

<https://doi.org/10.18778/8220-012-6.20>

ROZDZIAŁ XX. **METABOLITY WTÓRNE**
O ZNACZENIU PROZDROWOTNYM
ANTRAZWIĄZKI LIŚCI
I KULTUR *IN VITRO* ALOESU

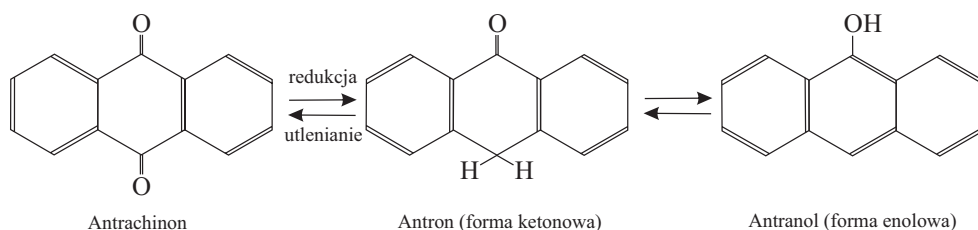
CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Roślinne metabolity wtórne stanowią bardzo zróżnicowaną grupę związków chemicznych o aktywności biologicznej. Obecnie ponad 25% wszystkich środków leczniczych to związki pochodzące z roślin, w tym trudno rozmnażających się, rzadko występujących lub zagrożonych wyginięciem. Do pozyskiwania terapeutycznie ważnych związków wykorzystuje się roślinne kultury *in vitro* (por. rozdział XIX), techniki inżynierii genetycznej i transformacji roślin oraz procesy biotransformacji związków chemicznych pochodzenia egzogenne-go. Podstawą hodowli *in vitro* jest morfologiczna i chemiczna totipotencja komórek roślinnych. **Totipotencja chemiczna** oznacza zdolność komórek odizolowanych od organizmu macierzystego do wytwarzania i/lub akumulacji metabolitów wtórnych. Roślinne kultury *in vitro* umożliwiają pozyskiwanie biologicznie aktywnych związków na dużą skalę, w ściśle kontrolowanych warunkach, niezależnych od czynników środowiskowych i klimatycznych. W kulturach *in vitro* mogą również powstawać nowe związki, których nie zidentyfikowano w roślinach *in vivo*.

Antrazwiązki są pochodnymi antracenu. W zależności od stopnia utlenienia podstawowego układu dzielą się na antrachinony, antrony oraz izomeryczne z nimi antranole (por. rysunek 20.1). W tkankach roślin antrazwiązki występują przeważnie w postaci glikozydów, najczęściej są to *o*-glikozydy oraz *c*-glikozydy, np. **aloina** (10-glukozyloaloeemodynoantron) (por. rysunek 20.2). Składnikami cukrowymi tych glikozydów (zwykle 1–3 cząsteczki cukru) są zazwyczaj *D*-glukoza, *L*-ramnoza i *L*-apioza. Część aglikonowa (emodyny) to hydroksylowe, metylowe lub karboksylowe pochodne 1,8-dihydroksyantrachinonu lub jego zredukowanej formy. Antrazwiązki mogą występować w postaci monomerów oraz dimerów jako izoantrony

(2 cząsteczki jednakowych antronów) lub heterodimery. Przykładem antrazwiązków monomerycznych są obecne w liściach aloesu: aloina, aloemodyna, aloinozydy A i B, glikozydy franguloemodyny w korze kruszyny oraz chryzofanolu i reiny w kłączu i korzeniu rzewienia. Diantrony występują np. w liściach senesu (sennozydy A, B, C, D) i kwiatach dziurawca (hiperycy-na) (por. rysunek 20.2).

