

Wykorzystanie składników ekstraktu z liści orzecha włoskiego *Juglans regia* L do zwalczania grzybów z gatunku *Ascosphaera apis*

Sylwia GARBACZEWSKA* – Zakład Syntezy i Technologii Substancji Aktywnych, Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa; Anna CIENIECKA-ROŚLONKIEWICZ, Alicja MICHALCZYK – Zakład Stosowania i Formulacji Pesticydów, Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa; Anna KIEŁCZEWSKA – Zakład Analityczny, Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2014, 68, 2, 117–122

Wstęp

Orzech włoski (*Juglans regia* L.) jest gatunkiem drzewa liściastego z rodziny orzechowatych. Jego liście, łupiny, kora, owoce wykorzystywane są jako surowiec zielarski. W literaturze opisano przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze właściwości ekstraktów z owoców orzecha [1]. Istnieją również doniesienia o antyoksydacyjnych [2, 3] i owadobójczych [4] właściwościach ekstraktów z zielonych łupin orzecha. Badano również właściwości ekstraktów z liści orzecha przeciwko roztoczom z gatunku *Varroa destructor* [5, 6].

W liściach, łupinach i korzeniach orzechów (*Juglans* L) występuje substancja aktywna – juglon (5-hydroksy-1,4-naftochinon). Jest jednym z silniejszych występujących w przyrodzie fitotoksycznych allelopatyków [7, 8] hamujących wzrost i rozwój wielu roślin. Stwierdzono również, że juglon wpływa na śmiertelność motyla szkodnika *Grapholita molesta* [9].

Autorzy pracy badali wpływ ekstraktu z liści orzecha włoskiego i otrzymanych w wyniku jego chromatograficznego rozdzielania frakcji na wzrost grzybów z gatunku *Ascosphaera apis* wywołujące u pszczoł grzybicę wapienną (otorbielakową). Obserwowano liniowy wzrost grzybni w warunkach *in vitro* na podłożu agarowym. Metodą GC-MS i DI-MS zidentyfikowano związki najbardziej aktywnej frakcji. Zbadano przeciwgrzybicze właściwości juglonu, eugenolu i δ -tokoferolu, których obecność stwierdzono w badanej frakcji.

Materiał i metody badań

Ekstrakt z liści orzecha włoskiego

Liście orzecha włoskiego zebrano w czerwcu w okolicach Warszawy. Świeże, pocięte liście podzielono na porcje i przechowywano w zamrażarce w temp. -5°C . Każdą porcję, ok. 30 g umieszczano jednorazowo w aparacie Soxhleta i ekstrahowano trzykrotnie 150 ml metanolu przez 2 godziny (w sumie 6 h porcję 30 g liści). Otrzymane roztwory ekstraktu połączono, a następnie zateżono na wyparce próżniowej. Z 2 kg świeżych (zamrożonych) liści otrzymano 140 g smolisteo osadu, który następnie rozpuszczono w 2 l chlorku metylenu. Rozpuszczalną część przesączono przez sączek, przesącz zateżono. Otrzymano 8 g ekstraktu.

Ekstrakt I (5 g) rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej w kolumnie szklanej na żelu krzemionkowym. Eluent stanowił chlorek metylenu i octan etylu w wzrastającym stężeniu tego ostatniego (od 50:1 do 1:20). Wykonano analizę TLC otrzymanych frakcji w układzie heksan: chlorek metylenu : acetonitryl 5:3:1. Wzorec juglonu наносono na każdą płytkę.

Testy biologiczne z wykorzystaniem grzybów z gatunku *A. apis*

Zbadano wpływ ekstraktu I i kilku frakcji otrzymanych w wyniku jego chromatograficznego rozdzielania, a także wzorców juglonu, eugenolu i δ -tokoferolu na wzrost grzybni *A. apis* w warunkach

in vitro na podłożu agarowym. Acetonowe roztwory badanych substancji o określonych stężeniach наносono w ilości 1 ml na powierzchnię zestalonej agarem pożywkę Sabourauda w płytkach Petriego, a następnie równomiernie rozprowadzano i pozostawiano w warunkach aseptycznych do odparowania acetonu. W tak przygotowanych płytkach umieszczano krążki grzybni (\varnothing 5 mm) wycięte korkoborem z homogennej kultury grzyba *Ascosphaera apis*. Kontrolę negatywną stanowiły płytki, w których na powierzchnię agaru наносono aceton, a po odparowaniu rozpuszczalnika inokulowano krążki grzybni. Płytki inkubowano w temp. 25°C przez 5 dni. Po tym czasie zmierzono średnicę wyrosłej grzybni i porównano z wartościami kontrolnymi. Skuteczność działania związków obliczono za pomocą wzoru Abbota:

$$S_g = \frac{(K_g - F_g)}{K_g} \cdot 100\%$$

gdzie:

