

J. ST. KNYPL

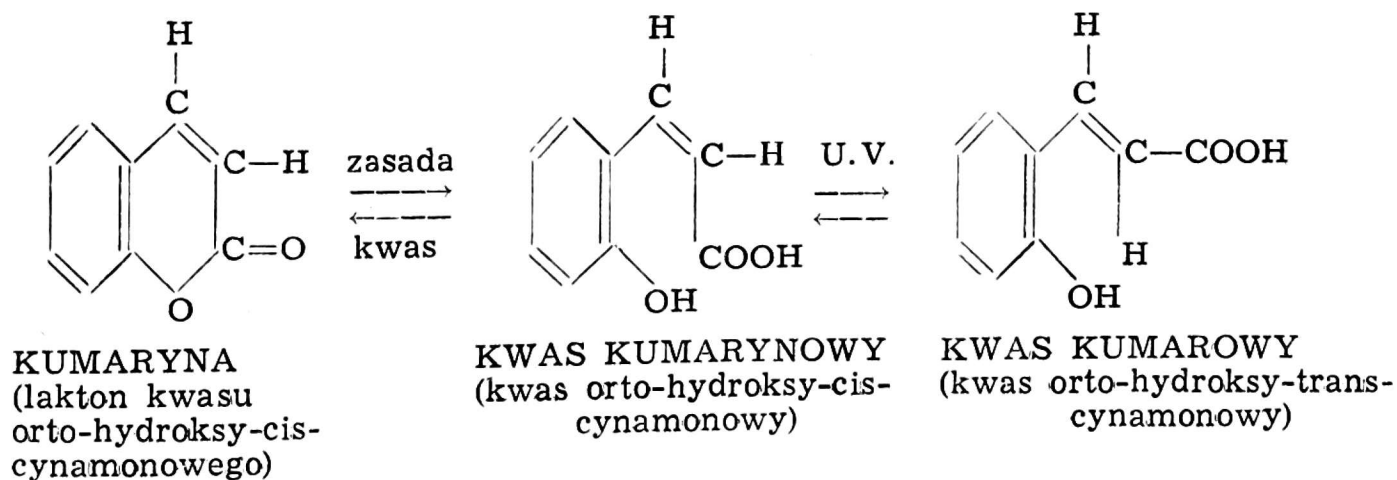
Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

## METODY WYKRYWANIA I ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA WOLNEJ I ZWIĄZANEJ KUMARYNY W ROŚLINACH UPRAWNYCH

Charakterystyczny, lekko odurzający zapach świeżo skoszonego siana spowodowany jest obecnością kumaryny. Z gospodarczego punktu widzenia występowanie tej substancji jest szkodliwe, ponieważ nadając gozki smak obniża jakość paszy, a pewne jej pochodne, powstające przy niewłaściwym przechowywaniu siana z nostrzyka, mogą wywołać u bydła tak zwaną „chorobę koniczyny słodkiej”. Stąd też, przed około trzydziestu laty rozpoczęto szeroko zakrojone prace (szczególnie w Stanach Zjednoczonych, ZSRR i Kanadzie) nad wyhodowaniem odmian nostrzyka całkowicie wolnych od kumaryn, lub przynajmniej ze znacznie obniżoną ich zawartością. Oczywiście jest, że przy tego rodzaju pracach należy dokonać tysięcy analiz, co wymaga opracowania szybkich i tanich metod jakościowego wykrywania i ilościowego oznaczania interesującego nas związku.

Prace tego rodzaju prowadzi się również w Polsce i wydaje się celowe przedyskutowanie istniejących metod oznaczania kumaryny, celem dokonania najbardziej właściwego wyboru.

Kumaryna pod względem chemicznym jest laktonem kwasu orto-hydroksy-cis-cynamonowego, zwanego również kwasem kumarynowym



Rys. 1

(rys. 1). Kwas ten w postaci krystalicznej nie istnieje wskutek silnie zaznaczonej tendencji do tworzenia wewnętrznego bezwodnika (kumaryny); łatwo jednak można otrzymać jego sole poprzez zalkalizowanie roztworów

kumaryny wodorotlenkiem sodowym lub potasowym, przy czym reakcja jest odwracalna: przy zakwaszeniu środowiska odtwarza się z powrotem cząsteczka kumaryny.

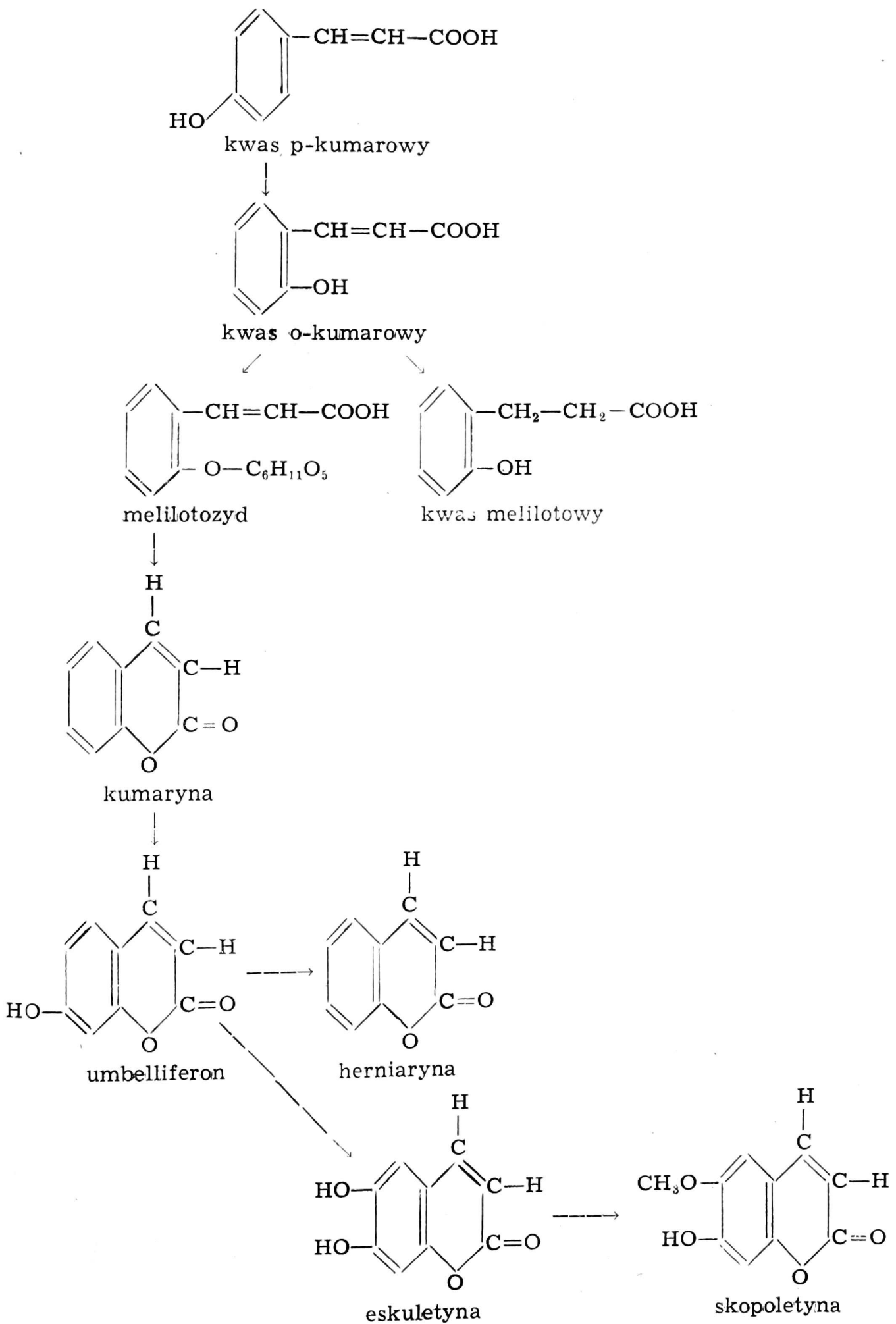
Jeżeli na alkaliczne roztwory kumaryny (a raczej powstałych z niej odpowiednich soli kwasu kumarynowego) działa się światłem ultrafioletowym (U. V.) o długości fali około  $360\text{ m}\mu$  to wskutek wewnętrznego przegrupowania (interkonwersji) powstają odpowiednie sole kwasu orto-hydroksy-trans-cynamonowego (tradycyjna nazwa: kwas kumarowy), przy czym przejściu temu towarzyszy zmiana barwy roztworu na zielonkawą. Kwas kumarowy jest trwały i pod U. V. wykazuje charakterystyczną, silnie zaznaczoną zielono-żółtą fluorescencję.

Z roślin produkujących kumarynę (*Melilotus*, *Asperula*, *Trigonella* itd.) zazwyczaj można wyizolować szereg jej pochodnych, z których najważniejsze przedstawiono na rys. 2. Niestety, omówienie wszystkich naturalnie występujących kumaryn nie mieści się w ramach niniejszego przeglądu i temat zostanie zawężony tylko do samej kumaryny.

