

Tankoslojna kromatografija slobodnih aminokiselina korijena bijelog sljeza (*Althaeae radix*), izloženog različitim dozama gama zračenja

Gašpar Randić, Zita; Maleš, Željko; Vestermajer, Goran

Source / Izvornik: *Farmaceutski glasnik*, 2004, 60, 1 - 6

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:559957>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

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



Tankoslojna kromatografija slobodnih aminokiselina korijena bijelog sljeza (*Althaeae radix*), izloženog različitim dozama γ -zračenja*

ZITA GAŠPAR RANDIĆ¹, ŽELJAN MALEŠ², GORAN VESTERMAJER¹

¹JADRAN Galenski laboratorij dd, Pulac bb, 51000 Rijeka

²Zavod za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Schrottova 39, 10000 Zagreb

TLC analysis of free amino acids in *Althaeae radix*, treated with different γ -irradiation doses

S u m m a r y – *Althaeae radix* (obtained from *Althaea officinalis* L., Malvaceae) contains mucilages (about 25-35%) with galacturonic acid, glucuronic acid and rhamnose as major components. Due to the specific composition with a lot of mucilage and starch, such herbal drugs are often a subject of microbiological contamination. Although γ -irradiation is a contemporary effective, economic, fast, practical and commercial method for a microbial decontamination, it cannot be applied when herbal drugs are abundant with mucilage, since these substances will be degraded.

Our study aimed to find out what happened to the free amino acids when this drug was exposed to γ -irradiation doses of 1, 5 and 10 kGy. These doses are most frequently used for a microbial decontamination. By a TLC method it has been discovered that *Althaeae radix* contained free amino acids as follows: γ -aminobutyric acid (Gaba), alanine (Ala), arginine (Arg), asparagine (Asn), lysine (Lys), as well as some other amino acids in smaller quantities. TLC method has been performed on cellulose and silica gel, using solvent system: n-butanol – acetone – glacial acetic acid – water (35:35:10:20 V/V/V/V). Detection has been carried out by a ninhydrin reagent.

The TLC method proved that the tested samples of *Althaeae radix* contained identical amino acids pattern irrespective of the γ -irradiation treatment.

(¹JADRAN Galenic Laboratory Ltd., Pulac bb, 51000 Rijeka, Croatia, 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 51st Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Kiel, 31.VIII.–4.IX.2003.

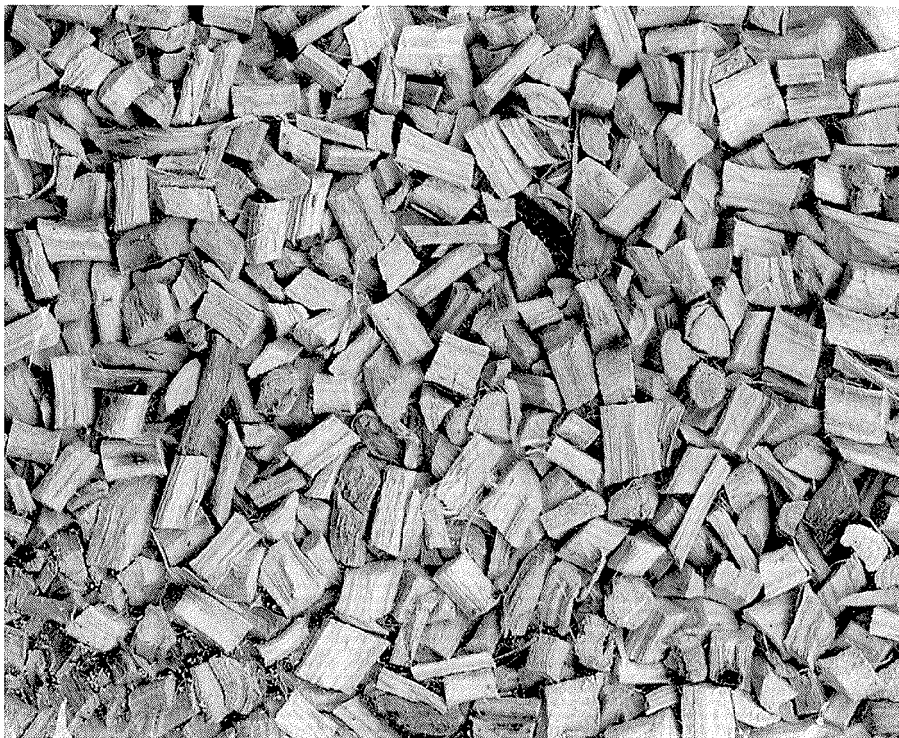
UVOD

Drogu *Althaeae radix* čini osušeni korijen bijelog sljeza – *Althaea officinalis* L., iz porodice *Malvaceae*, reda *Malvales*, razreda *Magnoliatae* (slika 1.).

