

Istraživanje slobodnih aminokiselina odoljena (Valeriana officinalis L.) tankoslojnom kromatografijom

Gašpar Randić, Zita; Maleš, Željko

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2005, 61, 691 - 697**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:025769>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Istraživanje slobodnih aminokiselina odoljena (*Valeriana officinalis* L.) tankoslojnom kromatografijom*

ZITA GAŠPAR RANDIĆ¹, ŽELJAN MALEŠ²

¹JADRAN Galenski laboratorij d.d., Pulac bb, 51000 Rijeka i ²Zavod za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Schrottova 39, 10000 Zagreb

TLC analysis of free amino acids in valerian – *Valeriana officinalis* L.

S u m m a r y – *Valeriana officinalis* L. is a perennial herbaceous plant, belonging to the Valerianaceae family. The drug *Valerianae radix* consists of subterranean parts of the plant including the rhizomes, roots and stolons, carefully dried below 40 °C. It contains volatile oil, iridoids, flavonoids, triterpenes, alkaloids, amino acids, salts, sugars and organic acids.

Because there are only few data about free amino acids in this plant, a TLC as a rapid method was developed for their investigation. Leaves, stems, flowers and roots of *V. officinalis* were collected in the Pharmaceutical Botanical Garden »Fran Kušan« in June and October 2004. These plant parts were investigated in comparison with *Valerianae radix* from commercial origin. TLC method has been performed on cellulose and silica gel, using n-butanol – acetone – glacial acetic acid – water (35:35:10:20 V/V/V/V) as solvent system. Detection has been carried out by a ninhydrin reagent.

The TLC method proved that the amino acid composition depended on the plant part and its origin. Leaves and flowers collected in June contained more amino acids (alanine, phenylalanine, valine, tryptophan and tyrosine) in comparison with stem and root. The root collected in October was richer in amino acids (glutamine, arginine, alanine and γ -aminobutyric acid) than the root collected in June, because in October the root became the deposit organ, in which the reserves of glutamine and arginine formed. The sample of root from commercial origin contained glutamine, arginine, alanine and γ -aminobutyric acid.

(¹JADRAN Galenic Laboratory Ltd., Pulac b.b., 51000 Rijeka, Croatia and ²Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia).

*Rad je prikazan u okviru Poster sekcije na »53rd Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research«, Florence, 21.–25. 08. 2005.

UVOD

Droga *Valerianae radix* predstavlja korijenje, podanak i vriježe odoljena – *Valeriana officinalis* L. (*Valerianaceae*), pažljivo osušeno na temperaturi ne većoj od 40°C (Slike 1. i 2.). Droga treba sadržavati najmanje 0,5% eteričnog ulja koje se određuje destilacijom. Udio ostalih sastavnica, uključujući valepotriate, valerensku kiselinu i valeranol, određuje se HPLC i GC metodama (1, 2).

Odoljen kao polimorfna biljna vrsta ima mnogo varijeteta. Na kemijski sastav droge mogu donekle utjecati klimatski uvjeti u kojima biljka raste, je li samonikla ili uzgojena biljka, potom tlo, ekološki različita nalazišta i zemljopisni položaj. Isto tako važno je vrijeme skupljanja biljnog materijala. Korijen se skuplja najčešće u jesen i to od dvogodišnjih ili višegodišnjih biljaka.

Valepotriati nisu stabilni nakon usitnjavanja korijena, dužeg skladištenja, naročito ne u pripravcima odoljena (3). Seskviterpenske kiseline kao što su valerenska kiselina, ace-



Slika 1. *Valeriana officinalis* L. (Odoljen),
Farmaceutski botanički vrt »Fran Kušan«
Zavoda za farmaceutsku botaniku,
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu



Slika 2. *Valerianae radix*, komercijalna biljna
droga u prometu

toksivalerenska kiselina prihvaćene su u Ph. Eur. kao i AHP (American Herbal Pharmacopoeia) kao parametri za kvantitativnu HPLC analizu i vrednovanje korijena odoljena (4, 5). Identifikaciju tih aktivnih spojeva moguće je provesti i kromatografijom na tankom sloju uz neophodnu usporedbu sa standardnim supstancijama.

