

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XVIII, 7

SECTIO DD

1963

Z Katedry Farmakologii Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie  
Kierownik: prof. dr G. Staśkiewicz

Grzegorz STAŚKIEWICZ

Wolne aminokwasy w kopytniku (*Asarum europaeum* L.) i kokornaku  
(*Aristolochia clematitis* L.)

Свободные аминокислоты в *Asarum europaeum* L.  
и *Aristolochia clematitis* L.

Free Amino Acids in *Asarum europaeum* L.  
and *Aristolochia clematitis* L.

Zastosowanie przez Consdena, Gordona i Martina (2) chromatografii bibułowej do analizy aminokwasów umożliwiło szerokie wykorzystanie tej metody do celów badawczych. Syntetyczny przegląd osiągnięć z tego zakresu podaje Syngge (6). Obszerne badania nad występowaniem najważniejszych wolnych aminokwasów w 166 gatunkach roślin należących do 48 rodzin przeprowadził Reuter (3). Badając występowanie peptydów we frakcji rozpuszczalnych związków azotu, oznaczył Schneider (4) wolne aminokwasy w *Asarum europaeum* L., *Mentha piperita* L., *Mentha gentilis* L. i *Helianthus stramosus* L. var. Willd. Thell. Na obecność wolnych aminokwasów w liściach i kłączach kopytnika zwrócił uwagę Staśkiewicz (5).

Celem niniejszej pracy była analiza jakościowa i ilościowa wolnych aminokwasów w kopytniku (*Asarum europaeum* L.) i kokornaku (*Aristolochia clematitis* L.) należących do rodziny *Aristolochiaceae*.

#### MATERIAŁ I METODY

Użyte do badań rośliny pochodziły z podmiejskiej okolicy Lublina. Oddzielnie analizowano liście i kłącza kopytnika oraz liście i korzenie kokornaka.



### Przygotowanie wyciągów

5 gramów wysuszonego do stałej wagi i rozdrobnionego surowca zalewano 50 ml 80 % etanolu i wstrząsano w temperaturze pokojowej przez 1,5 godz. Po odwirowaniu, klarowny wyciąg zatężano pod próżnią do objętości 20 ml, w ten sposób 0,02 ml wyciągu odpowiadało 0,005 g surowca.

### Identyfikacja aminokwasów

Aminokwasy identyfikowano na chromatogramach dwukierunkowych. Używano bibuły Whatman nr 1 o wymiarach 35×35 cm. Badane wyciągi nanoszono w ilości 0,04 i 0,08 ml. Chromatogramy rozwijano w pierwszym kierunku w układzie n-propanol : woda (7:3), w drugim kierunku w układzie fenol nasycony wodą. Plamy aminokwasów wywoływano: 1) 0,2 % roztworem acetonowym ninhydryny (po wyjęciu bibuły z tego roztworu przetrzymywano ją przez 10 min. w temp. 90°C), 2) 0,2 % roztworem izatyny w 4 % roztworze acetonowym kwasu octowego i przetrzymaniu bibuły przez 10—15 min. w temp. 110°C. Chromatogramy uzyskane z badanych wyciągów porównywano z chromatogramami odpowiednich wzorców aminokwasów przygotowanymi w tych samych warunkach.