Z chwilą wyhodowania odmian nostrzyka ubogich w kumarynę i opracowania odpowiedniej metodyki badawczej okazało się, że w roślinach oprócz wolnej kumaryny istnieje jeszcze jakiś związek (lub związki) przechodzące w kumarynę (2, 17, 31, 35), przy czym bardziej wnikliwe badania wykazały, że frakcja kumaryny związanej zwykle wielokrotnie przewyższa frakcję kumaryny wolnej (30, 32).

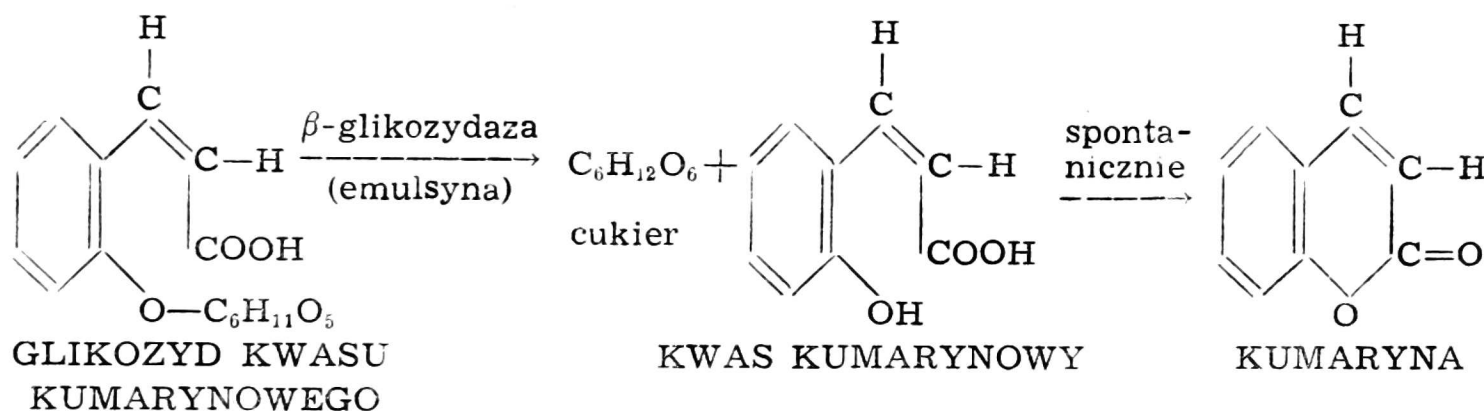
Celem poznania natury tego połączenia, liście *Melilotus albus* zadawano wrzącym alkoholem etylowym, homogenizowano, odwirowywano i płyn nad osadu odparowywano (30, 32). Suchą pozostałość, po rozpuszczeniu w wodzie, wytrząsano z eterem celem usunięcia lipidów i wolnej kumaryny i tak otrzymany ekstrakt nakraplano na bibułę chromatograficzną Whatman nr 1 i rozwijano w mieszaninie Partridge'a (butanol — kwas octowy — woda 4 : 1 : 5). Po spryskaniu roztworem wodorotlenku sodowego i podgrzaniu przez 3 minuty do  $100^{\circ}\text{C}$ , na bibule pod światłem ultrafioletowym zaobserwowano silnie zielono-żółto fluoryzującą plamę o wartości  $R_f = 0,72$  (wolna kumaryna fluoryzuje natychmiast po spryskaniu NaOH i w tym systemie chromatograficznym posiada wartość  $R_f = 0,95$ ). Jeżeli taką plamę, po wyeluowaniu etanolem, hydrolizowano w obecności kwasu solnego, to z próbki już po kilku minutach zaczynał wydzielać się charakterystyczny zapach kumaryny; na chromatogramach zhydrolizowanej próbki wykryto jedną plamę o właściwościach identycznych z kumaryną i drugą, którą na podstawie reakcji barwnych zidentyfikowano jako cukier z grupy heksoz.

Tak więc frakcja kumaryny związanej ma naturę glikozydową, za czym przemawia również fakt uwalniania z niej kumaryny po zadziałaniu roztworem emulsyny ( $\beta$ -glikozydaza wyizolowana ze słodkich migdałów).



Rys. 2. (wg Reppel i Wagenbreth, 1958)

Jednak kumaryna nie posiada wolnej grupy wodorotlenowej, a więc jako taka nie może przyłączyć reszty cukrowej i prawdopodobnie mamy tutaj do czynienia z glikozydem kwasu kumarynowego, podobnie jak to ma miejsce w wypadku meilotozydu, wyizolowanego w 1925 r. przez Charraux'a (4); resztą cukrową jest prawdopodobnie glukoza. Przy rozpadzie z glikozydu uwalnia się kwas kumarynowy, który natychmiast daje cząsteczkę kumaryny (rys. 3).



Rys. 3

Zaznaczyć należy, że wiązanie glikozydowe nie jest zbyt mocne i może dojść do jego zerwania pod wpływem różnych czynników zewnętrznych; obserwuje się również powolny, spontaniczny rozpad frakcji kumaryny związanej (30), ponieważ eterowy wyciąg z nostrzyka bezkumarynowego (nie fluoryzujący pod U. V.), zaczyna intensywnie fluoryzować po 12-godzinnym przetrzymywaniu w temperaturze 26° C, oczywiście po uprzednim naświetleniu ultrafioletem.

Niezmiernie ważny jest fakt, iż w liściach nostrzyka występuje bardzo aktywna  $\beta$ -glikozydaza, działająca na frakcję kumaryny związanej. Należy ona do enzymów stosunkowo opornych na denaturujące działanie czynników zewnętrznych: wykazano, że jest czynna jeszcze przez kilkanaście minut od zadania liści 80% alkoholem etylowym, co oczywiście powoduje, iż uzyskiwane wyniki są zawyżone na korzyść kumaryny wolnej.  $\beta$ -glikozydaza jest bardzo wrażliwa na zakwaszenie i w roztworach kwaśnych ulega momentalnej inaktywacji.

Obecność  $\beta$ -glikozydazy tłumaczy rozbieżności otrzymywane przy analizie materiału zwiędłego lub suchego. Przy wędnięciu bowiem i suszeniu następuje destrukcja normalnych struktur cytoplazmatycznych, co stwarza sprzyjające warunki do zetknięcia się enzymów ze specyficznymi dla nich substratami, czyli, w naszym wypadku, umożliwiające zostaje zetknięcie się glikozydazy z glikozydem kwasu kumarynowego; w wyniku uwalnia się kumaryna, której ilość będzie proporcjonalna do czasu działania enzymu, a ten z kolei uwarunkowany jest szybkością, z jaką przebiega proces suszenia. Tak więc przy suszeniu wolnym (dłuższy czas działania enzymu) otrzyma się wyniki wyższe niż przy suszeniu gwałtownym,



przy założeniu, że uwzględni się poprawkę na straty spowodowane sublimacją kumaryny w temp. podwyższonej (13, 30). Spostrzeżenia te tłumaczą pozornie dziwny fakt, że nostrzyk wykazuje charakterystyczny zapach dopiero po uszkodzeniu tkanki.

Z teoretycznego i praktycznego punktu widzenia nie jest obojętne, w jakiej postaci w danym egzemplarzu nostrzyka występuje kumaryna. Prawdopodobnie bowiem zdolność do produkcji kumaryny znajduje się pod kontrolą dwu par alleli, oznaczonych jako Cu/cu i B/b (14, 17), przy czym homozygota b (fenotyp bb) zapobiega produkcji i nagromadzeniu się kumaryny wolnej, a obecność genów cu (fenotyp cucu) daje w efekcie znaczne zmniejszenie poziomu kumaryny całkowitej (wolnej i związanej). I tak, rośliny o fenotypie CuB zawierają duże ilości kumaryny tak wolnej, jak i związanej, rośliny o fenotypie Cub zawierają kumarynę związaną, ale za to bardzo mało wolnej, a rośliny o fenotypach cuB i cub są ubogie w obie formy kumaryn. Zależność tę przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Zawartość kumaryny w liściach nostrzyków reprezentujących cztery fenotypy (wg Haskins i Gorz, 1957)

Fenotyp	Zawartość kumaryny w przeliczeniu na suchą masę	
	wolna % średnio ±	związana % średnio ±
Cu B	1,28 ± 0,136	2,21 ± 0,107
Cu b	0,03 ± 0,001	5,02 ± 0,376
cu B	0,08 ± 0,018	0,08 ± 0,017
cu b	0,02 ± 0,002	0,16 ± 0,013

Ważne jest również, jaki rodzaj tkanki bierze się do analizy, ponieważ poziom kumaryny w różnych tkankach tej samej rośliny jest różny, co ilustruje tabela 2.

Najwięcej kumaryny znajduje się w młodych, dopiero co rozwiniętych listkach górnych pięter rośliny i w pączkach kwiatowych, znacznie mniej w liściach dojrzałych, a najmniej w łodygach i korzeniu.

