

## IDENTIFIKACIJA SEROTONINA U VRSTE *ELAEAGNUS UMBELLATA* THUNB.

With Summary in English

IVAN REGULA

(Institut za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Primitljeno 3. 2. 1972.

### Uvod

Istražujući alkaloide u nekim vrstama roda *Elaeagnus*, našao je Massagetov (1946) u kori relativno velike količine alkaloida koji je s obzirom na biljke, u kojima je nađen, nazvao elaeagnin. Daljnim istraživanjima njegove strukture Menshikov, Gurevich i Samsonova (1950) ustanovili su da se radi o indolskom derivatu tetrahidroharmanu. Malo zatim su Petrova i Menshikov (1961) te Petrova, Krants i Menshikov (1964) našli u kori *Hippophaë rhamnoides* indolski spoj serotonin (5-hidroksitriptamin). Kako rodovi *Elaeagnus* i *Hippophaë* pripadaju istoj porodici, to je nalaz ovog biogenog amina kod roda *Hippophaë* bio povod za ispitivanje njegove nazočnosti u vrste *Elaeagnus umbellata*.

### Ekperimentalni dio

Zasebno su ekstrahirani lišće, kora i sjemenke vrste *Elaeagnus umbellata*. Kora i lišće homogenizirani su u hladnom 80% metanolu, dok su sjemenke smrvljene i zatim ekstrahirane hladnim 80% metanolom.

Ekstrakcija uz povremeno mućkanje vršena je pri +2 °C.

Metanolni ekstrakt odvojen je odsisavanjem, a biljnom materijalu dodano je ponovno otapalo te je ekstrakcija ponovljena nekoliko puta. Na kraju su svi dobiveni ekstrakti lišća te posebno kore i sjemenki, svaki zasebno, spojeni i upareni pod blagim uvjetima (temp. vod. kupelji +33 °C, i vakuum 18 mm Hg) na mali volumen.

Ekstrakti lišća izmućkavani su petroleterom kojim su uklonjene biljne boje i lipofilne supstancije.

Ekstrakti su zatim puštani preko ionskog izmjenjivača amberlita CG-50 u formi  $\text{NH}_4^+$  u kojoj je bio pripremljen s 0,2 M amonijevim acetatom (pH 7,5). Organske kiseline, soli i aminokiseline eluirane su sa stupca s 10 ml 0,02 M amonijevog acetata (pH 7,5), a zatim je bazna supstancija, koja se absorbira na ionskom izmjenjivaču, eluirana s 6 ml 1 N solne kiseline.

Dio solnokiselog eluata je ispitivan na spektrofotofluorimetru Far- rand Mk-1, a dio uparen do suha i ostatak otopljen u malo acetona te ispitivan kromatografijom na Whatman papiru br. 1 i tankim slojevima silika gela i aluminijevog oksida u kiselim, neutralnim i baznim otapalima.

Identifikacija je vršena s različitim reagensima na indolske spojeve (tabela 1).

Za histokemijska ispitivanja uzimani su mikroskopski tanki presjeci kore, sjemenke i poprečni presjeci lista na koje je stavljen 6% p-dimetilaminobenzaldehid u konc. solnoj kiselini.

### Rezultati i diskusija

U metanolskim ekstraktima vrste *Elaeagnus umbellata* primijećena je samo jedna supstancija koja s Ehrlichovim reagensom, p-dimetilaminocimtaldehidom (DMCA) i ksantidrolom daje modro obojenje, što upućuje na njezinu indolsku strukturu. Ljubičasto obojenje s 1-nitrozo-2-naftolom, specifičnim reagensom na hidroksilnu skupinu u položaju 5 indolske jezgre, te karakteristična fluorescencija (žuto), dobivena nakon reakcije s Jepson-Stevensonovim reagensom, upozorava na to da se radi o 5-hidroksitriptaminu. U prilog tome govore i  $R_f$  vrijednosti papirne i tankoslojne kromatografije u kiselim, neutralnim i baznim otapalima (tabela 1).

Spektrofotofluorimetrijska analiza supstancije iz vrste *Elaeagnus umbellata* u jakoj kiselini (3 N HCl) pokazuje da se aktivacijski spektar (maksimum kod 295 nm) kao i fluorescentni spektar (maksimum kod 545 nm) podudaraju sa spektrima sintetskog serotonina.

Ustanovljeno je da su ovim biogenim aminom najbogatiji ekstrakti sjemenki (524  $\gamma$ /g svježe tvari), manje ekstrakti lišća (97  $\gamma$ /g), a najmanje ga ima u kori (15,7  $\gamma$ /g).

Histokemijskim ispitivanjima nađeno je da u listovima serotonin dolazi samo u stanicama donje epiderme, iznad kojih se nalaze gusto poredane T dlake, dok ga u presjecima peteljke lista nalazimo u epidermalnim i parenhimskim stanicama. U kudikamo najvećoj količini dolazi ovaj biogeni amin u kotiledonima u sjemenci što je do sada bilo poznato jedino za orah (Kirberger i Braun 1961). Za histokemijska ispitivanja pokazao se pogodnijim modificirani Ehrlichov reagens (6% p-dimetilaminobenzaldehid u konc. solnoj kiselini).