Rysunek 20.1.
Stopnie utlenienia podstawowego układu antrazwiązków

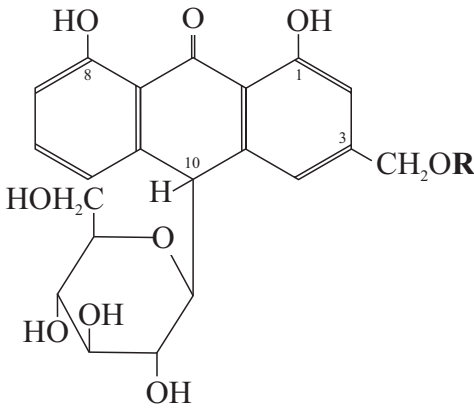


Antraglikozydy są krystalicznymi substancjami rozpuszczalnymi w wodzie i polarnych rozpuszczalnikach organicznych. Pod wpływem kwasów oraz obecnych w tkankach enzymów ulegają utlenieniu i hydrolizie. Aglikony tych antraglikozydów nie rozpuszczają się w wodzie. Antrachinony mają żółte, pomarańczowe lub czerwone zabarwienie, łatwo rozpuszczają się w roztworach zasad, dając czerwono zabarwione sole (**reakcja Bornträgera**). Bezbarwne antrony i antranole nie dają barwnej reakcji, ale w środowisku alkalicznym pod wpływem powietrza ulegają utlenieniu do antrachinonów i wówczas pojawia się czerwona barwa. Szczególnie bogate w antrazwiązki są rośliny z rodzin: rdestowatych, szakłakowatych, bobowatych, marzanowatych, złotogłowowatych.

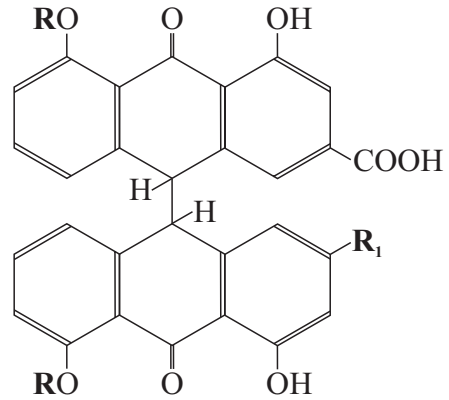
W lecznictwie antrazwiązki zawierające grupy hydroksylo-we w pozycji 1 i 8 stosowane są przede wszystkim jako środki regulujące pracę przewodu pokarmowego. Najwyższą aktywność wykazują glikozydy antronów, diantronów i antranoli. Glikozydy w stanie niezmienionym przechodzą do jelita grubego, gdzie pod wpływem flory bakteryjnej ulegają hydrolizie i redukcji do antronów i diantronów, podrażniających śluzówkę jelita grubego, wzmagających jego perystaltykę i sekrecję oraz zmniejszających resorpcję wody. Część antrazwiązków wchłoniętych w jelicie cienkim dociera z krwioobiegiem do wątroby

i wzмага wydzielanie żółci (działanie żółciopędne i żółciotwórcze). Antrazwiązki wykazują także aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Niektóre, np. aloina, hiperycyna, wykazują działanie przeciwzapalne, przyspieszają gojenie się ran. Hiperycyna (por. rysunek 20.2), występująca w zbiornikach hiperycynowych dziurawca zwyczajnego, jest inhibitorem monoaminooksydaz (MAO) i wykazuje działanie przeciwdepresyjne oraz przeciwlękowe.

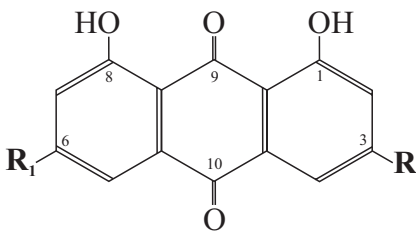
Rysunek 20.2.
Wzory strukturalne przykładowych antrazwiązków



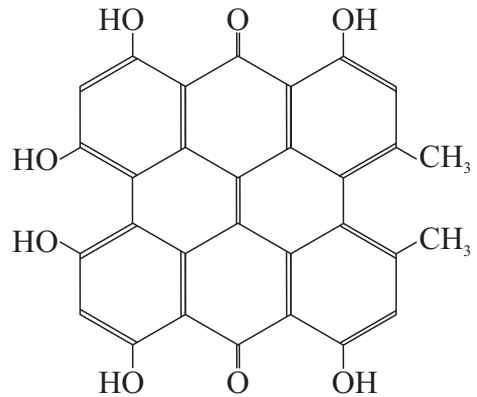
	R
Aloina A i B (stereoizomery)	H
Aloinozyd A i B (stereoizomery)	ramnoza



	R	R ₁
Sennozyd A i B (stereoizomery)	glukoza	COOH
Sennozyd C i D (stereoizomery)	glukoza	CH ₂ OH