### Analiza jakościowa aminokwasów

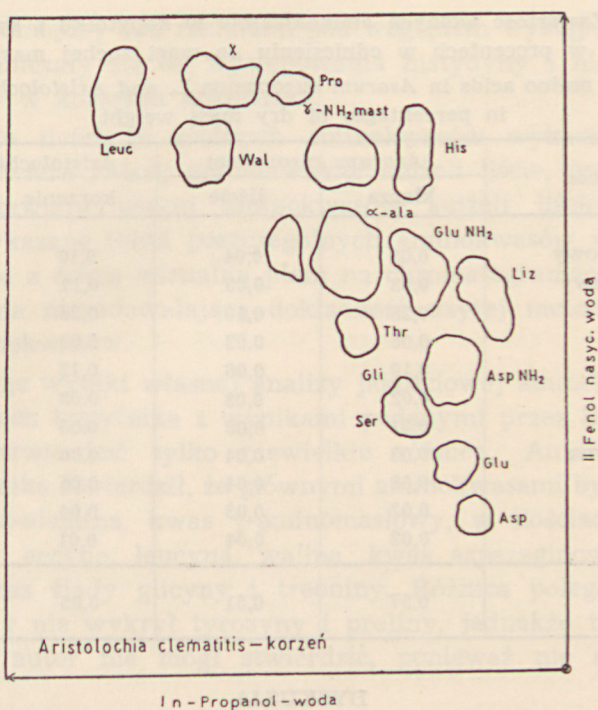
Chromatogramy rozwijano na paskach bibuły Whatman nr 1, szerokości 6 cm i długości 35 cm. Stosowano trzy układy rozpuszczalników: 1) fenol nasycony wodą, 2) n-propanol — woda (7:3), 3) metanol — butanol — woda (2:2:1). Badane wyciągi nanoszono na linię startu, odległą od brzegu bibuły o 4 cm, w postaci pasemka szerokości 1 cm. Chromatogramy rozwijano kilkustopniowo metodą wstępującą: pierwszy raz na wysokość 10 cm po wysuszeniu w temp. 30°C, drugi raz na wysokość 20 cm po wysuszeniu w temp. 30°C, trzeci raz na wysokość 30 cm. Wysuszone chromatogramy wywoływano przez zanurzenie w 0,2 % roztworze ninhydryny w 0,2 % roztworze acetonowym  $\text{CoCl}_2$ , a następnie umieszczenie w suszarce w temp. 90°C na 10 min. Oznaczenia przeprowadzano po 10 min. Oznaczenia ilościowe wykonano posługując się pomiarem powierzchni zakreślonych krzywymi uzyskanymi przy pomocy fotoabsorpcjometru firmy Juan. Wyniki pomiarów porównywano z pomiarami przeprowadzonymi w identycznych warunkach, ale uzyskanymi przy pomocy znanych ilości standardów aminokwasów, wzorując się na pracy Borkowskiego i Madeckiej-Borkowskiej (1) Wyniki oznaczeń ilościowych wyrażono w procentach w odniesieniu do wagi surowca.

Prolinę oznaczano na oddzielnych chromatogramach, wywoływanych 0,2 % roztworem izatyny w 4 % acetonowym roztworze kwasu octowego, porównując wielkości powierzchni plam badanych wyciągów z plamami otrzymanymi po rozchromatografowaniu standardu proliny.

### WYNIKI

Wyniki badań przedstawiono w tab. 1 i 2 oraz na ryc. 1.





Ryc. 1

Tab. 1. Wolne aminokwasy w kopytniku i w kokornaku  
Free amino acids in *Asarum europaeum* L. and *Aristolochia clematitis* L.

| Aminokwas        | <i>Asarum europ.</i> |        | <i>Aristolochia clem.</i> |        | Rf<br>propanol | Rf<br>fenol |
|------------------|----------------------|--------|---------------------------|--------|----------------|-------------|
|                  | kłącza               | liście | korzenie                  | liście |                |             |
| Kw. asparaginowy | +++                  | ++     | +++                       | +++    | 0,17           | 0,27        |
| Kw. glutaminowy  | +++                  | +++    | +++                       | +++    | 0,21           | 0,33        |
| Asparagina       | +++                  | ++     | +++                       | +++    | 0,24           | 0,46        |
| Glutamina        | +++                  | ++     | +++                       | ++     | 0,29           | 0,65        |
| Alanina          | +++                  | +++    | +++                       | +++    | 0,43           | 0,63        |
| Treonina         | ++                   | ++     | ++                        | ++     | 0,40           | 0,56        |
| Walina           | ++                   | ++     | ++                        | +++    | 0,60           | 0,81        |
| Leucyna          | ++                   | ++     | ++                        | ++     | 0,71           | 0,86        |
| Seryna z glicyną | ++                   | ++     | +++                       | ++     | 0,32           | 0,86        |
| Tyrozyna         | ++                   | ++     | ++                        | ++     | 0,54           | 0,65        |
| Prolina          | +                    | ++     | +                         | ++     | 0,52           | 0,87        |
| Kw. γ-aminomasł. | +++                  | +++    | +++                       | +++    | 0,41           | 0,80        |
| niezidentyf.     | —                    | —      | ++                        | —      | 0,61           | 0,94        |
| Lizyna           | +                    | —      | +                         | —      | 0,11           | 0,50        |
| Histydyna        | —                    | —      | +++                       | —      | 0,24           | 0,69        |