S_g – skuteczność

K_g – średnica grzybni w kontroli (średnia z pomiarów)

F_g – średnica grzybni w kombinacji z badanym związkiem (średnie z pomiarów).

Analiza chemiczna

Składniki aktywnej frakcji były analizowane przy użyciu spektrometru masowego (GC/MS) Agilent 5975 B. Warunki analizy GC były następujące: kolumna chromatograficzna HP-5MS (30 m x 0,25 mm, film 0,25 μm), przepływ helu 1 ml/min, wprowadzona próbka wynosiła 0,2 μl . Zastosowano program temperatury: 50°C (3 min) \nearrow 240°C ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$), temperatura dozownika 240°C . Warunki MS: jonizacja elektronów (70 eV), temperatura źródła jonów 250°C . Próbkę rozpuszczano w octanie etylu. Identyfikację juglonu oparto na wzorcu. Widma masowe porównywano z bazą widm NIST Database.

Związki, które wykryły się w roztworze octanu etylu aktywnej frakcji analizowano za pomocą spektroskopu Agilent 5975 B MSD z przystawką do bezpośredniego wprowadzenia (DI) Probe HPP7, Scientific Instrument Services.

Widma absorpcyjne w podczerwieni wykonano za pomocą spektrometru FT/IR-420 metodą tabletki KBr (0,46 mg próbki i 270 mg \pm 5 mg KBr)

Substancje do analizy

Wzorce juglonu 97%, eugenolu 99% i δ -tokoferolu $>90\%$ zakupiono w Sigma-Aldrich, żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej 0,063–0,200 mm w Agros Organics, płytki TLC aluminiowe Silica gel 60 F₂₅₄ w Merck, rozpuszczalniki w POCh.

Wyniki

Otrzymano w aparacie Soxhleta ekstrakt z liści orzecha włoskiego *Juglans regia* L i otrzymane w wyniku jego chromatograficznego roz-

Autor do korespondencji:

Mgr. Sylwia Garbaczewska, e-mail: garbaczewska@ipo.waw.pl

działu frakcje poddano badaniom aktywności biologicznej w stężeniu 10 000 mg/l przeciwko grzybom z gatunku *Ascosphaera apis*. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabelcy 1.

Tabelca 1

Działanie ekstraktu z liści orzecha i otrzymanych w wyniku jego chromatografii frakcji (O) w stężeniu 10 000 mg/l na grzyby z gatunku *Ascosphaera apis*

Numer frakcji	Hamowanie rozwoju <i>A. apis</i> , %
Ekstrakt I z liści orzecha	45
O-1	70
O-2	80
O-3	60
O-4	78
O-5	72
O-6	70
O-7	16
O-8	32
O-9	20

Następnie wybrano najbardziej aktywną frakcję (O-2) powodującą hamowanie rozwoju *A. apis* w 80% i zidentyfikowano metodą GC-MS obecne w niej związki (Tab. 2).