Jak wynika z powyższych uwag, przy ocenie istniejących metod oznaczania kumaryny należy zwracać uwagę nie tylko na sam sposób pomiaru ale, w głównej mierze, na sposób pobierania próbki do analizy, na rodzaj ekstrakcji i dalszą procedurę przygotowania wyciągu do analizy. Od właściwej ekstrakcji wymaga się, aby, oprócz całkowitej elucji, umożliwiła oznaczenie obu frakcji kumaryny oddzielnie, a więc aby do minimum sprowadziła destrukcję materiału spowodowaną działaniem czyn-

Tabela 2

Zawartość kumaryny (świeża masa) w różnych częściach ośmiu roślin nostrzyka w pierwszym roku wzrostu w polu (wg Goplen i wsp., 1956)

Badana część rośliny	Procent kumaryny							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Młode liście z wierzchołka głównej łodygi	76	51	86	76	76	66	15	64
Młode liście z wierzchołka odgałęzienia 1	77	56	85	78	77	62	11	53
Młode liście z wierzchołka odgałęzienia 2	80	51	87	81	39	61	15	58
Młode liście z wierzchołka odgałęzienia 3	81	56	84	77	71	70	14	57
Liście ze środka rośliny	20	55	06	07	0	06	01	04
„ z niższych części	24	16	03	03	05	02	01	06
Łodyga — część górna	33	34	42	35	32	41	27	19
„ „ dolna	09	02	04	04	03	03	02	04
Pąki kwiatowe	44	43	49	56	53	51	30	50
Korzeń	08	15	05	21	08	17	06	07

ników zewnętrznych, oraz aby natychmiast unieczynniała aktywne systemy enzymatyczne; od procedury przygotowania ekstraktu do analizy wymaga się, aby w maksymalnym stopniu wykluczyła z roztworu pigmenty roślinne i inne związki reagujące podobnie jak kumaryna, a tym samym mogące wpływać na wynik oznaczenia.

### Metody oksydoredukcyjne i grawimetryczne

Historycznie pierwszą metodę oznaczania kumaryny podał Obermayer (25), przy czym doczekała się ona kilku modyfikacji (8, 9, 11) dotyczących głównie sposobu ekstrakcji materiału roślinnego.

Zasadą metody jest utlenienie kumaryny nadmanganianem potasowym z następnym obliczeniem jej ilości na podstawie zużytego utleniacza według wzoru:



Przystępując do wykonania oznaczenia (8, 9, 11) na dnie kolby destylacyjnej umieszcza się 5 g powietrznie suchego materiału, wlewa 70—80 ml gorącej wody i zamyka korkiem zaopatrzonym w rurkę szklaną doprowa-

dzającą parę wodną i w kapilarę do destylacji próżniowej. Do bocznej rurki odprowadzającej destylat podłącza się chłodnicę wodną zaopatrzoną w odbieralnik umieszczony w lodzie i całość zestawu uzupełnia się podłączając wodną pompę próżniową i manometr rtęciowy (19). Następnie umieszcza się kolbę destylacyjną na wrzącej łaźni wodnej i równocześnie przepuszcza przez nią parę wodną; gdy po 1—2 minutach zawartość kolby zaczyna silnie wrzeć, włącza się pompę próżniową, zamykając jednocześnie dopływ pary wodnej i destylację przeprowadza się przez 10—12 min. przy 140 mm Hg. Po pierwszej destylacji do kolby wsysa się ponownie 70—80 ml wody i procedurę destylacji powtarza się 6 razy, po czym destylaty przenosi się do litrowej kolby miarowej i dopełnia do kreski wodą.

Tak otrzymany destylat zawiera szereg zanieczyszczeń mogących przeszkadzać we właściwym oznaczeniu (lotne związki fenolowe w ilości 5—8%) i należy je usunąć. Dokonuje się tego przez wytrącenie ołowiem.

Do 50 ml destylatu dodaje się 4 ml 0,25 M octanu ołowiu i pozostawia próbkę przez noc. Na drugi dzień rano nadmiar octanu ołowiu wytrąca się dodając 6,5 ml 0,17 M roztworu fosforanu dwuzasadowego, miesza, po upływie pół godziny dodaje 25 ml 20% roztworu siarczanu cynkowego i po czterech godzinach wytrącony osad odwirowuje (równolegle wszystkie operacje przeprowadza się na próbce kontrolnej, tzw. „ślepa” odczynnikowa).

Z tak przygotowanej próbki pobiera się 25 ml płynu (zawartość kumaryny około 0,005 g), dodaje 25 ml 20% roztworu siarczanu cynkowego (katalizator przyspieszający reakcję utlenienia) i 25 ml 0,1 N roztworu nadmanganianu potasowego i dopełnia wodą do objętości około 150 ml. Roztwór podgrzewa się do wrzenia przez 10 minut i na gorąco filtruje przez sączek Goocha lub porcelanowy lejek z cienką warstewką azbestu i przemywa gorącą wodą aż do momentu, gdy ściekające krople staną się bezbarwne. Do filtratu dodaje się 25 ml 0,1 N roztworu kwasu szczawowego i 25 ml 2 N kwasu siarkowego i po odbarwieniu podgrzewa do 60—70° C, po czym nadmiar kwasu szczawowego odmiareczkowuje się nadmanganianem potasowym.

Celem otrzymania dokładnych wyników należy razem z próbką właściwą przeprowadzić oznaczenie kontrolne (ślepa odczynnikowa), do którego używa się wszystkich odczynników z wyjątkiem destylatu, zamiast którego dodaje się ekwiwalentną ilość wody.

Zawartość kumaryny w procentach masy użytego do analizy materiału oblicza się według wzoru:

$$x = \frac{1,04835 \cdot 100 \ T k a b}{g \cdot w}$$

gdzie:  $T$  = miano 0,1 N roztworu  $\text{KMnO}_4$  w przeliczeniu na kumarynę, równe 0,0002306 g;

$a$  = ilość ml 0,1  $\text{KMnO}_4$  zużytego do miareczkowania;

$k$  = poprawka na normalność;

$b$  = objętość wyjściowego roztworu kumaryny (destylatu);

$g$  = ilość ml roztworu kumaryny wziętego do analizy;

$w$  = waga (w gramach) powietrznie suchego materiału wziętego do analizy;

1,04835 = współczynnik przeliczeniowy na 100% kumaryny.

Empiryczny współczynnik przeliczeniowy (1,04835) jest konieczny, ponieważ metodą Obermayer'a oznacza się tylko  $\pm 94\%$  obecnej w roztworze kumaryny.

Jak wynika z opisu, przytoczona modyfikacja metody Obermayer'a jest niezwykle praco- i czasochłonna a otrzymane wyniki obarczone są poważnym błędem wynikającym tak z zastosowanego sposobu ekstrakcji, jak i z samej procedury ilościowego oznaczenia, przy czym już fakt stosowania do analizy materiału powietrznie suchego staje się przyczyną strat kumaryny wskutek sublimacji (13); prawdopodobieństwo popełnienia błędu rośnie następnie z każdą manipulacją. Zważywszy na dodatek, że metoda wymaga stosunkowo dużych ilości materiału i pozwala jedynie na oznaczenie ogólnej sumy kumaryn, należy uważać ją raczej za nieodpowiadającą wymogom mikroanalizy, a już w żadnym wypadku nie nadającą się do oznaczeń masowych.

Dla ścisłości zaznaczyć należy, że w oryginalnej metodzie Obermayer'a stosuje się ekstrakcję eterem z następną destylacją kumaryny z nad roztworu chlorku wapniowego, co wprawdzie skraca czas analizy, ale zwiększa błąd pomiaru.

Takie same błędy popełnia się stosując grawimetryczną metodę oznaczania kumaryny opracowaną przez Kanewską i Fedorową (21), która w dodatku daje frakcje wybitnie zanieczyszczone barwnikami roślinnymi i kwasami organicznymi.

### *Metody kolorymetryczne*

Do drugiej grupy należy zaliczyć metody kolorymetryczne, oparte na pomiarze intensywności zabarwienia produktu reakcji fenoli z dwuazo-para-nitroaniliną. Należy zaznaczyć, że reakcja nie jest specyficzna, a więc szczególnie troskliwie należy oczyszczać ekstrakty, tak aby w roztworze analizowanym obecna była tylko kumaryna. Reakcja ta do oznaczania kumaryny w nostrzyku została po raz pierwszy zastosowana przez Clayton'a i Larmour'a (5) lecz podana przez autorów procedura nie gwarantowała zupełnej eliminacji substancji reagujących podobnie, a ozna-



czenie przeprowadzano w warunkach sprzyjających interferującemu wpływowi barwików roślinnych; metoda została ulepszona przez Roberta i Linka (28, 29) i w takiej postaci zostanie podany jej krótki opis.

**A p a r a t u r a i o d c z y n n i k i:**

Aparat ekstrakcyjny do układu ciecz-ciecz.

Kolorymetr, fotometr lub komparator.

Eter naftowy — punkt wrzenia nie wyżej niż 40°C.

Eter etylowy — przemyty 3 razy małymi porcjami wody celem odzucenia resztek alkoholu.

Roztwór ekstrakcyjny — 9 obj. 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1 obj. acetonu.

Wzorcowe roztwory kumaryny, kwasu kumarowego i kwasu melilotowego, każdy zawierający 0,1 mg danego związku w ml.

**R o z t w ó r A** — chlorowodorek para-nitroaniliny. Rozpuścić 3,5 g p-nitroaniliny w 45 ml kwasu solnego stężonego, dopełnić wodą do 500 ml i przefiltrować. Roztwór trwały pod zamknięciem.