Fenolne kiseline su vrlo rasprostranjene u biljnom i životinjskom svijetu i čine važnu skupinu prirodnih spojeva u fitoterapijskom smislu. U korijenu odoljena identificirane su klorogenska (ester kavene i kina kiseline) i kavena kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina).

Kvalitativna analiza slobodnih aminokiselina moguća je alternativa u karakterizaciji biljne droge (6). Za korijen odoljena mogu se uzeti arginin (Arg), glutamin (Gln) i γ -aminomaslačna kiselina (Gaba) kao vodeće aminokiseline u kvalitativnoj analizi (7, 8).

Više biljke odlikuju se vrlo složenim metabolizmom aminokiselina i njihovih derivata. Svaka aminokiselina podliježe razgradnji pod utjecajem posebnog multienzimatskog sistema. Vrste porodice *Fabaceae* (*Leguminosae*) u simbiozi s bakterijama koje se nalaze u korijenu mogu vezati atmosferski dušik, prevodeći ga u amonijak koji se dalje koristi za sintezu aminokiselina (9, 10).

Aminokiseline su potrebne višestruko u životnim procesima, a naročito za sintezu proteina u stanicama rastućeg tkiva ili kod cvjetanja. Služe, nadalje, kao ishodni materijal za biosintezu heterocikličkih spojeva. To objašnjava i raspodjelu slobodnih aminokiselina u pojedinim biljnim organima tijekom različitih faza razvoja biljke, kao što je dokazano ovim istraživanjem.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Materijal za istraživanje činili su listovi (L), cvjetovi (C), stabljika (S) i korijen (R-06) odoljena (*Valeriana officinalis*), sabrani u Farmaceutskom botaničkom vrtu »Fran Kušan« 10. lipnja 2004., u vrijeme cvjetanja (Slika 1.), te korijen skupljen 6. listopada 2004. (R-10). Uzorci su osušeni i usitnjeni. Usporedno ispitan je uzorak korijena odoljena iz prometa (D-jgl) (Slika 2.).

Upotrijebljeni standardi aminokiselina bili su: γ -aminomaslačna kiselina (Gaba), alanin (Ala), arginin (Arg), asparagin (Asn), asparaginska kiselina (Asp), fenilalanin (Phe), glicin (Gly), glutamin (Gln), histidin (His), leucin (Leu), lizin (Lys), prolin (Pro), serin (Ser), tirozin (Tyr), treonin (Thr), triptofan (Trp) i valin (Val).

Ispitivani uzorci:

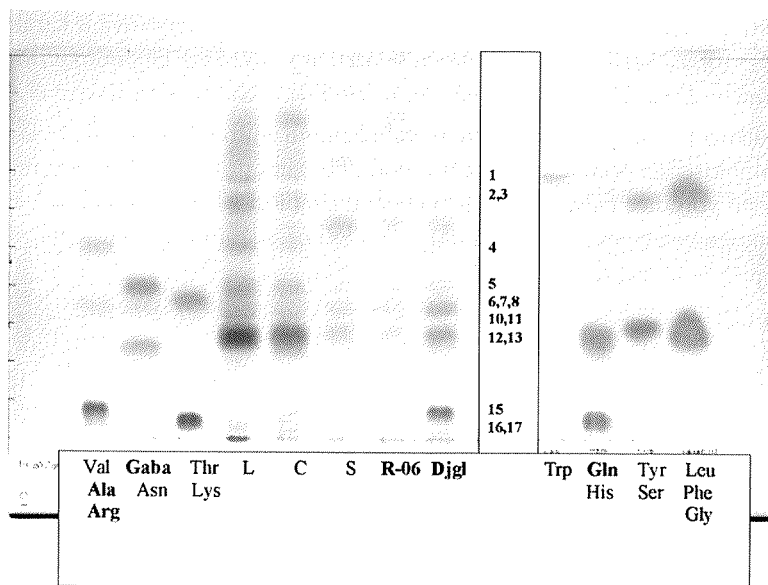
Vodeni ekstrakti pojedinih biljnih organa pripremljeni su prelijevanjem 500 mg usitnjenog uzorka s 5 mL natrij-acetata (50 mM). Zatim je ta mješavina tretirana 15 min u ultrazvučnoj vodenoj kupelji. Nakon centrifugiranja (2000 okret./min) gornji dio ekstrakta služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje (11).