Tabelca 2

Identyfikacja związków obecnych w frakcji O-2 metodą GC-MS

Nr	Związek (numer CAS)	Zawartość procentowa %	Czas retencji min	Masa molowa	Jon molekularny m/z	Prawdopodobieństwo MF/ RMF	Wzór sumaryczny
1	Eugenol (97-53-0)	4,7	13,837	164,20	164	945/946	C ₁₀ H ₁₂ O ₂
2	β-Kariofilen (87-44-5)	0,3	14,776	204,36	-	857/936	C ₁₅ H ₂₄
3	Juglon (481-39-0)	0,3	15,841	174,15	174	-	C ₁₀ H ₆ O ₃
4	δ-Kadinen (483-76-1)	0,7	16,028	204,39	204	880/880	C ₁₅ H ₂₄
5	Guaiol (489-86-1)	1,4	16,872	222,37	-	837/837	C ₁₅ H ₂₆ O
6	Hinesol (23811-08-7)	0,6	17,460	222,37	-	861/870	C ₁₅ H ₂₆ O
7	β-Eudesmol (473-15-4)	4,8	17,608	222,37	222	918/922	C ₁₅ H ₂₆ O
8	Fitol (150-86-7)	7,9	22,110	296,53	-	928/941	C ₂₀ H ₄₀ O
9	1-Dokosanol (661-19-8)	6,7	32,451	326,60	-	920/920	C ₂₁ H ₄₆ O
10	1-Tetrakosanol (506-51-4)	14,0	41,577	354,65	-	919/920	C ₂₄ H ₅₀ O
11	δ-Tokoferol (119-13-1)	58,6	44,129	402,65	402	885/887	C ₂₇ H ₄₆ O ₂

Z roztworu octanu etylu frakcji O-2 wykrystalizował w postaci białego proszku osad. Został on oddzielony i poddany analizie DI-MS (Tab. 3) i IR (Tab. 4).

Tabelca 3

Związki wykrystalizowane z roztworu frakcji O-2 zidentyfikowane metodą DI-MS

Nr	Związek(numer CAS)	Masa molowa	Prawdopodobieństwo MF/ RMF	Wzór sumaryczny
12	1-Heksakosanol (506-52-5)	382,71	877/883	C ₂₆ H ₅₄ O
13	1-Oktakosanol (557-61-9)	410,76	913/913	C ₂₈ H ₅₈ O

Analiza IR związku 12 i 13 (Tabela 4) potwierdza strukturę alifatycznych polikosanoli.

Tabelca 4

Analiza IR związków 12 i 13

Długość fali, cm ⁻¹	Charakterystyczne pasma absorpcyjne
3423	O-H (hydroksyl)
2917, 2849	alifatyczne C-H asymetryczne i symetryczne (grupy metylenowe)
1050	C-O (alkohol)

W oparciu o tabelę 2 wybrano trzy związki obecne we frakcji O-2. Juglon, występujący w ilości 0,3%, jest substancją aktywną obecną w różnych częściach orzecha. Tokoferol wybrano ze względu na jego znaczną zawartość (58,6%) w badanej frakcji O-2. Eugenol (4,7% w O-2) jest związkiem o właściwościach aseptycznych opisanych w literaturze [10]. Działanie ich na wzrost *A. apis* przedstawiono w Tabelcy 5. Wyznaczono także minimalne stężenie hamujące (MIC) juglonu i eugenolu.

Tabelca 5

Działanie hamujące wzrost grzybni *Ascosphaera apis* wybranych wzorców związków obecnych w najbardziej aktywnej frakcji O-2

Nazwa wzorców	Stężenie mg/l	Hamowanie wzrostu grzybni %	MIC mg/l
Juglon	20 000	100	2 500
	10 000	100	
	2 500	100	
Eugenol	20 000	100	10 000
	10 000	100	
δ-Tokoferol	20 000	Brak hamowania wzrostu	-
	10 000		

Wnioski

Grzybica wapienna jest powszechną chorobą czerwiu. Przeżywalność zarodników grzyba jest szacowana na 15 lat, a działanie środków farmakologicznych jest krótkotrwałe. Rozprzestrzenianie odpornych na fungicydy szczepów grzybów i zapobieganie skażeniu produktów pszczelich związkami chemicznymi, skłania do poszukiwania alternatywnych źródeł związków o charakterze grzybobójczym, w szczególności wśród związków pochodzenia naturalnego.

W literaturze znane jest stosowanie do zwalczania grzybicy wapiennej różnych olejków eterycznych, np. rozmarynowego, lawendowego, bazylikowego, eukaliptusowego i innych [11].