**R o z t w ó r B:** Rozpuścić 5 g azotynu sodu w 100 ml wody. Przechowywać w ciemności i często odnawiać.

**R o z t w ó r d w u a z o n i o w y:** na łaźni lodowej umieszcza się 100 ml kolbkę miarową i roztwór A i B. Gdy roztwory osiągną temperaturę około 0°C, przenosi się 3 ml roztworu A i 3 ml roztworu B do kolby i po zmieszaniu oziębia przez 5 minut, po czym dodaje się jeszcze 12 ml roztworu B, miesza i znów chłodzi przez 5 minut. Następnie roztwór dopełnia się lodowato zimną wodą i zdejmuje z lodu na 15 minut przed oznaczeniem. Roztwór trwały przez 24 godziny.

Wzorce sporządza się dodając do kolby miarowej na 50 ml odpowiednią ilość roztworu standardowego 4—20 µg/ml/5 ml 1% roztworu węgla sodowego i dopełnia wodą destylowaną do około 40 ml i podgrzewa przez 15 minut do temp. 85°C (wzorców kwasu kumarowego i melilotowego nie podgrzewa się). Po ostudzeniu do kolbki dodaje się 5 ml roztworu dwuazoniowego, dopełnia wodą do kreski i pozostawia na 2 godz. Po upływie tego czasu barwa osiąga maksimum intensywności i roztwór nadaje się do pomiarów; raz przygotowany wzorzec można używać kilka dni, ponieważ barwa jest trwała.

Przy analizie około 3 g drobno pociętej tkanki (lub 1,5 g nasion) waży się z dokładnością do 1 mg i przenosi do 100 mililitrowych kolbek zawierających dokładnie 50 ml roztworu ekstrakcyjnego, zatyka korkiem i wytrząsa. W międzyczasie przeprowadza się oznaczenie stopnia wilgotności badanego materiału i po jego obliczeniu pipetką dodaje się do kolby tyle roztworu ekstrakcyjnego, aby ogólna ilość płynu wynosiła 25 ml na 1 g tkanki, dodaje się szczyptę suchego azbestu, zamyka korkiem i wytrząsa



przez 24 godziny. Następnie próbkę sączy się przez lejek Büchnera z filtrem bibułowym i azbestowym i 50 ml klarownego filtratu przenosi się do apartu ekstrakcyjnego i ekstrahuje przez 2 godziny eterem etylowym; potem warstwę eterową przenosi się do kolbki, dodaje 20 ml wody i odparowuje ostrożnie na łaźni wodnej (temp. 50—55°C). Po odparowaniu eteru całość podgrzewa się do 70°C celem rozpuszczenia substancji wodoro-rozpuszczalnych, chłodzi i filtruje; przesącz według autorów nazywany jest „roztworem do analizy”.

Roztwór do analizy oprócz kumaryny zawiera również kwas kumarowy i kwas melilotowy; celem oddzielenia kumaryny dodaje się do niego 0,5 ml 5N roztworu NaOH, gotuje do wrzenia, chłodzi, dodaje 0,75 ml 5N roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, potem 0,25 g NaHCO<sub>3</sub> (pH lekko alkaliczne) i ekstrahuje 3 godziny eterem naftowym; po dodaniu 20 ml wody odparowuje się eter naftowy na łaźni wodnej i całość dopełnia wodą do 50 ml. Wywołując barwę pobiera się 25 ml tego roztworu, dodaje 5 ml 1% roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, podgrzewa przez 15 minut do 85°C, chłodzi i dodaje 5 ml roztworu dwuazoniowego: kumaryna daje piękny, malinowy kolor, którego natężenie autorzy oceniali wizualnie w komparatorze.

Pozostałe kwasy oznacza się oddzielnie.

Metodę Roberts'a i Link'a krytycznej analizie poddali Behr, Hülsmann i Thilo (2), którzy oznaczenia przeprowadzali w fotometrze przy długości fali świetlnej 576 m $\mu$ . Przede wszystkim wnieśli oni poprawkę do sposobu ekstrakcji: zamiast ekstrahować materiał przez 24 godziny z wytrząsaniem i następną dwugodzinną ekstrakcją eterem etylowym, można materiał homogenizować, natychmiast filtrować i dopiero przesącz ekstrahować przez 24 godziny w aparacie ekstrakcyjnym.

Oprócz zaproponowanej w wersji oryginalnej ekstrakcji mieszaniną aceton-kwas siarkowy, autorzy wspomnianej pracy (2) zastosowali inny rodzaj ekstrakcji: tkankę roślinną po zadaniu alkoholem homogenizowano i po przesączeniu przenoszono do roztworu chlorku potasowego i przepuszczano przez kolumnę wypełnioną tlenkiem glinowym, celem odrzucenia chlorofilu, karotenoidów itp. (1), po czym taki alkoholowo-wodny wyciąg alkalizowano, zagęszczano przez odparowanie, zobojętniano HCl, dodawano nieznaczna ilość CaCO<sub>3</sub> (do pH 8) i 10—20 g CaCl<sub>2</sub> i wolną kumarynę oddestylowywano.

Przez porównanie zawartości kumaryny otrzymanych dla obu sposobów ekstrakcji okazało się, że przy ekstrakcji alkoholowej wartości były 2—4 razy większe (tabela 3). Początkowo sądzono, że spowodowane jest to tym, że przy ekstrakcji alkoholowej po prostu więcej kumaryny przechodzi z materiału roślinnego do roztworu. Bliższe badania wykazały co innego: jeżeli mianowicie ekstrakt acetonowo-kwasowy przed ekstrakcją eterem zneutralizowano i poddano destylacji, to wartości były równe wartościom

Tabela 3

Poziomy kumaryny w *Melilotus albus* otrzymane metodą  
destylacji i ekstrakcji (wg Behr i wsp. 1957)

Sucha masa (procent)	Procent kumaryny w przeliczeniu na suchą masę	
	ekstrakcja	destylacja
15,2	0,086	0,787
21,0	0,200	0,700
21,3	0,188	0,554
18,6	0,263	0,726
21,3	0,179	0,771

otrzymanym przy ekstrakcji alkoholowej. Okazało się również, że zwiększenie zawartości kumaryny łączyć należy nie tyle z samym procesem destylacji, ile ze związanym z nią podgrzewaniem: próbka podgrzewana przez kilka godzin pod chłodnicą zwrotną i poddana ekstrakcji eterem wykazywała teraz znacznie wyższe wartości niż przy destylacji (do 8 razy), a więc przy podgrzewaniu równym około 15 minut. Fakt ten naprowadził badaczy na myśl, że w wyciągach znajdują się jakieś związki, przechodzące wskutek hydrolizy (kwaśnej lub alkalicznej) w kumarynę; oczywiście, mamy do czynienia z kumaryną związaną.

W tym miejscu zaznaczyć należy, że Roberts i Link zdawali sobie sprawę z tego, iż w nostrzyku część kumaryny występuje w postaci labilnych połączeń (7), ulegających rozpadowi enzymatycznemu; dla uzyskania dokładniejszych wyników zalecają oni rozdrobniony materiał zadawać wodą i przetrzymywać przez 1 godzinę w termostacie o temperaturze 40° C.

Wracając do dyskusji nad metodą stwierdzić należy, że dla wzorcowych roztworów kumaryny otrzymuje się wyniki o bardzo dużym stopniu powtarzalności. W praktycznym zastosowaniu punktem słabym metody jest stosowanie materiału rozdrobnionego, a więc w pewnym stopniu zwiędłego, co powoduje enzymatyczny rozpad frakcji kumaryny związanej. Z drugiej strony zakwaszenie materiału prawie natychmiast unieczynnia  $\beta$ -glikozydazy, co uniemożliwia dalszy, enzymatyczny rozkład. W wyniku, w „roztworze do analizy” znajduje się pewna część kumaryny związanej, która podlega dalszemu rozpadowi przy podgrzewaniu z NaOH i Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; niestety warunki nie pozwalają na rozpad w 100% w wyniku czego otrzymuje się wartości pośrednie: za wysokie dla kumaryny wolnej, a za niskie dla ogólnego poziomu kumaryn.

Metodę, w modyfikacji Behr'a i wsp. można z powodzeniem stosować do oznaczeń porównawczych. W tym wypadku jednak należy ściśle przestrzegać tak sposobu rozdrabniania materiału, jak i czasu i temperatury, do której podgrzewa się roztwory.

Wydaje się, że lepsze wyniki daje sposób ekstrakcji stosowany przez Kosuge'a i Conn'a (23), według którego 5 g tkanki zamraża się płynnym azotem, traktuje gorącym 50% alkoholem etylowym (10 ml) przez 45 minut, filtruje i dodaje 2 ml 1 N roztworu NaOH. Alkaliczny roztwór podgrzewa się celem rozerwania pierścienia laktonowego, odparowuje alkohol i wytrząsa z eterem, który usuwa z roztworu żółte barwki roślinne; pozostałość (wodny roztwór) zakwasza się 1 N HCl i wytrząsa 3 razy z równymi objętościami eteru celem ekstrakcji zregenerowanej kumaryny. Do frakcji eterowej dodaje się następnie 1 ml 1 M roztworu izooctanu, eter odparowuje na łaźni wodnej, pozostałość rozcieńcza jedną objętością chloroformu i kumarynę oddziela od zanieczyszczeń drogą chromatografii na kolumnie z kwasu krzemowego; ostateczny ekstrakt nadaje się do analizy kolorymetrycznej.