### Zaključak

Ispitivanja metanolskih ekstrakata lišća, kore i sjemenki vrste *Elaeagnus umbellata* metodama papirne i tankoslojne kromatografije pokazala su da ova biljka sadržava serotonin. Spektrofotofluorimetrijskim mjere-

Tabela 1 — Table 1

Rf vrijednosti i obojene reakcije supstancije iz biljke *Elaeagnus umbellata* i uzorka 5-hidroksitriptamina  
 Rf Values and Colour Reactions of Compound from the *Elaeagnus umbellata* and sample of 5-Hydroxytryptamine

Supstancija Substance	Papirna kromatografija Rf u otapalu*		Tankoslojna kromatografija				Reagensi Reagents		I	II	III	IV	V	VI
	Paper chromatography Rf in solvent system*		Thin layer chromatography											
	1	2	3	4	5	6	6 <sup>+</sup>	7 <sup>+</sup>						
Supstancija iz b. <i>E. umbellata</i>	0.48	0.52	0.36	0.62	0.09	0.66	0.80	0.13	m.	m.	m.	lj.	lj.	lj.
Compound from the <i>E. umbellata</i>	0.48	0.52	0.36	0.62	0.08	0.66	0.81	0.13	m.	m.	m.	lj.	lj.	lj.
5-hidroksi- triptamin														
5-Hydroxy- tryptamine														

- \* 1. n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (60 : 15 : 25)  
 2. izo-PropOH-NH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (10 : 1 : 1)  
 3. n-BuOH-EtOH-H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 1)  
 4. MeOH-BuOH-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>-H<sub>2</sub>O (4 : 2 : 2 : 2)  
 5. Dest. H<sub>2</sub>O (35 : 20 : 45)  
 6. izo-PropOH-NH<sub>3</sub>-EtAc (1 : 1)  
 7. CHCl<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>
- + SiO<sub>2</sub> G  
 ++ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> G
- I = Ehrlich-ov  
 II = p-N, N-Dimetilaminocimtaldehid  
 III = Ksanthidrol  
 IV = l-Nitrozo-2-naftol  
 V = Ninhidrin  
 VI = Jepsonov i Stevensonov
- m. = modra — blue  
 lj. = ljubičasta — violet

njima nađeno je da njegova količina varira ovisno o tkivu. tako ga nalazimo u lišću (97  $\gamma/g$ ), kori (15,7  $\gamma/g$ ) i najviše u sjemenci (524  $\gamma/g$  svježe tvari).

Histokemijskim ispitivanjima p-dimetilaminobenzaldehidom nađeno je da u listovima dolazi u stanicama donje epiderme, primarnoj i sekundarnoj kori stabljike i u sjemenkama (u kotiledonima).

•

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

Zahvaljujem dru Sergiju Kvederu, višem naučnom suradniku Instituta »Ruđer Bošković«, na susretljivosti prilikom spektrofotofluorimetrijskih mjerenja i korisnim sugestijama.

### Literatura — References

- Kirberger, E., und Braun, L., 1961: Über das Vorkommen von 5-Hydroxytryptamin in der Walnuss (*Juglans regia*). Biochim. Biophys. Acta, 49, 391—393.
- Massagetov, S., 1946: Alkaloidi v rastenijah semejstva *Elaeagnaceae*. Zh. Obsch. Khim., 16, 139—140.
- Menshikov, G., Gurevich, E., and Samsonova, E., 1950: Alkaloids of *Elaeagnus angustifolia*. Structure of elaeagnine. Zh. Obsch. Khim., 20, 1927—1930.
- Petrova, M., Menshikov, G., 1961: Isledovanie osnovanii kori *Hippophaë rhamnoides*. Videlenie 5-oksitriptamina (serotonina). J. Obsch. Khim., 31, 2413—2415.
- Petrova, M., Krants, P., and Menshikov, G., 1964: Serotonin from the bark of *Hippophaë rhamnoides*. Zh. Prikl. Khim., 37, (12) 2763—2764.

### SUMMARY

#### IDENTIFICATION OF SEROTONIN IN *ELAEAGNUS UMBELLATA* Thunb.

Ivan Regula

(Botanical Institute of the University of Zagreb)

The leaves, the bark of the stem and the cotyledons of *Elaeagnus umbellata* were homogenized in 80% methanol in a blender. The plant material was repeatedly extracted with methanol at + 2°C. The separation of the basic compounds was achieved on an Amberlite CG-50 column. The identification of serotonin was based on comparisons of R<sub>f</sub> values, of color reactions and fluorescence characteristics with the authentic sample of 5-Hydroxytryptamine.

Histochemical investigations with 6% p-Dimethylaminobenzaldehyde in conc. HCl indicate that serotonin is located in the lower epidermis of the leaf, in the primary and the secondary cortices of the stem, and in the seeds (in the cotyledons).

Ivan Regula, mr biol.  
Institut za botaniku  
Odjel za fiziologiju  
Sveučilišta u Zagrebu  
Rooseveltov trg 6/III, p.p. 933  
41001 Zagreb (Jugoslavija)