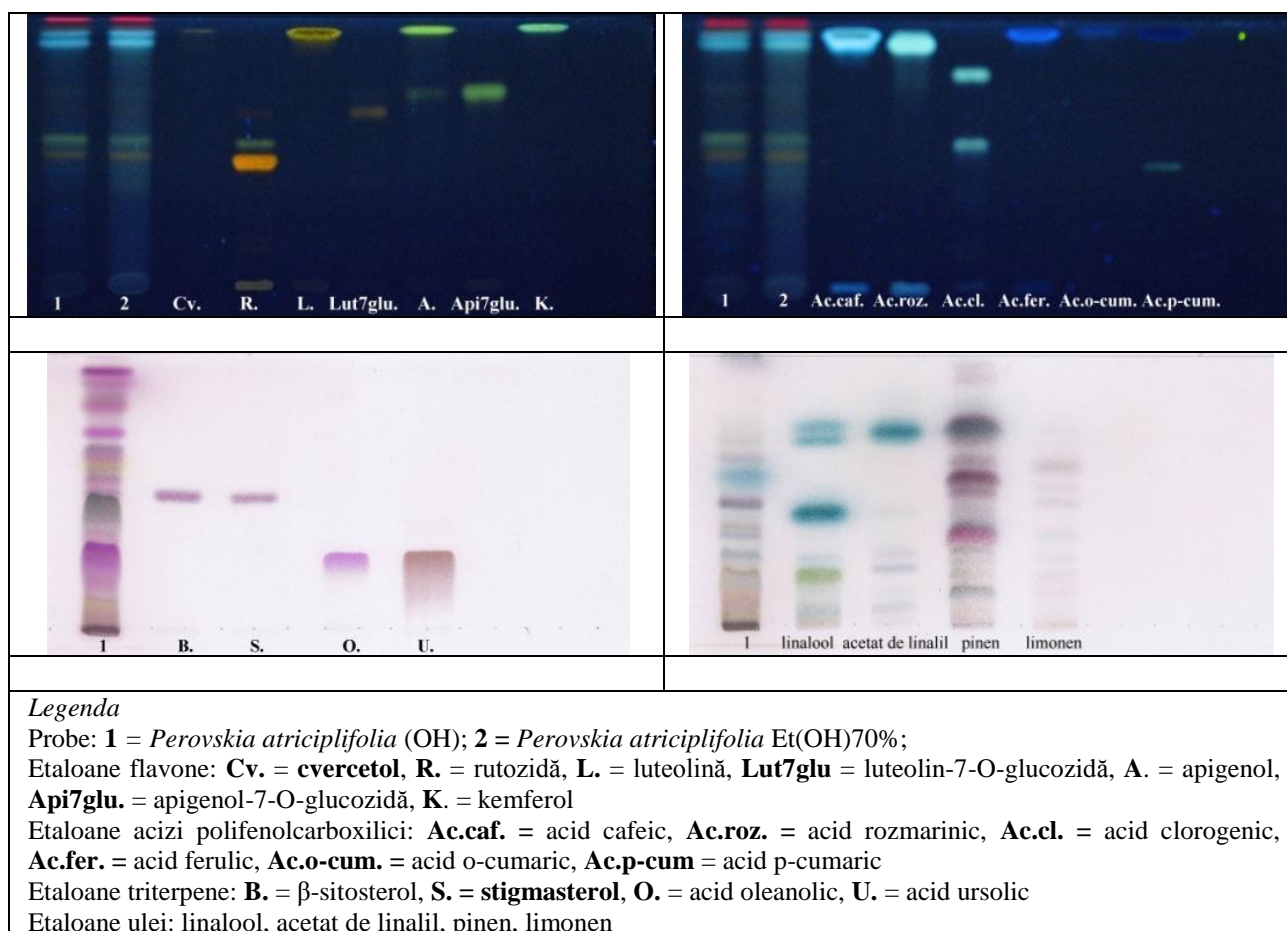
Fig.1. Cromatogramele substanțelor etalon.

Pentru analiza antioxidantilor din probe, s-a procedat astfel. Extractele alcoolice au fost analizate prin HPLC în aceleași condiții. Cromatogramele obținute au fost integrate. Prin compararea valorilor timpului de retenție relativ la etaloane, dar și prin comparare spectrală, s-a pus în evidență prezența / absența substanțelor urmărite din probele analizate.

Compoziția chimică a uleiului volatil a fost stabilită prin analiza gaz-cromatografică, cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS) cu ajutorul cromatografului de gaze Agilent Technologies, tip 6890N, cuplat cu detectorul de masă (MSD), tip 5975 inert XL Mass Selective Detector.

Condițiile de cromatografie Coloana HP 5MS dim. ext. 30 m x 0,25 mm – dim.int. 0,25 μm (5% Phenyl-methylsiloxane); Faza mobilă: Helium – debit: 1 mL/min; Temperatura injector: 250°C; Temperatura detector: 250°C; Regim de temperatură: de la 40°C inițial (10 grade/min.) până la 280°C (constant 5,5 min); Volum injectat: 0,1-0,3 μl; Rata de splitare – 1:100.