Zasadę reakcji kumaryny z dwuazo-para-nitroaniliną wykorzystano również do jakościowego wykrywania kumaryny w badanym materiale (36).

Odrobinę powietrznie suchego materiału (nie więcej jak 0,01 g) umieszcza się w porcelanowej parownicze i rozciera z 20 ml 1,1% roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , podgrzewa do wrzenia, chłodzi i dodaje 0,5 ml roztworu dwuazoniowego. Przy zawartości w nostrzyku kumaryny ponad 0,2% momentalnie powstaje malinowo-czerwone zabarwienie, którego intensywność jest proporcjonalna do ilości kumaryny. Przy niskiej zawartości kumaryny (setne części procentów) powstaje barwa żółto-różowa przechodząca po 5—20 min. w żółtą.

Przy oznaczeniach pół-ilościowych należy brać zawsze tę samą ilość materiału i dodawać ściśle te same ilości odczynników.

### *Metody fluorymetryczne*

Jak wiadomo, pewne związki chemiczne poddane działaniu światła ultrafioletowego zaczynają emitować światło widzialne, a więc światło o dłuższej fali i mniejszym poziomie energetycznym. Właściwość tę określamy mianem fluorescencji. Jakość wysyłanego światła jest charakterystyczna dla danego związku, a jego natężenie w pewnym zakresie jest proporcjonalne do ilości substancji w próbce; zrozumiałe więc jest, że zjawisko fluorescencji znalazło szerokie zastosowanie w mikroanalizie.

Kumaryna poddana działaniu światła ultrafioletowego nie fluoryzuje — silnie natomiast fluoryzuje powstający z niej w określonych warunkach kwas kumarowy.

Uprzednio wspomniano, że kumaryna w roztworach alkalicznych przechodzi w kwas kumarynowy. Początkowo sądzono, że nieodzownym warunkiem reakcji jest podgrzanie (34, 37), później okazało się jednak,



że reakcja ilościowo zachodzi w temperaturze pokojowej (16, 26). Nie fluoryzujący kwas kumarynowy (forma cis) pod wpływem długotrwałego działania alkali lub pod wpływem ultrafioletu przechodzi w kwas kumarowy (forma trans), charakteryzujący się silną zielono-żółtą fluorescencją, przechodzącą niekiedy w odcień niebieski.

Szczegółowe analizy wykazały, że wprawdzie kumaryna przechodzi ilościowo w kwas kumarynowy, ale ten ostatni nie przechodzi w 100% w kwas kumarowy (33), lecz że ustala się pewna równowaga. Procentowa zawartość formy trans zależy od czasu działania ultrafioletem oraz od długości fali padającego światła: im fala padającego światła jest krótsza, tym większa jest ilość powstającego kwasu kumarowego, przy czym światło o fali dłuższej niż 450 m $\mu$  nie wywiera już praktycznie żadnego wpływu na wzajemne przejście jednej formy w drugą (18). Przy długości fali padającego światła równej 360 m $\mu$  i po 8 min. naświetlana w mieszaninie znajduje się około 76% kwasu kumarowego i 24% kwasu kumarynowego (17).

Wykorzystując zjawisko fluorescencji kwasu kumarowego do ilościowych oznaczeń należy pamiętać, że bardzo poważny wpływ wywiera na nią kwasowość analizowanej próbki oraz temperatura (12, 20).

#### *A. Fluorymetryczne metody jakościowego wykrywania kumaryny w nostrzyku*

Zasadą wszystkich starszych metod fluorymetrycznego wykrywania kumaryny w nostrzyku (24, 34, 38) było podgrzanie materiału z mocnym roztworem wodorotlenku sodowego z następną obserwacją pod ultrafioletem. Do najdoskonalszych z tej grupy należy zaliczyć metodę opisaną przez Goplen'a i wsp. (13), zgodnie z którą próbki natychmiast po zebraniu umieszcza się w próbkach zawierających 10 ml 2,5 N roztworu NaOH, podgrzewa przez 2 godziny do 97° C, oziębia do temperatury pokojowej i przegląda pod lampą ultrafioletową.

Metoda powyższa, według autorów, z łatwością pozwala wykrywać kumarynę w roślinach zawierających jej tak mało jak 0,07%.

W ostatnich latach opracowano niezwykle szybkie i proste testy bibułowe, mające jeszcze i tę zaletę, że pozwalają na odrębne wykrywanie kumaryny wolnej i związanej.

Opierając się na teście Micke'a (24), który stwierdził, że do wykrycia kumaryny nie jest konieczne podgrzewanie próbki, lecz że wystarczy ją mechanicznie rozdrobnić i zadać roztworem NaOH, Rudorf i Schwarze (30) opisali test bibułowy polegający na tym, że z liścia wyciska się kroplę soku na bibułę filtracyjną i na to miejsce nakłada się następnie kroplę 10% roztworu NaOH. Jeżeli mieliśmy do czynienia ze szczepem bogatym

w kumarynę, to po kilku minutach, pod ultrafioletem, pojawiają się silnie fluoryzujące, zielono-żółte, dyfuzyjne plamy; sok z roślin ubogich w kumarynę nie fluoryzuje lub fluoryzuje słabo w kolorach od niebieskiego do czerwonego (produkty rozpadu chlorofilu, pigmenty roślinne itp.).

Przy wyciskaniu soku z wielu roślin na raz istnieje potencjalne niebezpieczeństwo zanieczyszczenia jednej próbki drugą, celem uniknięcia tego autorzy zalecają stosować modyfikację próbkową swojej metody. W tym celu pobrane próbki roślinne umieszcza się w odpowiednich, małych naczynkach i zadaje alkoholem etylowym, który uśmiercając tkankę powoduje szybkie przejście kumaryny do roztworu. Po wkropleniu do próbki roztworu NaOH pod ultrafioletem obserwuje się mocną fluorescencję próbek kumarynowych, łatwą do odróżnienia od niespecyficznej fluorescencji próbek bezkumarynowych.

Inną, bardzo oryginalną wersję proponuje Gorz i Haskins (15). W polu, z badanych liści wycina się korkoborem krążki o średnicy 1—4 mm i przy pomocy noża lub łopatkki rozdusza się je na odpowiednio pokratkowanej bibule chromatograficznej (np. Whatman nr 1). Następnie pipetką kapilarną nanosi się na odciski 2,5 N roztwór NaOH w takiej ilości, aby plama była o kilka milimetrów większa od średnicy próbki i po 5-minutowym naświetlaniu ultrafioletem zapisuje się, które próbki dawały fluorescencję charakterystyczną dla kumaryny. Teraz bibułę wstawia się do suszarki i podgrzewa do 100° średnio przez 18 godzin (od 6 do 48 godz.) i po upływie tego czasu próbki zwilża się wodą przy pomocy kapilarnej pipetki (nadmiar wody nie jest wskazany ze względu na rozmywanie plam) i po 5 min. naświetlania U. V. (na mokro) zapisuje się wyniki powtórnie.

Zdaniem autorów, stosując tę metodykę można z dużą dokładnością określić, czy dana roślina jest bogata we frakcję kumaryny wolnej (fluorescencja występuje od razu po zadaniu NaOH), czy roślina ma mało kumaryny wolnej, ale za to dużo związanej (fluorescencja występuje po podgrzaniu), czy też dany egzemplarz jest w ogóle bezkumarynowy (brak fluorescencji tak przed, jak i po podgrzaniu).

Do bardziej dokładnych jakościowo-ilościowych pomiarów autorzy opracowali wersję próbkową.

W tym wypadku do odpowiednich próbek wkłada się kawałki liści o jednakowej powierzchni (około 25 mm<sup>2</sup>), dodaje 1 ml wody zawierającej domieszkę środka obniżającego napięcie powierzchniowe i autoklawuje przez 15 minut przy temp. 120° C celem ekstrakcji kumaryny. Po oziębieniu z próbek usuwa się resztki tkanki, dodaje 1 ml 5 N roztworu NaOH, naświetla przez 15 min. ultrafioletem i porównuje intensywność fluorescencji z fluorescencją wzorców o znanym stężeniu kumaryny. Wyniki zapisuje się i próbkę powtórnie autoklawuje przez 30 min. przy 120° C i powtórnie porównuje ich fluorescencję z wzorcami (tabela 4).