Korijen bijelog sljeza sadrži 25-35% sluzi, koja je smještena u stanicama sa sluzi parenhima kore i drveta, a sastoji se od galakturonoramnana, glukana i arabinogalaktana (1-3). Osim sluzi, droga sadrži pektine, šećere, asparagin i male količine sterola (2). Zahvaljujući takvom sastavu s mnogo sluzi i škroba, biljna droga je često mikrobiološki opterećena. γ -zračenje je suvremena, vrlo učinkovita, ekonomična, brza, praktična i komercijalna metoda za mikrobnu dekontaminaciju koja se ne može primjenjivati kod biljnih droga s mnogo sluzi, jer se one razgrađuju (3).

Korijen bijelog sljeza primjenjuje se kao antitusik, a u pučkoj medicini kod dijareje i cistitisa (2).

Slobodne aminokiseline važne su u kontroli kakvoće biljnih droga i specifične za svaku biljnu vrstu te mogu poslužiti kao siguran parametar u kvalitativnoj pa i kvantitativnoj analizi (4). Posebno je to važno kod polisaharidnih droga kao što je *Althaeae radix*, jer se drugim kemijskim metodama ne može procijeniti kakvoća. Slobodne aminokiseline mogu poslužiti i kao važan kvalitativni pokazatelj kod biljnih preparata, sirupa, instant čajeva (5).



Slika 1. Korijen bijelog sljeza (*Althaeae radix*)

Istraživanjem slobodnih aminokiselina može se utvrditi koje se od njih nalaze u većoj količini i koje samo u tragovima. Biljni organi iste vrste mogu imati sličan, ali i različit aminokiselinski sastav (6).

Cilj ovog rada bio je utvrditi aminokiselinski sastav u drogi *Althaeae radix*, izloženoj različitim dozama γ -zračenja od 1, 5 i 10 kGy. To su doze koje se najčešće primjenjuju za mikrobnu dekontaminaciju ljekovitog bilja (7).

EKSPERIMENTALNI DIO

Ispitivana biljna droga bio je korijen bijelog sljeza (*Althaeae radix*) iz prometa. Uzorci su označeni sa: 0, 1, 5, 10 (kGy), ovisno o primijenjenoj dozi γ -zračenja.

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

Priprava ekstrakta: Vodeni ekstrakt usitnjene droge pripremljen je prelijevanjem 500 mg droge s 10 mL vrele vode. Zatim je ta mješavina tretirana 15 min u ultrazvučnoj vodenoj kupelji. Nakon centrifugiranja (2000 okretaja/min) gornji dio ekstrakta služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje (9).

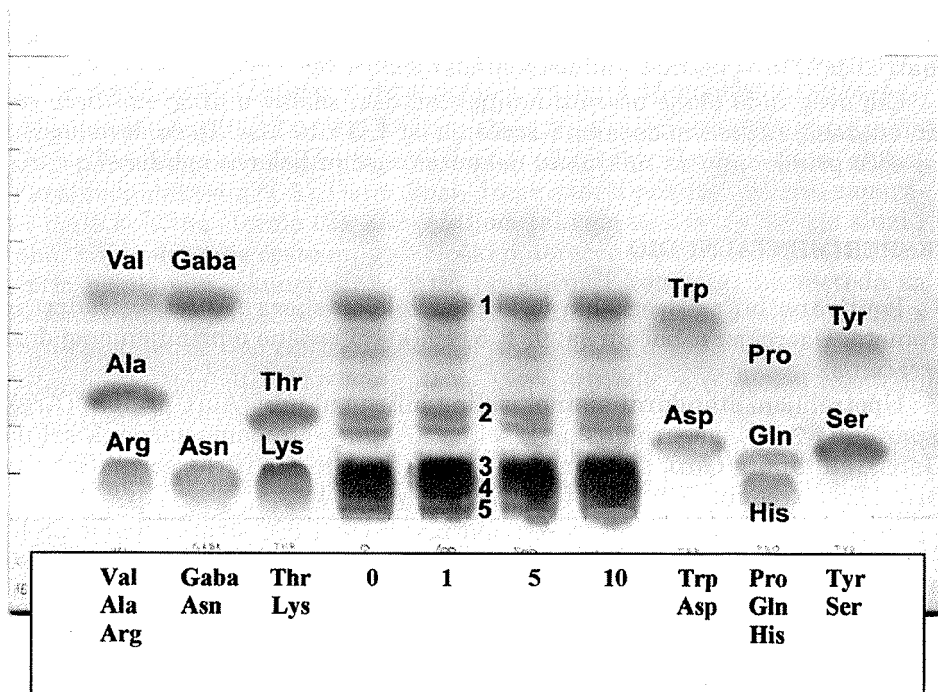
Poredbene otopine: Po 1 mg standarda pojedinih aminokiselina otopi se u 10 ml vode.