	R	R ₁
Aloemodyna	CH ₂ OH	H
Chryzofanol	CH ₃	H
Franguloemodyna	CH ₃	OH
Reina	COOH	H



Hiperycyna

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Cel ćwiczenia

1. Analiza jakościowa za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) antrazwiązków występujących w liściach roślin oraz kulturach kalusowych i/lub zawiesinowych aloesu.
 2. Porównanie całkowitej zawartości antrazwiązków w liściach oraz kulturach kalusowych i/lub zawiesinowych aloesu.
-

Doświadczenie I

Analiza jakościowa antrazwiązków metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Zasada metody

Analiza jakościowa antrazwiązków za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC): identyfikacja antrazwiązków obecnych w badanych ekstraktach na podstawie porównania zabarwienia w świetle UV (365 nm) i współczynników przesunięcia (R_f) ich plam na chromatogramie względem wzorców oraz charakterystycznej dla nich reakcji Bornträgera w obecności KOH.

Materiał

liście kilkuletniej rośliny aloesu zwyczajnego hodowanego w ziemi ogrodniczej, czterotygodniowe kultury kalusowe i/lub dwutygodniowe kultury zawiesinowe aloesu hodowane na podłożu MS (por. załącznik 6), w ciemności i na świetle, w temperaturze 24°C

Odczynniki

70% CH_3OH , mieszanina octan etylu–99,9% metanol–woda (100:13,5:10; v/v/v), roztwory wzorcowe antrazwiązków: aloiny, aloemodyny, emodyny, aloinozydów A i B (stereoizomery) w proporcji 1 mg w 5 cm^3 70% CH_3OH , 10% KOH w $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$

Sprzęt laboratoryjny

skalpele, pęsety, bagietki, lejek Büchnera + kolba ssawkowa, sączki z bibuły filtracyjnej, bibuła, 5 moździerzy porcelanowych, pipety (1–10 cm^3), 5 plastikowych próbek typu Falcon 50 cm^3 ,

6 próbek wirowniczych (20–30 cm³), 5 lejków z cienką nóżką, 5 kolb miarowych 25 cm³, 5 zlewek 50 cm³, waga laboratoryjna, pompa, łaźnia wodna, wirówka, plastikowe pipety pasteurowskie, markery

Do analizy TLC: komora chromatograficzna, spryskiwacz, minutnik, lampa UV, suszarka, płytka chromatograficzna pokryta żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym (Merck 60 F₂₅₄), pipety kapilarne do nanoszenia próbek na płytki chromatograficzne, linijki, ołówki

I.A. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW

1. Liście aloesu naciąć podłużnie skalpelem, wydobyć miąższ. Kalus z kultur hodowanych na świetle i w ciemności oczyścić z agarowego podłoża, osuszyć na bibule. Zawiesiny komórkowe z kultur hodowanych na świetle i w ciemności odsączyć na lejku Büchnera (lejek Büchnera wsunąć w szyjkę kolby ssawkowej, dokładnie docisnąć gumową uszczelkę, zapewniając szczelne połączenie, kolbę ssawkową podłączyć do pompy, na lejku Büchnera umieścić zwilżony wodą destylowaną sączek z bibuły filtracyjnej, włączyć pompę, upewnić się, że filtr całkowicie zakrywa wszystkie otwory lejka, odsączyć komórki od pożywki).
2. Odważyć po 2,5 g każdego z badanych materiałów.
3. Porcje badanych materiałów homogenizować w móżdziejzu z dodatkiem 10 cm³ 70% CH₃OH. Dokładnie zhomogenizowany materiał przenieść ilościowo do opisanych plastikowych próbek typu Falcon, móżdziejz dodatkowo przepłukać 5 cm³ 70% CH₃OH i dołączyć do głównej puli homogenatu.
4. Probówki zakryć korkiem (nie dokręcając dokładnie!) i umieścić na 10 minut w łaźni wodnej o temperaturze 80°C.
5. Probówki ostudzić w strumieniu bieżącej wody, zawartość przelać do próbek wirowniczych i następnie odwirować (20 000 × g, 15 min).
6. Supernatanty zlać do kolb miarowych o objętości 25 cm³, uzupełnić 70% CH₃OH do 25 cm³, a następnie przelać do opisanych zlewek o objętości 50 cm³.