Badanie miało na celu stwierdzenie, czy ekstrakt z liści orzecha włoskiego, i otrzymane w wyniku jego chromatograficznego rozdzielania frakcje, wykazują wpływ na liniowy wzrost grzybni *A. apis* w warunkach *in vitro* na podłożu agarowym. Stwierdzono, że frakcja O-2 hamuje w 80% wzrost grzyba. Autorzy pracy próbowali znaleźć odpowiedź, który spośród zidentyfikowanych metodą GC-MS i DI-MS związków w największym stopniu wpływa na jej aktywność. Trudno to stwierdzić jednoznacznie, ponieważ juglon, którego MIC wynosi

2500 mg/l, stanowi zaledwie 0,3% zawartości. Eugenol, którego jest kilkanaście razy więcej niż juglonu, tzn. 4,7% wykazuje czterokrotnie niższą wartość MIC niż juglon. W aktywnej frakcji występują również inne związki o niezbadanej grzybobójczej aktywności: polikosanole, fitol, β -eudesmol, guaiol i w ilości mniejszej niż 1% δ -kadinen, hinesol, β -kariofilen. Wiadomo natomiast, że δ -tokoferol, którego we frakcji O-2 jest najwięcej (58,6 % metodą GC-MS) nie wykazuje hamowania wzrostu *A. apis*.

Literatura

- Pereira, J. A.; Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira I. C. F. R., Bento, A., & Estevinho, L.: *Bioactive properties and chemical composition of six walnut (Juglas regia L) cultivars*. Food and Chemical Toxicology 2008, **46**, 2103-2111.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L. & Pereira, J. A.: *Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglas regia L) green husky*. Food and Chemical Toxicology 2008, **46**, 2326-2331.
- Fernández-Agulló A., Pereirab E., Freireira M.S., Valentão P., Andradec P.B., González-Álvarez J. & Pereirab J.A.: *Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (Juglas regia L.) green husk extracts*. Industrial Crops and Products 2013, **42**, 126-132.
- Sun, M., Wang, Y., Song, Z. & Fang, G.: *Insecticidal activities and active components of the alcohol extract from green peel of Juglas mandshuric*. Journal of Forestry Research 2007, **18**, 62-64.
- Garbaczewska S., Kazmierczak J., Łysik A. & Londzin W.: *Ecological mite control agents, particularly against Varroa destructor*. Pesticides, 2010, **1-4**, 73-77.
- PL 213070 Zastosowanie izolatu z orzecha włoskiego.
- Tomaszkiewicz-Potępa, A. & Vogt, O.: *Juglone, Biological Activity of Juglon*. Wiadomości Chemiczne 2004, **58**, 881-894.
- Hejl, A. M. & Koster, K. L.: *Juglone Disrupts Root Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity and Impairs Water Uptake, Root Respiration, and Growth in Soybean (Glycine max) and Corn (Zea mays)*. Journal of Chemical Ecology 2004, **30**, 453 - 471.
- Piskorski R., Ineichen S. & Dorn S.: *Ability of the Oriental Fruit Moth Grapholita molesta (Lepidoptera: Tortricidae) to Detoxify Juglone, the Main Secondary Metabolite of the Non-host Plant Walnut*, Journal of Chemical Ecology 2011, **37**, 1110-1116.
- Eugenol, PubChem Public Chemical Database.
- Larrán S., Ringuelet J. A., Carranza M. R., Henning C. P., Ré M. S., Cerimele E. L. & Urrutia M. I.: *In Vitro Fungistatic Effect of Essential Oils Against Ascosphaera apis*, Journal of Essential Oil Research 2001, **13** (2), 122-124.

* Mgr. Sylwia GARBACZEWSKA – ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracuje w Instytucie Przemysłu Organicznego w Zakładzie Syntezy i Technologii Substancji Aktywnych. Zajmuje się ekstrakcją substancji aktywnych z materiału roślinnego i ich rozdzielaniem za pomocą półpreparatywnego HPLC. Zainteresowania naukowe: wykorzystanie substancji pochodzenia naturalnego w zwalczaniu patogenów roślinnych, chorób pszczoł i insektów. Jest autorką kilku publikacji i współautorką 3. patentów.
e-mail: garbaczewska@ipo.waw.pl, tel. 228111231 w. 292

Dr Anna CIENIECKA-ROŚŁONKIEWICZ ukończyła studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego (1971). W 1978 r. uzyskała tytuł doktora nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie. W latach 1971-1983 pracowała w Instytucie Przemysłu Farmaceutycznego w Warszawie. Od 1983 jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Instytucie Przemysłu Organicznego w Warszawie. Jest autorką lub współautorką publikacji, posterów i patentów. Specjalność: biochemia, mikrobiologia. Zainteresowania: związki biologicznie czynne pochodzenia naturalnego
e-mail: cieniecka@ipo.wa.pl, tel. 228111231 w. 246

