

5-HIDROKSITRIPTAMIN U LJUTOJ KOPRIVI (*URTICA PILULIFERA* L.)

With Summary in English

IVAN REGULA

(Iz odjela za fiziologiju bilja Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primljeno 6. 1. 1970.

Uvod

Tražeci uzroke svrbežu i bolu kože koje izazivaju ubodi dlaka mahune vrste *Mucuna pruriens* Bowden, Brown i Batty (1954) utvrdili su kromatografskim i farmakološkim metodama da te dlake sadržavaju 5-hidroksitriptamin, koji su zatim Collier i Cheshier (1956) našli u žeravkama koprive (*Urtica dioica*). Na prisutnost tog biogenog amina u heterotrofnim biljkama upozorio je Tyler (1958), koji je u karpoforima otrovne gljive *Panaeolus campanulatus* identificirao tu supstanciju. Sve dok nije nađen u zreлом plodu banane (*Musa sapientum*) (Waalkes i sur. 1958), rajčici (*Solanum lycopersicum*) (West 1958), ananasu (*Ananas sativus*) (Bruce 1965) i plodovima oraha (*Juglans regia*) (Kirberger i Braun 1961), bio je obično ovaj biogeni amin povezan s biljkama koje su smatrali toksičnima za životinje. Kako je već poznata nazočnost 5-hidroksitriptamina u običnoj koprivi (*U. dioica*), ovim radom se željela ispitati prisutnost tog amina u ljutoj koprivi (*Urtica pilulifera*).

Eksperimentalni dio

Stabljike i lišće vrste *U. pilulifera* hladili smo 4 sata na temperaturi od -10°C . Biljni je materijal zatim homogeniziran u hladnom 80% metanolu.

Ekstrakcija je vršena 22 sata pri $+20^{\circ}\text{C}$ uz povremeno mućkanje. Nakon toga dobiveni metanolški ekstrakt odvojen je dekantiranjem i odsisavanjem, a na biljni je materijal dodana ista količina 80% metanola kao u prethodnom slučaju, pa je ekstrakcija ponovljena još dva puta.

Dobiveni ekstrakti spojeni su i upareni u vakuumu vodene sisaljke (18 mm Hg, temp. vodene kupelji +33°C) na volumen 20 ml. Izmučivanjem koncentriranog biljnog ekstrakta s petroleterom, uklonjene su biljne boje i lipofilne supstancije.

Ekstrakt je pušten preko ionskog izmjenjivača amberlita CG-50 u formi NH_4^+ u kojoj je bio pripremljen s 0.2 M amonijevim acetatom, pH 7.5. Organske kiseline, soli i aminokiseline eluirane su sa stupca s 0.02 M amonijevim acetatom (pH 7.5), a zatim su bazične supstancije, koje se adsorbiraju na smoli, eluirane s 1N solnom kiselinom. Solnokiseli eluat uparen je u vakuumu do suha, a ostatak otopljen u 2 ml acetona i ispitivan kromatografijom na Whatmanovu papiru br. 1 i 3 MM. Za usporedbu je služio autentični uzorak 5-hidroksitriptamina. Kromatogrami su razvijani u otapalu izo-propanol-konc. amonijev hidroksid-voda (10:1:1), a zone, koje su odgovarale standardu 5-hidroksitriptamina, izrezane su i eluirane 3 puta metanol-vodom (1:1). Kromatografski eluati ponovno su ispitivani kromatografijom na papiru i tankom sloju silika gela i aluminijevog oksida u kiselim, neutralnim i bazičnim otapalima. Identifikacija je vršena s različitim bojenim reagensima na indolske spojeve (tabela 1).

Za fluorometrijska ispitivanja eluat s papira ponovno je propušten preko stupca amberlita CG-50 u formi NH_4^+ . U 2 ml solnokiselog eluata dodan je 1 ml koncentrirane solne kiseline. Fluorescencija je ispitivana na spektrofotofluorimetru Farrand MK-1.

Za histokemijska ispitivanja uzimani su mikroskopski tanki presjeci lista, stabljike ili dlake žeravke (emergencje) na koje je stavljena kap p-dimetilaminocimtaldehida. Pošto je preparat prekriven pokrovnicom uz lagano zagrijavanje na predmetnom stakalcu, nakon dvadesetak minuta pojavilo se karakteristično plavo obojenje.