Po 1 mg standarda pojedinih aminokiselina otopljen je u 5 mL 90% metanola.

Tankoslojna kromatografija:

Pokretna faza: n-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda (35:35:10:20 V/V/V/V) upotrijebljena je za odjeljivanje aminokiselina na tankim slojevima silikagela i celuloze (11).

Ispitivani uzorci i poredbene otopine nanošene su na tanki sloj u količini od 10 μ L, te nakon razvijanja kromatograma (start – fronta : 10 cm) ploče su sušene na zraku. Detekcija je provedena s ninhidrin reagensom (12–14).



Slika 3. Kromatogram slobodnih aminokiselina lista, cvijeta, stabljike i korijena odoljena na tankom sloju silikagela

Pokretna faza: n-butanol - aceton - ledena octena kiselina – voda (35:35:10:20 V/V/V/V)

Detekcija: Ninhidrin reagens

valin (Val), alanin (Ala), arginin (Arg), γ -aminomaslačna kiselina (Gaba), asparagin (Asn), treonin (Thr), lizin (Lys), triptofan (Trp), glutamin (Gln), histidin (His), tirozin (Tyr), serin (Ser), leucin (Leu), fenilalanin (Phe), glicin (Gly)

L = List

C = Cvijet

S = Stabljika

R-06 = korijen skupljen u lipnju u Farmaceutskom botaničkom vrtu

Djgl = *Valeriana radix* (sirovina u prometu)

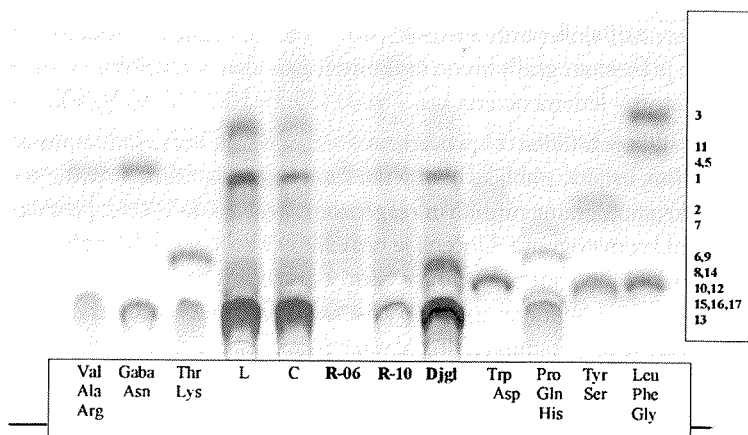
REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanje prisutnosti slobodnih aminokiselina u listu, cvijetu, stabljici i korijenu odoljena provedeno je kromatografijom na tankom sloju silikagela i celuloze u smjesi otapala: n-butanol – aceton – ledena octena kis. – voda (35:35:10:20 V/V/V/V).