## Analiza fitochimică calitativă prin CSS



Aspectul cromatogramelor evidențiază, în conformitate cu etalonale, flavonoidele de tip rutozid (**R.**) cvercetol (**Cv.**) polifenolii, în special acizii polifenolcarboxilici, cum sunt acidul rozmarinic (**Ac.roz.**), acidul cafeic (**Ac.caf.**), acidul ferulic (**Ac.fer.**).

Pentru triterpenele și fitosterolii conținuți în extractele diclormetanice, etaloanele au identificat prezența beta-sitosterolului (**B.**), acidului oleanolic (**O.**) și acidului ursolic (**U.**).

## Analiza fitochimică cantitativă prin spectrofotometrie

Specie/ Tip de extract	Polifenoli totali		Acizi polifenolcarb.	
	acid galic	acid rozmarinic	luteolină	rutozidă
	g/100g su	g/100g su	g/100g su	g/100g su
<b>Perovskia MeOH</b>	1,294	1,085	0,277	<b>0,561</b>
<b>Perovskia Eth</b>	<b>2,986</b>	<b>2,343</b>	<b>0,548</b>	<b>0,889</b>

Cantitatea de compuși cu acțiune antioxidantă de tip polifenolic și flavonoidic este mai mare în extractele etanolice, astfel că acidul galic este în concentrație de 2,986 g/100g su, iar acidul rozmarinic – de 2,343 g/100g su. În cazul flavonoidelor rutozida (0,889g/100g su) are valori mai ridicate comparativ cu luteolina (0,548 g/100g su).

**Analiza uleiului volatil prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS).** Uleiul volatil analizat se caracterizează prin prezența a 28 de compuși (*A se vedea* Tabelul) care au aria peste 0,5%. Ceilalți au fost detectați cu valori foarte mici, iar suma acestora se regăsește în tabel la alți compuși. Compușii identificați cu valorile cele mai mari sunt: **D-limonen** – 21,47%, **eucaliptol** – 16,19%,  **$\alpha$ -pinen** – 8,17%, **cariofilenii** ( $\alpha$  și  $\beta$ ) – 11,91%, borneol și acetat de bornil – 4,34%, respectiv 6,06%.

Tabel

Compuși identificați prin GC-MS din uleiul volatil de *Perovskia atriplicifolia* Benth.

Nr. crt.	Kovats Index	Retention Time	Compound	Area, %
1	914	5,16	$\alpha$ -Thujene	0,20
2	923	5,29	<b><math>\alpha</math>-Pinene</b>	<b>8,17</b>
3	939	5,51	Camphene	3,87
4	969	5,94	$\beta$ -Pinene	3,93
5	980	6,09	$\beta$ -Myrcene	0,98
6	1011	6,53	$\Delta$ -3-carene	0,23
7	1020	6,66	<i>p</i> -Cymene	0,89
8	1028	6,76	<b>D-Limonene</b>	<b>21,47</b>
9	1031	6,80	<b>Eucalyptol</b>	<b>16,19</b>
10	1043	6,98	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimene	0,23
11	1057	7,17	$\gamma$ -Terpinen	0,55
12	1099	7,76	Linalool	0,53
13	1146	8,41	Sabinol	0,56
14	1176	8,84	<b>Borneol</b>	<b>4,34</b>
15	1187	8,99	4-Terpineol	0,51
16	1200	9,18	alfa-Terpineol	0,54
17	1299	10,56	<b>Bornyl acetate</b>	<b>6,06</b>
18	1360	11,41	$\alpha$ -Terpinyl acetate	3,08
19	1434	12,46	<b><math>\beta</math>-Caryophyllene</b>	<b>6,20</b>
20	1466	12,91	<b><math>\alpha</math>-Caryophyllene</b>	<b>5,71</b>
21	1490	13,24	Germacrene D	0,36
22	1519	13,65	$\tau$ -Cadinene	0,91
23	1527	13,76	Calamenene / Cadina-1,3,5-triene	0,22
24	1586	14,59	Caryophyllene oxide	3,43
25	1599	14,77	$\alpha$ -Bisabolene epoxide	0,20
26	1612	14,95	Cubebol	0,64
27	1637	15,30	$\tau$ -Cadinol	3,77
28	1648	15,45	$\alpha$ -Eudesmol	1,24
			<i>Alți compuși</i>	4,99

### Concluzii

Studiile efectuate sunt în concordanță cu rezultatele obținute de C.Paduraru în teza de doctorat (2012), de Grădina Botanică de la Iași (proiectul din programul IDEI Cod CNCSIS 2100, Tema 1040/2009).