Mgr Alicja MICHALCZYK ukończyła studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (2005). Od 2006 r. pracuje na stanowisku asystenta w Instytucie Przemysłu Organicznego w Warszawie. Jest autorką i współautorką publikacji, posterów i patentów. Specjalność – biologia środowiskowa, mikrobiologia. Zainteresowania: związki biologicznie czynne pochodzenia naturalnego
e-mail: michalczyk@ipo.waw.pl, tel. 228111231 w. 346

Mgr inż. Anna KIEŁCZEWSKA – jest absolwentką Politechniki Warszawskiej (Filia w Płocku). Ukończyła specjalność Chemia i Technologia Organiczna. Od 1987 r. pracuje w Instytucie Przemysłu Organicznego, pełniąc od 1997 funkcję Kierownika Pracowni Metod Spektralnych. Zajmuje się identyfikacją substancji z zastosowaniem spektrometrii mas, spektroskopii w podczerwieni i nadfiolecie jak również pracami z zastosowaniem technik chromatograficznych (GC, HPLC, TLC). Jest uczestnikiem licznych projektów badawczych i celowych. Posiada w swoim dorobku naukowym kilkanaście publikacji w czasopiśmie naukowych, jest autorką ponad 50. raportów wewnętrznych z badań; występowała też na konferencjach z dziedziny chemii analitycznej i spektroskopii mas jako prelegentka i autorka posterów.
e-mail: kielczewska@ipo.waw.pl, tel. 228111231 w. 295

Aktualności z firm

News from the Companies

dokończenie ze strony 116

Inteligentne systemy dostarczania leków

Istotnym wyzwaniem, przed którym staje dzisiejsza medycyna jest stworzenie inteligentnych systemów dostarczania leków. Oznacza to, że poszukuje się nośników pozwalających na dawkowanie leków w wiadomy sposób, w konkretnym miejscu i ściśle określonym czasie, co zapewnić ma pacjentowi bezpieczeństwo oraz maksymalną skuteczność. Zespół badaczy z University of Nottingham w Wielkiej Brytanii stworzył unikalną nanocząstkę – nośnik, który ujawnia swoją prawdziwą tożsamość jedynie w odpowiednich warunkach.

Nanocząstka ma postać miceli tworzącej się automatycznie w środowisku wodnym i składa się z kilku warstw. Warstwa wewnętrzna to hydrofobowy rdzeń zbudowany z cholesterolowych ogonów, do których przyłączony jest jednoniciowy DNA. Zewnętrzna warstwa składa się z komplementarnej do niego nici DNA związanego z resztami glikolu polietylenowego – ten koniec łańcucha w związku z hydrofilowymi właściwościami będzie skierowany na zewnątrz nanocząstki. Całość rozpadnie się wyłącznie pod wpływem konkretnego sygnału – sekwencji komplementarnej do ssDNA warstwy zewnętrz-

nej np. materiału genetycznego wirusa czy innego patogenu. Wówczas nanocząstka odrzuca swój „maskujący płaszcz” (związany już z obcym kwasem nukleinowym), a odsłonięte zostają wewnętrzne łańcuchy DNA, na których końcach znajduje się specyficzny ligand. Może nim być znacznik wykrywany w badaniu diagnostycznym lub też terapeutyk przeciwko danej chorobie – wszystko zależy od zastosowania naszej nanocząstki.

Taka konstrukcja jest bardzo uniwersalna – właściwie dobrany biomarker pozwala stworzyć zarówno specyficzne narzędzie diagnostyczne jak i wydajny system dostarczania leków czy monitorowania leczenia. Jej działanie zostało na razie potwierdzone w testach *ex vivo* – udowodniono rozplatanie i odłączenie się zewnętrznego płaszcza pod wpływem komplementarnego fragmentu DNA, odsłaniając ligand – biotynę. Naukowcy liczą na to, że w przyszłości można będzie dokonywać takich detekcji samodzielnie – nie technikami biologii molekularnej lecz za pomocą telefonów komórkowych wyposażonych w odpowiednie aplikacje.

<http://biotechnologia.pl/31.01.2014>

dokończenie na stronie 122