Na tankom sloju silikagela (Slika 3.) provedeno je odjeljivanje slobodnih aminokiselina vodenih ekstrakata lista, cvijeta, stabljike i korijena, kao i ekstrakta biljne sirovine u prometu. Nakon prskanja kromatograma ninhidrin reagensom i grijanja na 100°C, promatrani su i uspoređeni dobiveni kromatogrami. Uočena je raznolikost i količina slobodnih aminokiselina kod lista i cvijeta, posebno aminokiselina s višim R_F vrijednostima. U periodu vegetacije odoljena slobodne aminokiseline su značajno prisutne u listu i u cvijetu istraživane biljke. Naročito se ističe prisustnost glutamina (Gln), alanina (Ala) i još nekih aminokiselina koje se preklapaju te nisu dobro razdvojene na toj stacionarnoj fazi. U listu biljke može se identificirati valin (Val) ($R_F \sim 0,50$), triptofan (Trp) ($R_F \sim 0,68$), zatim tirozin (Tyr) i leucin (Leu) s podjednakim $R_F \sim 0,62$. Slaba prisutnost slobodnih aminokiselina kod stabljike i korijena iz Farmaceutskog botaničkog vrta, naročito nedostatak arginina (Arg), kojeg ima najviše u uzorku biljne droge iz prometa, govori u prilog dinamike sinteze i pretvorbe aminokiselina jednih u druge po već utvrđenim pravilima. Pripadajuće R_F vrijednosti prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. RF vrijednosti poredbenih aminokiselina kao i odgovarajućih aminokiselina u istraživanim uzorcima

Aminokiselina		Slika 3. silikagel	Slika 4. celuloza
1 Triptofan	(Trp)	0,68	0,45
2 Tirozin	(Tyr)	0,62	0,40
3 Leucin	(Leu)	0,62	0,65
4 Valin	(Val)	0,50	0,50
5 γ -aminomaslačna kis.	(Gaba)	0,40	0,50
6 Treonin	(Thr)	0,35	0,26
7 Alanin	(Ala)	0,33	0,30
8 Serin	(Ser)	0,30	0,20
9 Prolin	(Pro)	-	0,26
10 Glutamin	(Gln)	0,30	0,17
11 Fenilalanin	(Phe)	0,30	0,55
12 Glicin	(Gly)	0,30	0,20
13 Asparagin	(Asn)	0,23	0,13
14 Asparaginska kis.	(Asp)	-	0,20
15 Arginin	(Arg)	0,06	0,15
16 Lizin	(Lys)	0,04	0,15
17 Histidin	(His)	0,04	0,15



Slika 4. Kromatogram slobodnih aminokiselina lista, cvijeta i korijena odoljena na tankom sloju celuloze

Pokretna faza: *n*-butanol - acetone - ledena octena kiselina - voda (35:35:10:20 V/V/V/V)

Detekcija: Ninhidrin reagens

valin (Val), alanin (Ala), arginin (Arg), γ -aminomaslačna kiselina (Gaba), asparagin (Asn), treonin (Thr), lizin (Lys), triptofan (Trp), asparaginska kiselina (Asp), prolin (Pro), glutamin (Gln), histidin (His), tirozin (Tyr), serin (Ser), leucin (Leu), fenilalanin (Phe), glicin (Gly)

L = List

C = Cvijet

R-06 = korijen skupljen u lipnju u Farmaceutskom botaničkom vrtu

R-10 = korijen skupljen u listopadu u Farmaceutskom botaničkom vrtu

Djgl = *Valerianae radix* (sirovina u prometu)