De asemenea, rezultatele obținute corespund cu cele din literatura de specialitate. Totuși, apar unele diferențe. Astfel, I.Burzo și C.Toma (2012) au analizat prin GC-MS uleiul volatil extras din frunzele și florile plantelor de *Perovskia atriplicifolia* Benth.; am constatat că fracțiunile volatile corespund cu cele analizate de noi (cu excepția camforului), dar ponderea cantitativă este diferită. În frunze predomină camfor și limonen, iar în flori –  $\tau$ -cadinol,  $\alpha$ -pinen și limonen. După I.Burzo și C.Toma (2012), compoziția uleiului volatil extras din frunze are următoarele valori: camfor – 15,16%, limonen – 13,77%,  $\tau$ -cadinol – 10,13%, eucaliptol – 9,03%,  $\beta$ -cariofilen – 6,20%,  $\alpha$ -cariofilen – 5,71%,  $\delta$ -3-carene – 5,65%,  $\alpha$ -pinen – 4%,  $\alpha$ -terpenil acetat – 3,45%, camfen – 3,4%, borneol – 2,56%, cubebol – 2,22%,  $\beta$ -pinen – 2,05%, bornil acetat – 1,95%,  $\gamma$ -cadinen – 1,5%,

$\alpha$ -eudesmol 0,73%, mircen – 0,62%,  $\alpha$ -terpineol – 0,5%, terpinolen – 0,41%,  $\delta$ -cadinol – 0,34%,  $\gamma$ -terpinen – 0,23%, precum și alți compuși în concentrații mici.

Cercetatorii iranieni, Pourmortazavi și colab. (2003), au analizat prin GC-MS uleiuri volatile din herba de *Perovskia atriplicifolia* Benth. Aceștia au utilizat două metode de obținere a uleiurilor, și anume: distilarea cu vapori de apă și extracția cu fluid supercritic (SFE). Prin metoda clasică – distilarea cu vapori de apă – uleiul volatil conține: eucaliptol, limonen, camfor,  $\beta$ -cariofilen,  $\alpha$ -pinen, camfen și  $\alpha$ -humulen. Prin metoda modernă – extracția cu fluid supercritic – uleiul volatil obținut din plantele de *Perovskia atriplicifolia* de proveniență iraniană conține: eucaliptol, limonen, camfor,  $\beta$ -cariofilen,  $\gamma$ -cadinen,  $\alpha$ -pinen și  $\alpha$ -terpenil acetat. Totodată, în uleiul volatil din plante de salvie rusească de proveniență iraniană, F.Sefldkon și colab. (1997) au identificat 39 de compuși, dintre care fracțiuni volatile dominante sunt: eucaliptol-limonen (40,13%),  $\alpha$ -pinen (17,87%),  $\delta$ -3-caren (9,13%),  $\beta$ -pinen (6,59%), camfen (6,17%) și camfor (5,36%).

Compușii prezenți (în special cei dominanți: limonen, eucaliptol,  $\alpha$ -pinen,  $\alpha,\beta$ -cariofilenii) atribuie uleiului volatil de salvie rusească un șir de proprietăți biologice, și anume: antibacteriene, antivirale, antiinflamatorii și antitumorale [James A. Duke, 1992].

#### Referințe:

1. BURZO, I., TOMA, C. *Țesături secretoare și substanțele volatile din plante*. Iași: Edit. Univ. „Al.I. Cuza”, 2012.
2. POURMORTAZAVI, SEIED MAHDI, FATEMEH SEFIDKOM, SEIED GHORBAN HOSSEINI. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Essential Oils from *Perovskia Atriplicifolia* Benth. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, no.51, p.5414-5419.
3. SEFLDKOM, F., AHMADL, L., MIRZA, M. Volatile Components of *Perovskia Atriplicifolia* Benth. In: *Journal of Essential Oil Research*, 1997, no.9, p.101-103.
4. PĂDURARIU, M.C. “*Studii privind complexul filsoferic la taxoni ai genurilor Ocimum și Perovskia*, Familia Lamiaceae”: Teză de doctorat, Univ. “Al.I.Cuza”, Facultatea de Biologie, susținută public la 22.03.2013.
5. JASSBI, A.R., AHMAD, V.U., TAREEN, R.B. Constituents of the essential oil of *Perovskia atriplicifolia* Benth. In: *Flavour and Fragrance Journal*, 1999, no.14. p.38-40.
6. BASHER, K.H.C., OZEK, T., DEMIRCHAKMAK, B., ABDUGANIEV, B.Y., NURIDDINOV, K.R., ARIPOV, K.N., DORIEV, A.S., KARATAEVA, C.S. Essential oil of *Perovskia angustifolia* from Kyrgyzstan. In: *Chemistry of Natural Compounds*, 1997, no.33, p.296-298.
7. DUKE A. JAMES. *Biologically Active Phytochemicals and Their Activities Database*. Taylor & Francis Group, 1992.

Prezentat la 08.05.2017