Tabela 4

Ilości kumaryny w serii próbek wzorcowych i znajdujące przybliżone ilości kumaryny w analizowanej tkance liściowej. Cyfry odpowiadają wartościom dawanym przez próbki 0,5 mg (sucha masa) (wg Gorz i Haskins, 1958)

Nr próbek wzorcowej	Ilości kumaryny w roztworze	Przybliżony poziom kumaryny w liściu
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$ % suchej masy
1	$\geq 0$ < 0,05	$\geq 0$ < 0,02
2	$\geq 0,05$ < 0,25	$\geq 0,02$ < 0,10
3	$\geq 0,25$ < 0,625	$\geq 0,10$ < 0,25
4	$\geq 0,625$ < 1,25	$\geq 0,25$ < 0,50
5	$\geq 1,25$	$\geq 0,50$

Wartości otrzymane przed autoklawowaniem próbki z NaOH są odpowiednikami zawartości kumaryny wolnej, a po autoklawowaniu z zasadą odpowiadają zawartości kumaryny ogólnej; z różnicy łatwo obliczyć ilość kumaryny związanej. Zaznaczyć należy, że pojęciem kumaryny związanej autorzy obejmują wszystkie związki fluoryzujące tak jak kumaryna.

Wyniki otrzymane metodą bibułową są w 98% zgodne z wynikami otrzymanymi metodą próbkową.

#### *B. Ilościowe, fluorymetryczne metody oznaczania kumaryny*

Pierwszą ilościową metodę oznaczania kumaryny na zasadzie fluorymetrycznej opisał Slatensek i wsp. 34, 35, a zastosowana przez nich procedura została następnie zmodyfikowana przez Goplen'a i wsp. (13).

100 mg materiału w próbkach zawierających 15 ml 2,5 N NaOH podgrzewa się przez 2 godziny i 15 min. do temperatury 97°C i, po ochłodzeniu do 20°C, pobiera się 1 ml płynu, przenosi do kolbki miarowej i dopełnia wodą destylowaną do 100 ml. Próbki, w kuwetach od fluorymetru, nasświetla się światłem ultrafioletowym przez 10 min. i bezpośrednio potem dokonuje się odczytu; ilość kumaryny zawartej w próbce odczytuje się z odpowiedniej krzywej wzorcowej.

Inną metodę opracował Blaim (3), który 20 mg powietrznie suchego materiału ekstrahuje przez 3 godz. 50 ml chloroformu i z tak otrzymanego wyciągu pobiera 10 ml i przepuszcza przez kolumnkę z ziemi rejoyeckiej, celem oczyszczenia od chlorofilu i innych barwników, przemywa kilkakrotnie wodą i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Z chwilą gdy ilość chloroformu zmniejszy się do 5 ml, do kolbki destylacyjnej dodaje się 5 ml metanolu i dopiero teraz odparowuje chloroform całkowicie.

Tabela 5

Poziom kumaryny w nostrzyku według analiz wykonanych przez różnych autorów

Metoda	Kumaryna		Autor	Uwagi
	wolna %	ogólna %		
Kolorymetryczna		0,200	Behr i wsp., 1957	Materiał świeży, wyniki przedstawione w % suchej masy
„		0,088		
„		0,093		
„		0,344	Behr i wsp., 1957	Materiał: ten sam co poprzednio, suszony na powietrzu, % suchej masy
„		0,024		
„		0,086		
Manganometryczna wg Dustman-Duncan		1,03	Blaim, 1956	Materiał suszony przy 50°C, % suchej masy
Fluorymetryczna		0,99	Blaim, 1956	Materiał suszony przy 50°C % suchej masy
Fluorymetryczna	1,94	3,27	Haskins i Gorz, 1957	Materiał świeży, % suchej masy
Spektrofotometryczna	0,004 0,005 0,008	0,120 0,248 0,456	Rudorf i Schwarze, 1958	1-rocza odmiana nostrzyka, materiał świeży, wyniki przedstawiono w % masy świeżej
Spektrofotometryczna	0,75	2,18	Clopton, 1958	Nasiona, odm. 1-rocza
Kolorymetryczna		2,80	Clopton, 1958	Nasiona, odmiana 1-rocza

Następnie roztwór metanolowy przenosi się do kolbek na 25 ml, dodaje 5 ml 5 N metanolowego roztworu KOH, dopełnia metanolem do kreski, przelewa do kuwetek i po 5 min. naświetlaniu dokonuje się odczytu w fotofluorymetrze Pulfricha, stosując filtr L<sub>1</sub> i standard 5 C.

Dokładność metody około 5%; ilość oznaczalnej kumaryny: od 0,2 do 20 mikrogramów w ml.

Na zupełnie innej zasadzie, jeżeli chodzi o ekstrakcje materiału roślinnego, oparli swą metodę Haskins i Gorz (17).

Odważkę świeżego materiału przenosi się do próbki i dodaje 2 krople alkoholu etylowego, a potem 2 ml wody destylowanej. Wstrząsając próbkę powoduje się zanurzenie tkanki pod powierzchnię płynu i wtedy autoklawuje się przez 15 min. w temperaturze 120°C. Po wyjęciu próbek chłodzi się je szybko celem uniknięcia strat kumaryny spowodowanych wyparowaniem, wyjmując resztki tkanki platynowym drucikiem,

a ekstrakt bierze do oznaczeń kumaryny wolnej i związanej, albo, gdy zachodzi potrzeba, można go w takim stanie przechowywać w lodówce.

Celem dokonania oznaczenia pobiera się 1 ml ekstraktu i przenosi do probówki zawierającej 9 ml 2,5 N roztworu NaOH. Po dokładnym wymieszaniu, 2 ml płynu przenosi się do probówki zawierającej 8 ml wody destylowanej. Pozostałe 8 ml autoklawuje się przez 30 min. przy temperaturze 120°C i, po szybkim ochłodzeniu na łaźni lodowej, 1 ml roztworu przenosi się do probówki zawierającej 1 ml 2,5 N NaOH i 8 ml wody. Rozcieńczone próbki, otrzymane przed i po autoklawowaniu ekstraktów z zasadą, naświetla się następnie przez 15 min. ultrafioletem i dokonuje odczytów w fotofluorymetrze. Wartości otrzymane dla próbki przed autoklawowaniem z zasadą odpowiadają poziomowi kumaryny wolnej, a wartości otrzymane po autoklawowaniu próbki z NaOH odpowiadają sumie kumaryn.

Ilości kumaryny odczytuje się z krzywej wzorcowej. Jako standard fluoryzujący można stosować roztwór siarczanu chininy w 0,1 N kwasie siarkowym, zawierający 0,77  $\mu\text{g}$  w ml.

\* \* \*

Z opisanych trzech metod przygotowywania materiału do analizy, dwie opierają się na działaniu zasady na tkankę w podwyższonej temperaturze. Procedurę tę stosuje się celem zhydrolizowania wiązań glikozydowych i ekstrakcji kumaryny, lecz oczywiste jest, że w tak otrzymanych roztworach znajdują się i inne związki, mogące wydzielać światło fluorescencyjne, ewentualnie mogące wykazywać działanie interferencyjne. Zdając sobie z tego sprawę, Haskins i Gorz mianem kumaryny związanej obejmują wszystkie związki fluoryzujące po autoklawowaniu z NaOH w kolorze zielono-żółtym, podczas gdy Goplen i wsp. nad problemem tym nie zastanawiają się.

Metoda zaproponowana przez Goplena i wsp. jest stosunkowo prosta i można ją śmiało stosować przy porównawczych analizach zawartości kumaryny ogólnej w badanym materiale przy założeniu, że wszystkie analizy wykonywać się będzie w identycznych warunkach.

Trochę inaczej przedstawia się sprawa z metodą Haskins'a i Gorz'a, przy której przy oznaczaniu frakcji kumaryny wolnej trzeba się liczyć tak z możliwością strat spowodowanych wyparowaniem (sublimacją), jak i z możliwością rozpadu wiązań glikozydowych podczas autoklawowania; wydaje się, że frakcja kumaryny wolnej będzie znacznie zawyżona jeszcze przez fakt, iż w oryginalnej procedurze nie uwzględniono możliwości rozkładu frakcji kumaryny związanej na drodze enzymatycznej, który to proces powinien być szczególnie aktywny podczas pierwszych minut autoklawowania.

Zastrzeżenia powyższe zdają się potwierdzać wyniki badań Rudolf'a i Schwarze'a (30), którzy, pracując z identycznym materiałem, lecz stosując inną metodykę ilościowego oznaczania, otrzymali znacznie niższe wartości dla poziomu kumaryny wolnej i zrazem trochę niższe wartości dla ogólnej kumaryny.

Metoda zaproponowana przez Blaima wydaje się dawać dobre rezultaty dla oznaczeń kumaryny ogólnej lecz, ze względu na stosowanie materiału suchego, należy liczyć się ze stratami wskutek sublimacji.

### *Metody oznaczania kumaryny na drodze spektrofotometrycznej*

Jeżeli sporządzić wykres zależności stopnia pochłaniania padającego światła od długości fali, to okazuje się, że niektóre związki chemiczne przy ściśle określonych długościach fali wykazują charakterystyczne maksima i minima; właściwość ta wykorzystana być może tak do jakościowej identyfikacji danego związku, jak i do jego ilościowego oznaczania (22).

Sporządzając taki wykres pochłaniania światła ultrafioletowego przez kumarynę łatwo zauważyć, iż teoretycznie można ją ilościowo oznaczyć poprzez pomiar ekstynkcji jej roztworów przy długościach fali 270—280  $m\mu$ , gdyż wtedy przypada szczególnie ostro zaznaczone maksimum.