Slijedeći korak proveden je kasnije u listopadu, kad je istraživanju dodan novi uzorak korijena iz Farmaceutskog botaničkog vrta. Istovjetno su pripremljeni vodeni ekstrakti prethodno osušenog i usitnjenog biljnog materijala te je provedena tankoslojna kromatografija s istom mobilnom fazom *n*-butanol - acetone - ledena octena kiselina - voda (35:35:10:20 V/V/V/V), ali je odabrana za prikaz kao nepokretna faza staklena ploča s tankim slojem celuloze (Slika 4.). Ekstrakti lista i cvijeta na tankom sloju celuloze jasno pokazuju značajnu prisutnost leucina (Leu) i fenilalanina (Phe), aminokiselina koje na tankom sloju silikagela nisu dobro odvojene. Količina slobodnih aminokiselina u ekstraktima lista i cvijeta i na ovoj nepokretnoj fazi veća je nego u ekstraktu korijena. Novi ispitivani uzorak korijena R-10 kvalitativno je identičan onom iz lipnja R-06, ali sadrži veću količinu aminokiselina. Naročito se ističe novostvoreni arginin (Arg). Nazire se stvaranje glutamina (Gln) i γ -aminomaslačne kiseline (Gaba). Na kromatogramu korijena, biljne droge iz prometa, značajno su pojačane upravo te aminokiseline, arginin (Arg), glutamin (Gln) i γ -aminomaslačna kiselina (Gaba), a leucin (Leu), fenilalanin (Phe) i valin (Val) su prisutni u vrlo malim količinama.

ZAKLJUČAK

Ispitivani uzorci korijena odoljena iz prometa (D-jgl) te iz Farmaceutskog botaničkog vrta (R-06), koji je ciljano skupljen u tijeku vrhunca vegetacije i cvjetanja početkom mjeseca lipnja s namjerom da se uspoređi aminokiselinski sastav u pojedinim biljnim dijelovima (korijen, list, cvijet i stabljika), znatno se razlikuju. To upućuje na promjene i razlaganje aminokiselina u pojedinim fazama razvoja pojedinih biljnih organa. Kromatogram stabljike i korijena pokazuje znatno manji sadržaj slobodnih aminokiselina u tom periodu. U kasnijoj fazi mirovanja vegetacije (R-10) dolazi do jačanja korijena kao organa za pohranu i deponiranja, gdje se, uz ostale procese biotransformacije amonijaka, oksidativne dezaminacije i ponovne aminacije, stvaraju pričuve glutamina i arginina, što je potvrđeno ovim istraživanjem.

Literatura – References

1. WHO monographs on selected medicinal plants, Radix Valerianae, 267-276.
http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/monograph_volume_one.sht
2. P. Morazzoni, E. Bombardelli, *Fitoterapia* **66** (1995) 99-112.
3. J. Petričić, B. Lulić, *Farm. Glas.* **35** (1979) 289-293.
4. European Pharmacopoeia, 5th Edition, Volume 2, Concil of Europe, Strasbourg, 2005, 2667.
5. American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium, Valerian Root, Roy Upton Herbalist, Santa Cruz 1999, 1-24.
6. Z. Gašpar Randić, *Farm. Glas.* **60** (2004) 381-391.
7. C. Lapke, E. Riedel, H. Schilcher, Posterpresentation at the 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Vienna 1998, E05.
8. Joel G. Hardman, Lee E. Limbird, Alfred Goodman Gilman, Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill 2001, 304-309, 419-424.
9. <http://www.pharma.hr/bmb/predavanja/dusik/sld016.htm>
http://www.mzt.hr/projekti9095/1/07/102/proj_h.htm
http://www.mzt.hr/projekti9095/1/08/195/rad_cc_h.htm
10. C.A. Neeval, L.A. Anderson, D. Phillipson, *Herbal Medicines*, London 1996, 260.
11. C. Lapke, K. Weber, O. Sticher, B. Meier, Posterpresentation at the 50th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Barcelona 2002, B034.
12. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, *Plant Drug Analysis*, Berlin 1984, 288.
13. C. Lapke, J. Bisaz, O. Sticher, B. Meier, Posterpresentation at the 51st Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Kiel 2003, P040.
14. Ž. Maleš, M. Plazibat, V. Bilušić Vundać, I. Žuntar, K. Hazler Pilepić, J. Planar Chromatogr. **17** (2004) 280-285.

Primljeno: 26.09.2005.