Tankoslojna kromatografija: Istraživanje prisutnosti aminokiselina provedeno je odjeljivanjem na tankom sloju celuloze F i silikagela u smjesi otapala: n-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda (35:35:10:20 V/V/V/V) (8, 9). Detekcija je provedena ninhidrin reagensom (10).

REZULTATI I RASPRAVA

Vodeni ekstrakti korijena bijelog sljeza, neozračen (0), kao i ozračen različitim dozama γ -zračenja (1, 5 i 10 kGy), ispitivani su na prisutnost slobodnih aminokiselina tankoslojnom kromatografijom na dvjema nepokretnim fazama (celuloza i silikagel).

Na tankom sloju celuloze F (*slika 2.*) odjeljivanje je provedeno pokretnom fazom: n-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda (35:35:10:20 V/V/V/V). Nakon prskanja kromatograma ninhidrin reagensom i grijanja na 100 °C, u ispitivanim ekstraktima uočeno je preklapanje aminokiselina (mrlje 3, 4 i 5) u nižem R_F području ($R_F \sim 0,10$) gdje se nalaze ljubičasta zona arginina, sivo-ljubičasta asparagina i ljubičasta zona lizina. Plavoljubičasta zona γ -aminomaslačne kiseline (mrlja 1 – $R_F \sim 0,45$) ispitivanih otopina odgovara po boji i intenzitetu standardnoj otopini te aminokiseline. Ljubičasta zona 2 ($R_F \sim 0,25$) odgovara aminokiselini alaninu. Vidljivo je da su kromatogrami ispitivanih ekstrakata pripremljenih od uzoraka korijena, koji su primili različite doze γ -zračenja, identični s obzirom na sastav aminokiselina.



Slika 2. Kromatogram slobodnih aminokiselina droge *Althaeae radix* na tankom sloju celuloze F

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

Detekcija: Ninhidrin reagens

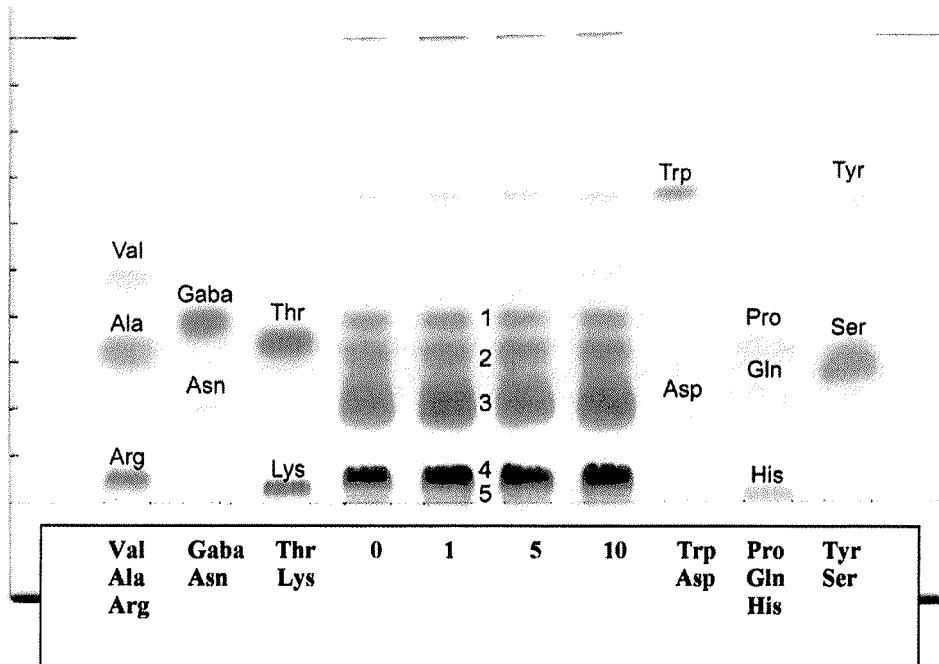
Val = valin, Ala = alanin, Arg = arginin, Gaba = γ -aminomaslačna kiselina, Asn = asparagin, Thr = treonin, Lys = lizin, Trp = triptofan, Asp = asparaginska kiselina, Pro = prolin, Gln = glutamin, His = histidin, Tyr = tirozin, Ser = serin