Ilościową, spektrofotometryczną metodę oznaczania kumaryny pierwsi opracowali Englis i Hanahan (10): przystosowana ona była do oznaczania kumaryny w ekstraktach z wanilii. W 1958 r. została ona zmodyfikowana przez Clopton'a (6), który zauważył, że krzywa pochłaniania światła ultrafioletowego przez wzorcowe, alkoholowe roztwory kumaryny jest prawie identyczna z taką krzywą dla alkoholowych ekstraktów z nasion nostrzyka i wykazuje ostre maksimum absorpcyjne przy 275  $m\mu$  i drugie maksimum przy 310  $m\mu$ . Dokładne analizy wykazały, że maksimum alkoholowych ekstraktów z nostrzyka jest w 100% spowodowane przez kumarynę, czyli że ten zakres należy wykorzystać w praktyce.

Zmielone nasiona nostrzyka moczy się wodą destylowaną i pozostawia w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę (celem uczynnienia enzymów) po czym suszy się w eksykatorze i dokładną odważkę mączki (około 20 mg) ekstrahuje się przez 6 godz. 50 ml 95% alkoholu etylowego w aparacie Soxhleta; następnie ekstrakt dopełnia się alkoholem do 100 ml i dokonuje pomiaru absorpcji przy 275  $m\mu$ . Ilość zawartej w próbce kumaryny odczytuje się z odpowiedniej krzywej wzorcowej, lub oblicza matematycznie po dokonaniu równoległego pomiaru ekstynkcji wzorca o znanym stężeniu.

Celem sprawdzenia swojej metody Clopton wykonywał równocześnie pomiary porównawcze, posługując się kolorymetryczną metodą Roberts'a i Link'a. Z jego pomiarów wynika, że zawartość kumaryny w nasionach



poddanych działaniu wody przed pomiarem wynosi 2,80% (w przeliczeniu na suchą masę), gdy posługiwać się metodą kolorymetryczną, a analogiczna cyfra dla metody spektrofotometrycznej wynosi 2,18%; ilość kumaryny w materiale nie poddanym uprzedniemu działaniu wody wynosi 0,75%. Ponieważ materiał poddawano działaniu wody celem aktywacji zawartych w nim systemów enzymatycznych katalizujących proces uwalniania się kumaryny z jej połączeń, autor wnioskuje, że w nasionach przynajmniej  $\frac{2}{3}$  ogólnej ilości kumaryny występuje w postaci związanej.

W tym samym czasie, niezależnie od Clopton'a, metodę spektrofotometrycznego oznaczania kumaryny wolnej i związanej w nostrzyku opracowali Rudolf i Schwarze (30), którzy, dla odmiany, posługiwali się wyciągami eterowymi.

Do oznaczeń spektrofotometrycznych 2 g świeżego materiału zadawano 15 ml 5% roztworu kwasu siarkowego i homogenizowano przez 10 min. Po odfiltrowaniu 5 ml przesączu zadawano 10 ml eteru etylowego i wytrząsano przez 6 min. Kwas siarkowy w użytym stężeniu momentalnie zabija tkankę, unieczynnia  $\beta$ -glikozydazy i pozwala na szybkie przejście kumaryny do roztworu. W ekstrakcie eterowym, oprócz kumaryny, znajdują się jeszcze i inne związki mogące wpływać na jakość oznaczenia; celem ich usunięcia wyciągi takie zadawano szczyptą siarczanu sodowego i tlenkiem wapniowym, które to związki, nie wpływając na poziom kumaryny, pozwalają na znaczne usunięcie zanieczyszczeń.

Oznaczenia dokonuje się przy 270 m $\mu$ .

Celem oznaczenia całkowitej ilości kumaryny zawartej w badanym materiale autorzy, podobnie jak Clopton, zastosowali trawienie zawartymi w tkance enzymami. Tkanę poddawano działaniu niskiej temperatury ( $-21^{\circ}\text{C}$ ), która, zabijając komórki, równocześnie umożliwia zetknięcie się enzymów z frakcją glikozydową, a następnie dodaje się 15 ml wody i pozostawia przez noc w temperaturze pokojowej. Dalej postępowano jak przy oznaczaniu frakcji kumaryny wolnej, z tym że końcowy, eterowy ekstrakt rozcieńczano 10—20-krotnie ze względu na dużą ilość obecnej w nim kumaryny.

Stosując powyższą metodę autorzy wykazali, że w nostrzyku ilość kumaryny wolnej stanowi 1/10—1/100 ogólnego poziomu kumaryny.

#### *Zastosowania elektroforezy i chromatografii bibułowej do analizy kumaryn*

Z przytoczonych metod oznaczania kumaryny wynika, że zasadniczą trudność stanowi wyizolowanie kumaryn w stanie rodzimym i oddzielenie od siebie, z jednej strony frakcji kumaryny wolnej i związanej, a z drugiej usunięcie z roztworu zanieczyszczeń reagujących podobnie.



Odnosnie ostatnich dwóch postulatów (oddzielanie i oczyszczanie) doskonałe wyniki uzyskuje się stosując chromatografię (20, 23, 27) lub elektroforezę bibułąwą (30, 32). W pierwszym wypadku zalecić można mieszaninę Partridge'a (butanol — kwas octowy — woda 4 : 1 : 5, faza organiczna), w której kumaryna charakteryzuje się wartością  $R_f = 0,95$ , a wartość  $R_f$  dla glikozydu kwasu kumarynowego wynosi 0,72. W drugim wypadku stosować można bufor weronalowo-octanowy o pH 8,6 i sile jonowej  $\mu = 0,1$ , lub bufor pirydynowo-octanowy o pH 6,5, w którym glikozyd wędruje przed kumaryną (czas trwania elektroforezy: 10 min., napięcie prądu 220 V).

Po spryskaniu bibuły 2 N roztworem NaOH pod U. V. kumaryna fluoryzuje od razu, a glikozyd dopiero po podgrzaniu spryskanej zasadą bibuły przez 3 min. do temp.  $100^\circ\text{C}$ , lub po uprzednim spryskaniu bibuły roztworem emulsyny, a dopiero potem roztworem wodorotlenku sodowego.

Z chwilą zidentyfikowania i umiejscowienia plam na bibułę wycina się odpowiednie miejsca z równoległych, razem rozwiniętych chromatogramów, eluje 80% alkoholem etylowym i jeżeli jest to wolna kumaryna, bierze do oznaczenia, lub w wypadku glikozydu poddaje się go procesowi hydrolizy (można również chromatografować próbkę już po hydrolizie). Hydrolizę przeprowadza się albo w roztworze NaOH, albo w kwasie solnym (0,2 ml 37% HCl na 5 ml ekstraktu alkoholowego), albo enzymatycznie po zadaniu roztworem emulsyny. Wybór sposobu hydrolizy oraz potraktowanie eluatów odpowiednimi odczynnikami zależy od stosowanej metody ilościowego oznaczania; zaleca się stosować metody fluorymetryczne lub spektrofotometryczne z racji ich wysokiej czułości.

Jeżeli chodzi o sposób przygotowania wyciągu z rośliny do analizy chromatograficznej, Schwarze i wsp. (30, 32) proponują zadawać zielone liście wrzącym alkoholem i po roztarciu i odwirowaniu nakraplać na bibułę, podczas gdy Kala (20) stosuje uprzednie przepuszczenie alkoholowego ekstraktu przez kolumnę z tlenku glinowego, celem oczyszczenia od chlorofilu itp. zanieczyszczeń przeszkadzających w chromatografii.

### *Dyskusja i wnioski końcowe*

Przed wysnuciem ostatecznych wniosków na temat przydatności poszczególnych metod ilościowego oznaczania kumaryny, warto porównać uprzednio wyniki podawane przez autorów pracujących różnymi metodami. Od razu zaznaczyć należy, że porównanie takie jest bardzo trudne, a niekiedy nawet niemożliwe, ponieważ rezultaty z reguły odnoszą się do różnych odmian nostrzyka, że pracowano na materiale świeżym lub suszonym w rozmaity sposób, że nie podano czy próbki pobierano z liści starych, czy młodych, z korzenia, łodygi lub nasion, itd.; uwagi te dotyczą

zwłaszcza prac starszych. Mając na uwadze powyższe zastrzeżenia można przejść do analizy tabeli, 5, w której zebrano wyniki oznaczeń wykonanych różnymi metodami (starano się przytaczać tylko wyniki prac jako tako porównywalnych). Od razu uderza wielka rozbieżność wyników podawanych przez różnych autorów (od 0,088% do 3,27% suchej masy), co nie jest dziwne, zważywszy, że nawet w ramach tej samej grupy (analizy wykonane przez jednego autora na tym samym materiale) otrzymuje się wyniki różniące się o 300—500%.

Za najbardziej wiarogodne należy przyjąć wartości podane przez Rudorf'a i Schwarze (30) ze względu na to, że stosowana przez nich metoda ekstrakcji wydaje się być najdoskonalszą ze wszystkich dotychczas stosowanych; te też wyniki przyjmujemy w porównaniu za punkt odniesienia. Niestety wyniki swych analiz wymienieni autorzy podają w procentach świeżej masy i dla otrzymania wartości porównywalnych należy liczby przez nich podawane pomnożyć przez 5—6, celem przeliczenia na procent suchej masy [sucha masa w nostrzyku stanowi około 15—20% (2)]; tak więc poziom kumaryny ogólnej w nostrzyku wynosiłby 0,7—2,7%. I oto okazuje się, że zasadniczo wszystkie wartości mieszczą się w tych granicach, z wyjątkiem wartości otrzymanych metodą kolorymetryczną, które są zdecydowanie za niskie oraz otrzymanych metodą fluorymetryczną według procedury Haskins'a i Gorz'a, które wydają się być zawyżone.