Tab. 2. Zawartość wolnych aminokwasów w kopytniku i kokornaku wyrażona w procentach w odniesieniu do wagi suchej masy rośliny  
Content of free amino acids in *Asarum europaeum* L. and *Aristolochia clematitis* L. in percentages of dry mass weight

| Aminokwas        | <i>Asarum europaeum</i> |        | <i>Aristolochia clematitis</i> |        |
|------------------|-------------------------|--------|--------------------------------|--------|
|                  | kłącza                  | liście | korzenie                       | liście |
| Kw. asparaginowy | 0,03                    | 0,04   | 0,10                           | 0,09   |
| Kw. glutaminowy  | 0,03                    | 0,05   | 0,11                           | 0,13   |
| Asparagina       | 0,23                    | 0,10   | 0,28                           | 0,12   |
| Glutamina        | 0,05                    | 0,03   | 0,05                           | 0,04   |
| Alanina          | 0,10                    | 0,06   | 0,12                           | 0,08   |
| Walina           | 0,02                    | 0,03   | 0,08                           | 0,04   |
| Leucyna          | 0,01                    | 0,05   | 0,05                           | 0,01   |
| Seryna z glicyną | 0,03                    | 0,04   | 0,06                           | 0,08   |
| Treonina         | 0,03                    | 0,04   | 0,05                           | 0,04   |
| Tyrozyna         | 0,02                    | 0,03   | 0,04                           | 0,03   |
| Prolina          | 0,02                    | 0,04   | 0,01                           | 0,03   |
| Razem            | 0,57                    | 0,51   | 0,95                           | 0,69   |

#### DYSKUSJA

Na chromatogramach wyciągów liści i kłączy kopytnika przy stosowanym naniesieniu 0,04 ml stwierdzono zasadniczo występowanie tych samych aminokwasów. Na podstawie intensywności plam można było wyróżnić w liściach jako główne aminokwasy: kwas glutaminowy,  $\alpha$ -alanina, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; w mniejszych ilościach występowały kwas asparaginowy, asparagina, glutamina, treonina, walina, leucyna, seryna z glicyną, tyrozyna. W kłączach występowały jako główne aminokwasy: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, asparagina, glutamina,  $\alpha$ -alanina, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; w mniejszych ilościach: treonina, walina, leucyna, seryna z glicyną, tyrozyna i ślady lizyny.

Na chromatogramach wyciągu liści kokornaka stwierdzono jako główne aminokwasy: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, asparaginę,  $\alpha$ -alaninę, walinę i kwas  $\gamma$ -aminomasłowy; w mniejszych ilościach występowały: glutamina, treonina, leucyna, seryna z glicyną, tyrozyna i prolina. Na chromatogramach wyciągów z korzenia kokornaka występowały jako główne aminokwasy: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, asparagina, glutamina,  $\alpha$ -alanina, seryna z glicyną, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy i histydyna; w mniejszej ilości: treonina, walina leucyna, tyrozyna, plama nie zidentyfikowana ( $R_f = 0,61$  — propanol,  $R_f = 0,94$  — fenol), ślady proliny i lizyny (ryc. 1).



Różnice pomiędzy obu roślinami pod względem występowania aminokwasów ograniczały się do występowania histydyny i nie zidentyfikowanej plamy w korzeniu kokornaka.

Oznaczanie ilościowe wolnych aminokwasów wykazało, że kłącze kopytnika zawiera więcej aminokwasów aniżeli liście, podobnie korzeń kokornaka zawiera więcej aminokwasów aniżeli liście tej rośliny. Jednakże wykazane ilości poszczególnych aminokwasów nie pokrywały się całkowicie z oceną wizualną plam na chromatogramach, co mogłoby wskazywać na niezadowalającą dokładność użytej metody ilościowego badania aminokwasów.

Porównując wyniki własnej analizy jakościowej aminokwasów w liściach i kłączach kopytnika z wynikami podanymi przez Schneidera (4), można stwierdzić tylko niewielkie różnice. Autor ten badając łodygi kopytnika stwierdził, że głównymi aminokwasami były: glutamina, asparagina,  $\alpha$ -alamina, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, w ilościach mniejszych występowały: seryna, leucyna, walina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy oraz ślady glicyny i treoniny. Różnica polega na tym, że Schneider nie wykrył tyrozyny i proliny, jednakże tego ostatniego aminokwasu autor nie mógł stwierdzić, ponieważ nie stosował testu izatynowego.

#### WNIOSKI

W liściach i kłączach kopytnika oraz w liściach i korzeniach kokornaka stwierdzono zasadniczo występowanie tych samych aminokwasów: kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, asparaginy,  $\alpha$ -alaniny, treoniny, waliny, leucyny, seryny z glicyną, tyrozyny, proliny, kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego. Na chromatogramach wyciągów z kłączy kopytnika i korzeni kokornaka widoczna była słaba plama lizyny. W wyciągu z korzeni kokornaka wykazano przy pomocy chromatografii bibułowej obecność plamy histydyny oraz nie zidentyfikowanej plamy ( $R_f = 0,61$  — propanol,  $R_f = 0,94$  — fenol).