0 = vodeni ekstrakt neozračenog korijena bijelog sljeza

1, 5 i 10 = vodeni ekstrakti korijena bijelog sljeza ozračeni dozama od 1, 5 i 10 kGy

Drukčija slika dobivena je odjeljivanjem ekstrakata na tankom sloju sili-kagela (slika 3.) uz istu pokretnu fazu: *n*-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda (35:35:10:20 V/V/V/V). Uočava se manji broj odjeljenih aminokiselina, ali je kromatogram pregledniji. Za razliku od prethodnog kromatograma, vidljivo je bolje razdvajanje arginina (mrlja 4 – $R_F \sim 0,07$) i lizina (mrlja 5 – $R_F \sim 0,03$), koji su u ekstraktima prisutni u znatnoj količini. Usporedbom s poredbenim supstancijama dokazano je da mrlje 1 ($R_F \sim 0,40$), 2 ($R_F \sim 0,35$) i 3 ($R_F \sim 0,25$) odgovaraju γ -aminomaslačnoj kiselini, alaninu i asparaginu.

Na oba se kromatograma uočava prisutnost još nekih aminokiselina, u manjoj količini, koje nisu identificirane.



Slika 3. Kromatogram slobodnih aminokiselina droge *Althaeae radix* na tankom sloju silikagela

Pokretna faza: *n*-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda
(35: 35:1 D: 20 V/V/V/V)

Detekcija: Ninhidrin reagens

Val = valin, Ala = alanin, Arg = arginin, Gaba = γ -aminomaslačna kiselina, Asn = asparagin, Thr = treonin, Lys = lizin, Trp = triptofan, Asp = asparaginska kiselina, Pro = prolin, Gln = glutamin, His = histidin, Tyr = tirozin, Ser = serin
0 = vodeni ekstrakt neozračenog korijena bijelog sljeza
1, 5 i 10 = vodeni ekstrakti korijena bijelog sljeza ozračeni dozama od 1, 5 i 10 kGy

ZAKLJUČAK

Metodom tankoslojne kromatografije dokazano je da ekstrakti korijena bijelog sljeza sadrže ove slobodne aminokiseline: γ -aminomaslačnu kiselinu (Gaba), alanin (Ala), asparagin (Asn), arginin (Arg) i lizin (Lys). Neidentificirane aminokiseline prisutne su u manjoj količini.

Aminokiselinski sastav svih ispitivanih ekstrakata bio je identičan, dakle nije ovisio o primljenoj dozi γ -zračenja.

Literatura – References

1. H. Wagner, Pharmazeutische Biologie – Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1982, 272.
2. M. Wichtl, G. Bisset, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart 1994, 65.
3. Z. Gašpar Randić, D. Domitrović, S. Tomić, 50th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Book of Abstracts, Barcelona 2002, 342.
4. C. Lapke, E. Riedel, H. Schilcher, 46th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Abstracts of Plenary Lectures, Short Lectures and Posters, Vienna 1998, E05.
5. E. Hahn-Deinstrop, Dtsch. Apoth. Ztg. **135** (1995) 31–33.
6. Ž. Maleš, M. Plazibat, A. Ujević Ivić, Farm. Glas. **58** (2002) 389–401.
7. D. Ražem, The Development of Food Irradiation in Croatia, Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev. **30** (1992) 135–150.
8. Ž. Maleš, M. Plazibat, K. Hazler Pilepić, V. Bilušić, Farm. Glas. **58** (2002) 155–160.
9. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Plant Drug Analysis, Berlin 1984, 288.
10. H. K. Berry, C. Leonard, H. Peters, M. Granger, N. Chunekahira, Clin. Chem. **14** (1968) 1033.

Primljeno: 24. IX. 2003.