Rezultati i diskusija

U prvom i drugom ekstraktu lišća i stabljika, koji su sadržavali priličan postotak vode, nađena je Ehrlich-pozitivna supstancija, koja se prilikom separacije na amberlitu CG-50 adsorbira i ostane na ovom izmjenjivaču nakon elucija kiselina i neutralnih supstancija, što je upućivalo na njezin bazični karakter. Kromatografsko ponašanje i obojene reakcije ove supstancije s različitim reagensima pružile su dalju informaciju o prirodi tog spoja. Modro obojenje s Ehrlichovim reagensom, ksanthidrolom i p-dimetilaminocimtaldehidom upućuju na to da se radi o jednom derivatu indola, a pozitivna reakcija (ljubičasto) s α -nitrozo- β -naftolom (Udenfriend i sur. 1955) na hidroksilnu skupinu u položaju 5 indolske jezgre. Na prisutnost alifatske aminoskupine upućuje pozitivna ninhidrinska reakcija, a obojena reakcija, kao i karakteristična fluorescencija dobivena nakon apliciranja Jepsonova i Stevensonova reagensa na triptamine, potvrđuje da je ispitivana supstancija iz ekstrakta derivat triptamina. Kromatografijom na papiru i tankom sloju silika gela i aluminijeva oksida u kiselim, neutralnim i bazičnim otapalima nađeno je da ispitivana supstancija ima jednake R_f vrijednosti sa sintetskim 5-hidroksitriptaminom (tabela 1).

Spektrofotofluorometrijska analiza spoja iz koprive u jakoj kiselini (3N HCl) pokazuje da se aktivacijski spektar (maksimum kod 295 nm) kao i fluorescentni spektar (maksimum kod 540 nm) podudaraju s onim

Tabela 1 — Table 1

Rf vrijednosti i obojene reakcije supstancije iz koprive i uzorka 5-hidroksitriptamina
 Rf Values and Colour Reactions of Compound from the Roman nettle and sample of 5-Hydroxytryptamine

Supstanca Substance	Papirna kromatografija Rf u otapalu*		Tankoslojna kromatografija							Reagensi Reagents						
	Paper chromatography Rf in solvent system*	Thin layer chromatography	1	2	3	4	5	6	6 ⁺	7 ⁺	I	II	III	IV	V	VI
Supstanca iz koprive	0.49	0.52	0.35	0.63	0.08	0.66	0.8	0.12			m.	m.	m.	lj.	lj.	lj.
Compound from the Nettle	0.49	0.52	0.35	0.63	0.08	0.66	0.8	0.12			m.	m.	m.	lj.	lj.	lj.

- * 1. n-BuOH-AcOH-H₂O (60 : 15 : 25)
 2. izo-PropOH-NH₃-H₂O (10 : 1 : 1)
 3. n-BuOH-EtOH-H₂O (4 : 1 : 1)
 4. MeOH-BuOH-C₂H₅-H₂O (4 : 2 : 2 : 2)
 5. Dest. H₂O
 6. izo-PropOH-NH₃-EtAc (35 : 20 : 45)
 7. CHCl₃-C₂H₅

I = Ehrlich-ov

II = p-N, N-Dimetilaminocimtaldehid

III = Ksanthidrol

IV = α-Nitrozo-β-naftol

V = Ninhidrin

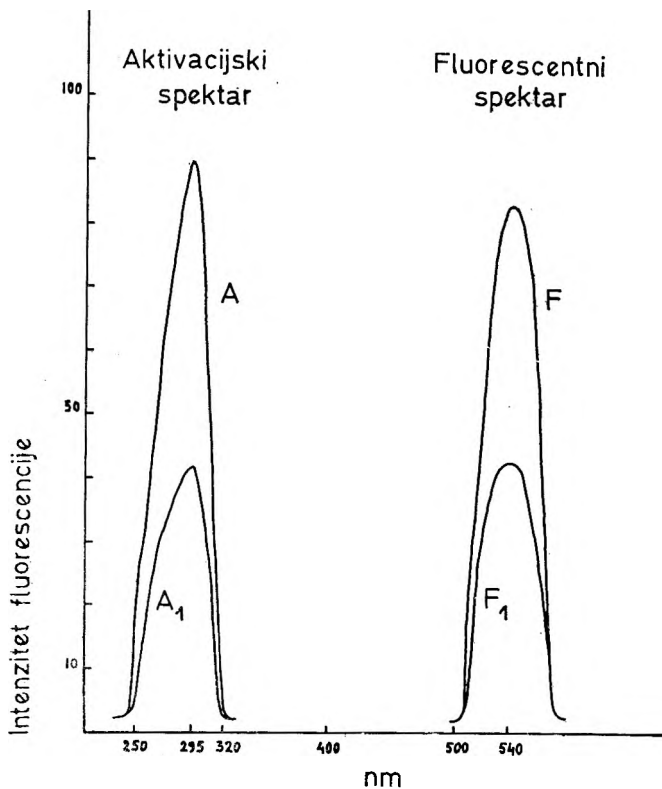
VI = Jepsonov i Stevensonov

m. = modra — blue

lj. = ljubičasta — violet

+ SiO₂ G

++ Al₂O₃ G



Sl. 1. Aktivacijski i fluorescentni spektri supstance iz koprive (A, F) i uzoraka 5-hidroksitriptamina (konc. 5 $\mu\text{g/ml}$) (A_1 , F_1).