Znaczne różnice jednak otrzymuje się dla poziomu kumaryny wolnej w nostrzyku, który według analizy Rudorf'a i Schwarze'a wynosi 0,02—0,064%, podczas gdy Haskins i Gorz podają wartość 1,94%. Ostatnia wartość jest na pewno za wysoka, co potwierdzają porównawcze analizy, wykonane przez Rudorf'a i Schwarze'a; złożyły się na to czynniki omówione przy opisie metody.

Którą więc metodę zastosować w praktyce? Zależy to od celu, jakiemu mają służyć wyniki analiz.

Przy masowych pracach selekcyjnych najlepszą wydaje się być jakościowa metoda wykrywania kumaryny na bibule według Gorz'a i Haskins'a lub Rudorf'a i Schwarze'a, a do analiz pół-ilościowych metoda próbówkowa pierwszych autorów. Do oznaczania ogólnego poziomu kumaryny stosować można tak metodę kolorymetryczną, jak fluorymetryczną i spektrofotometryczną, po wprowadzeniu pewnych modyfikacji do procedury przygotowywania materiału do analizy.

Wydaje się, że przy oznaczeniach mających na celu zróżnicowanie frakcji kumaryny wolnej i związanej nieodzowny powinien być etap rozkładu glikozydu kwasu kumarynowego za pomocą enzymów tkankowych, a przy oznaczaniu kumaryny wolnej, natychmiastowe zadanie próbki kwasem siarkowym (według procedury Rudorf'a i Schwarze'a). Po potraktowaniu kwasem najracjonalniejsze wydaje się wytrząsanie

z eterem i taki wyciąg, zawierający kumaryny, bierze się do analizy według przepisów podanych przy odnośnych metodach.

## LITERATURA

1. Behr G.: 1954. Über die Eigenschaften der Begleitstoffe des Chlorophylls und dessen Bestimmung in frischen Pflanzen. Ztshr. Acker- und Pflanzenbau, 98: 325—342.
2. Behr G., Hüllsmann G., Thilo L.: 1957. Kritische Untersuchungen zur Bestimmung von Cumarin, Melilotsäure und Cumarinsäure in Pflanzenteilen. Angew. Bot. 31: 63—73.
3. Blaim K.: 1956. Mikrometod opredelenia kumarina v rastitelnom materiale. Biokhimi'a, 21: 689—693.
4. Charraux C.: 1925. Sur le méliotoside, glycoside générateur d'acide coumarique extrait des fleurs de *Melilotus altissima* Thuil. et de *Melilotus arvensis* Wallr., Bull. Soc Chim. biol., Paris 7: 1056—1059.
5. Clayton J. S., Larmour R. K.: 1935. A comparative test for coumarin and melilotic acid in *Melilotus* species. Canad. J. Res., Sect. C, 13: 89—100.
6. Clopton J. R.: 1958. Determination of coumarin in the presence of sterols. Agric. and Food Chem., 6: 457—459.
7. Czapek F., W książce: „Biochemie der Pflanzen”. Bd. III., Jena 1921, s. 473.
8. Duncan I. J., Dustman R. B.: 1934. Quantitative determination of coumarin in plant material. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 6: 210—213.
9. Duncan J., Dustman R.: 1937. Determination of coumarin in sweet clover. A comparison of the steam-distillation and alcoholic-extraction methods. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 9: 471—474.
10. Englis D. T., Hanahan D. J.: 1944. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 16: 505; (cyt. za 6).
11. Ermakow A. I., Arasimovič V. V., Smirnova-Okonnikova M. I., Murri I. K.: 1952. W książce: „Metody biokhimičeskogo issledovania rastenii” Gosud. Izd. Selskhoz. Literatuty. Moskwa—Leningrad, 415—418.
12. Goodwin H. H., Kavanagh F.: 1952. Arch. Biochem., 27: 152. (cyt. za Goodwin).
13. Goplen B. P., Greenshields J. E. R., White W. J.: 1956. Selection techniques in screening for coumarin-deficient sweet clover plants. Canad. J. Bot., 34: 711—719.
14. Goplen B. P., Greenshields J. E. R., Baenziger H.: 1957. The inheritance of coumarin in sweet clover. Canad. J. Bot., 35: 583—593.
15. Gorz H. J., Haskins F. A.: 1958. Rapid tests for free and bound coumarin in sweet clover. Agron. J. 50: 211—214.
16. Harle A. J., Lyons L. E.: 1950. The polarographic reduction of some heterocyclic molecules. Part. II. Coumarin and certain derivatives thereof. J. Chem. Soc., London 1950: 1575—1578.
17. Haskins F. A., Gorz H. J.: 1957. Fluorometric assay of free and bound coumarin in sweet clover. Agron. J., 49: 493—497.
18. Haskins F. A., Gorz H. J.: 1959. Influence of spectral composition of light on cis-trans interconversion of o-hydroxycinnamic acid. Arch. Biochem. Biophys., 81: 204—210.
19. Jerzmanowska Z.: 1953. W książce. „Preparatyka związków chemicznych dla studentów farmacji i chemii”, PZWL, Warszawa, s. 54—86.



20. Kala H.: 1958. Über den Stoffwechsel der Cumarine in Solanaceen. *Planta Med.*, 6: 186—202.
21. Kanewskaja S. G., Fedorowa M. F.: 1933. A quantitative determination of coumarin and of melilotic acid in *Melilotus officinalis*. *Ztschr. anal. Chem.*, 93: 176—180.
22. Kortüm G.: 1955. W książce: „Kolorimetrie, Photometrie und Spectrophotometrie”. Springer-Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg.
23. Kosuge T., Conn E. E.: 1959. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. I. Coumarin and o-coumaric acid. *J. Biol. Chem.*, 134: 2133—2137.
24. Micke A.: 1957. Eine vereinfachte Methode zur Prüfung von Steinklee-Individuen auf Coumarin. *Züchter*, 27: 179—181.
25. Obermayer E.: 1913. Quantitative Bestimmung des Cumarins in *Melilotus*-Arten. *Z. anal. Chem.*, 52: 172.
26. Patzak R., Neugebauer L.: 1951. Über polarographische Untersuchungen von Cumarinen. *Monatshefte für Chemie*, 82: 662—670.
27. Reppel L., Wagenbreth D.: 1958. Untersuchungen über den Gehalt an Cumarinen und diesen verwandten Säuren in Propfungen zwischen *Melilotus albus* Med. und *Trigonella frenum graecum* L., *Flora*, 146: 212—227.
28. Roberts W. L., Link K. P.: 1937. A precise method for determination of coumarin, melilotic acid and coumaric acid in plant tissue. *J. Biol. Chem.*, 119: 269—281.
29. Roberts W. L., Link K. P.: 1937. Determination of coumarin and melilotic acid. A rapid micromethod for determination in *Melilotus* seed and green tissue. *Ind. Eng. Chem.*, 9: 438—441.
30. Rudolf W., Schwarze P.: 1958. Beiträge zur Züchtung eines coumarin-freien Steinklees und Untersuchungen über Coumarin und verwandte Verbindungen. *Ztschr. Pflanzenzüchtung*, 39: 245—274.
31. San Antonio J. P.: 1952. Role of coumarin in the growth of roots of *Melilotus alba*. *Bot. Gaz.*, 114: 79—95.
32. Schwarze P., Hoffschmidt R.: 1958. Untersuchungen über das Coumarin des Steinklees und Methoden zur Trennung des freien und „gebundenen” Cumarins. *Naturwiss.*, 45: 518—519.
33. Schwarze P., Hoffschmidt R.: 1959. Die Umwandlung von Cumarsäure in Cumarinsäure und umgekehrt im ultravioletten Licht. *Naturwiss.*, 46: 205.
34. Slatensek J. M., Washburn E. R.: 1944. A rapid, fluorometric method for the determination of coumarin and related compounds in sweetclover. *J. Amer. Soc. Agron.*, 36: 704—708.
35. Slatensek J. M.: 1947. Some causes for variation of coumarin content in sweetclover. *J. Amer. Soc. Agron.*, 39: 596—605.
36. Smirnova M. I., Gelčinskaja R. B.: Kačestvenno-kolicestvennyj metod opredelenia kumarina v donnike. W książce: „Metody biokhimičeskogo issledovania rastenij”, Moskwa-Leningrad, 1952, s. 418—420.
37. Ufer M.: 1939. Ein züchterisch brauchbares Verfahren zur Auslese coumarinärmer Formen beim Steinklee (*Melilotus*). *Züchter*, 11: 317—321.
38. White W. J., Savage R. G., Johnston F. B. A.: 1952. A slightly modified fluorometric method of testing for coumarin content in sweetclover. *J. Amer. Soc. Agron.*, 32: 278—280.