Całkowita zawartość zidentyfikowanych aminokwasów, wyrażona w procencie suchej masy surowca, jest nieco większa w kłączach kopytnika aniżeli w liściach; również korzenie kokornaka zawierają więcej wolnych aminokwasów aniżeli liście tej rośliny.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Borkowski T., Madecka-Borkowska I.: Oznaczanie aminokwasów metodą chromatografii bibułowej. *Chemia Analit.*, 4, 119, 1959.
2. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P.: *Qualitative Analysis of*



- Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper. Biochem. J., 38 224, 1944.
3. Reuter G.: Die Hauptformen des löslichen Stickstoffs in vegetativen pflanzlichen Speicherorganen und ihre systematische Bewertbarkeit. Flora, 145, 326, 1958.
  4. Schneider G.: Über das Vorkommen gebundener Aminosäuren in der Fraktion der löslichen Stickstoffverbindungen von *Mentha*, *Asarum* und *Helianthus* im Verlauf einer Vegetationsperiode. Flora, 145:461 (1958).
  5. Staśkiewicz G.: Pharmakologische Untersuchungen über *Asarum europaeum* L. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio DD, vol. XIV
  6. Syngé R. L. M.: Peptides (Bound Amino Acids) and Free Amino Acids. [w:] Peach-Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Vol. 4, Springer Verlag, Heidelberg 1955.

## РЕЗЮМЕ

Автором произведены качественные и количественные исследования свободных аминокислот в *Asarum europaeum* L. (листья и корневище) и *Aristolochia clematitis* L. (листья и корни). В качественных исследованиях применена двумерная хроматография на бумаге в количественных исследованиях — одномерная хроматография и обозначение количества аминокислот на основе измерения поверхностей заштрихованных кривой, полученной при употреблении фотоабсорбциометра.

В листьях и корневищах *Asarum europaeum* L. и в листьях и корнях *Aristolochia clematitis* L. обнаружено выделение следующих аминокислот: аспарагиновой кислоты, глютаминовой кислоты, аспарагина, глютамина, альфа-аланина, валина, лейцина, серина, глицина, треонина, тирозина, пролина, гамма-аминомасляной кислоты. На хроматограммах экстрактов из корневищ *Asarum europaeum* L. и корней *Aristolochia clematitis* L. появлялось слабое пятно лизина. На хроматограммах из корней *Aristolochia clematitis* L. обнаружено пятно гистидина и неидентифицированное пятно ( $R_f = 0,1$  — пропанол; и  $R_f = 0,94$  — фенол). Установлено, что содержание всецело определенных аминокислот в листьях *Asarum europaeum* L. составляет 0,51 %, в корневищах *A. europaeus* L. 0,57 %, в листьях *Aristolochia clematitis* L. 0,69 %, в корнях *A. clematitis* L. 0,95 % в отношении к сухой массе сырья. Содержание свободных аминокислот в корневищах *Asarum europaeus* L. и корнях *A. clematitis* L. больше, чем в листьях этих же растений.



## SUMMARY

The author carried out qualitative and quantitative studies on free amino acids in *Asarum europaeum* L. (leaves and rhizomes) and *Aristolochia clematitis* L. (leaves and roots). For qualitative determinations two-dimensional filter-paper chromatography was used; quantitative determinations were performed by means of one-dimensional chromatography and measurements of surfaces delimited by curves obtained in the photo-absorption meter.

The following amino acids were found in the leaves and rhizomes of *Asarum europaeum* L. and in the leaves and roots of *Aristolochia clematitis* L.: aspartic acid, glutamic acid, asparagine, glutamine, alpha-alanine, valine, leucine, serine, glycine, threonine, tyrosine, proline, gamma-aminobutyric acid. A faint spot of lysine was observed in chromatograms of extracts from the rhizomes of *Asarum europaeum* L. and from the roots of *Aristolochia clematitis* L. In chromatograms of extracts from the roots of *Aristolochia* a histidine spot and an unidentified spot were found ( $R_f = 0.61$  — propanol, and  $R_f = 0.94$  — phenol). It was determined that the content of the identified amino acids in the leaves of *Asarum* was 0.51 %, in the rhizomes of *Asarum* — 0.57 %, in the leaves of *Aristolochia* — 0.69 %, and in the roots of *Aristolochia* 0.95 % of dry mass of the raw material.