A, A_1 , aktivacijski spektri (fluorescencija kod 545 nm).

F, F_1 , fluorescentni spektri (aktivacija kod 295 nm).

Fig. 1. Activation and fluorescence spectra of compound from the Roman nettle (A, F) and sample of 5-Hydroxytryptamine (conc. 5 $\mu\text{g/ml}$) (A_1 , F_1).

A, A_1 , activation spectra (fluorescence at 545 nm).

F, F_1 , fluorescence spectra (activation at 295 nm).

autentičnog uzorka 5-hidroksitriptamina (sl. 1). Tom metodom ustanovljeno je da *Urtica pilulifera* sadržava 0.4 µg 5-hidroksitriptamina po gramu svježe tvari.

p-Dimetilaminocimtaldehid se pokazao vrlo prikladnim za histokemijsko dokazivanje prisutnosti 5-hidroksitriptamina u tkivima biljke. Tako je u dlakama žeravkama dobivena pozitivna reakcija na 5-hidroksitriptamin, što međutim ne isključuje prisutnost i još kojeg drugog indolskog spoja. Parenhimsko tkivo lista kao i stabljike dali su negativnu reakciju što ne isključuje u potpunosti prisutnost ovog amina u tim tkivima, već je možda njegova koncentracija ovdje ispod granice osjetljivosti reagensa.

*

Najtoplije zahvaljujem prof. dru Zvonimiru Devidéu na savjetima i pomoći u toku rada.

Zahvaljujem dru Sergeju Kvederu, višem naučnom suradniku Instituta »Ruđer Bošković«, na spektrofotometrijskim mjerenjima.

Z a k l j u č a k

Kromatografska ispitivanja na Whatmanovu papiru br. 1 i tankom sloju silika gela i aluminijske oksida metanolskog ekstrakta ljute koprive (*Urtica pilulifera*) pokazala su da ova biljka sadržava 5-hidroksitriptamin. Spektrofluometrijskim mjerenjima nađeno je da njegova količina iznosi 0.4 µg po gramu svježe tvari. Histokemijska reakcija sa p-dimetilaminocimtaldehidom upozorava na to da je 5-hidroksitriptamin lokaliziran prvenstveno u dlakama žeravkama.

L i t e r a t u r a

- Bowden, K., Brown, B., and Batty, J., 1954: 5-Hydroxytryptamine: its Occurrence in Cowhage. *Nature*, 174, 925.
- Bruce, D., 1960: Serotonin in Pineapple. *Nature*, 188, 147.
- Collier, H., and Chesher, B., 1956: Identification of 5-Hydroxytryptamine in the Sting of the Nettle (*Urtica dioica*). *Brit. J. Pharmacol.*, 11, 186—188.
- Kirberger, E., und Braun, L., 1961: Über das Vorkommen von 5-Hydroxytryptamin in der Walnuss (*Juglans regia*). *Biochem Biophys. Acta*, 49, 391—393.
- Tyler, V., 1958: Occurrence of Serotonin in Hallucinogenic Mushroom. *Science*, 128, 718—719.
- Udenfriend, S., Weissbach, H., and Clark, C., 1955: The Estimation of 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) in Biological Tissues. *J. Biol. Chem.*, 215, 337—344.
- Waalkes, P., Sjoerdsma, A., Creveling, R., Weissbach, H., and Udenfriend, S., 1958: Serotonin, Norepinephrine and Related Compounds in Bananas. *Science*, 127, 648.
- West, G., 1958: Tryptamines in Edible Fruits. *J. Pharm. and Pharmacol.*, 10, 589—591.

SUMMARY

OCCURRENCE OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE IN THE ROMAN NETTLE (*URTICA PILULIFERA*)

Ivan Regula

(Botanical Institute, University of Zagreb)

Leaves and stems of the Roman nettle (*Urtica pilulifera*) were frozen, macerated in a blender in 80% methanol at 5°C, and the plant material repeatedly extracted with methanol for 22 hrs at +2 °C. The separation of the basic compounds was achieved on a Amberlite CG-50 column. The identification of 5-hydroxytryptamine was based on Rf-values (compared to those of an authentic sample of 5-hydroxytryptamine), colour reactions with several reagents and fluorescence characteristics. The amount found was 0.4 µg/g of fresh weight. Histochemical investigations with p-dimethylamino-cinnamaldehyde indicate that 5-hydroxytryptamine is located mainly in the stings.

Ivan Regula, mr biol.
Odjel za fiziologiju bilja
Institut za botaniku
Sveučilišta u Zagrebu
Rooseveltov trg 6/III
Zagreb (Jugoslavija)