I.B. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA

Wykonanie doświadczenia

UWAGA: Wszystkie czynności wykonać pod pracującym dygestorium.

Przygotowanie chromatogramu i nanoszenie substancji jak w rozdziale VI (pkt I.B):

1. Na płytce chromatograficznej pokrytej żelem krzemionkowym ze znacznikiem fluorescencyjnym przygotować i zaznaczyć sześć punktów startowych.
2. Na punkty startowe kolejno nakropić pipetą kapilarną porcjami łącznie po 0,05 cm³ ekstraktów oraz po 0,025 cm³ mieszaniny roztworów wzorcowych antrazwiązków.
3. Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej wysyczonej fazą ruchomą o składzie: octan etylu–99,9% metanol–woda (100:13,5:10; v/v/v) i rozwijać chromatogram około 60 minut.
4. Po wyjęciu chromatogramu z komory natychmiast zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika, płytkę wysuszyć.

Opracowanie wyników

1. Oglądać chromatogram w świetle UV, przy długości fali 365 nm. Na ścieżkach mieszaniny wzorców oraz ekstraktów obrysować ołówkiem plamy odpowiadające antrazwiązkom.
2. Obliczyć współczynnik przesunięcia (R_f) dla antrazwiązków, dzieląc odległość środka plamy od linii startu [cm] przez odległość czoła fazy ruchomej od linii startu [cm].
3. Zidentyfikować antrazwiązki w ekstraktach badanych materiałów w oparciu o porównanie współczynników R_f oraz charakterystyczne zabarwienie plam w świetle UV-365 nm:
 - a) aloina oraz aloinozydy A i B – typowa żółto-pomarańczowa fluorescencja antronów,
 - b) aloemodyna i emodyna – czerwona fluorescencja,
 - c) aloezyny A i B – pochodne chromonu wykazujące silną jasnoniebieską fluorescencję.

4. Płytkę spryskać 10% etanolem, a następnie rozpuścić w roztworze KOH, zaobserwować zmiany kolorów niektórych plam w wyniku reakcji Bornträgera:
- a) antrachinony – czerwona barwa w świetle widzialnym i czerwona fluorescencja w świetle UV,
 - b) antrony i antranole – żółta barwa w świetle widzialnym i żółta fluorescencja w świetle UV.

Wykonać rysunek chromatogramu, uwzględniając wielkość i zabarwienie plam (por. rozdział XXI, rysunek 21.1) W oparciu o uzyskane wyniki analizy jakościowej ocenić różnice między antrazwiązkami występującymi w tkankach liści roślin a kulturami *in vitro* aloesu.

Doświadczenie II

Oznaczenie całkowitej zawartości antrachinonów metodą kolorymetryczną

Zasada metody

Badane ekstrakty zawierają antrazwiązki w postaci mieszaniny antrachinonów, antranoli i antronów oraz ich glikozydów. W celu oznaczenia całkowitej zawartości antrazwiązków przeprowadza się w temperaturze pokojowej za pomocą nadjodanu sodu „hydrolizę utleniającą” antrony i antranole do postaci 1,8-dihydroksyantrachinonów. W środowisku alkalicznym antrachinony ulegają reakcji Bornträgera, tworząc czerwono zabarwione fenolany. Pomiar absorbancji fenolanów wykonuje się przy długości fali światła 510 nm.

Odczynniki

70% CH₃OH, 25% NH₃, 5% nadjodan sodu, roztwór wzorcowy aloiny w 70% CH₃OH o stężeniu 0,6 mg cm⁻³

Sprzęt laboratoryjny

pipety (0,1–10 cm³ i 25 cm³), 14 probówek szklanych, kuwety do spektrofotometru, spektrofotometr, minutnik, markery

Wykonanie doświadczenia

W statywie przygotować 14 odpowiednio opisanych probówek: 2 dla próby odnośnikowej, 2 dla wzorca aloiny i 10 dla badanych ekstraktów (por. Doświadczenie I). Oznaczyć całkowitą zawartość antrachinonów według opisu w tabeli 20.1, zachowując kolejność dodawania odczynników.

Tabela 20.1. Oznaczanie całkowitej zawartości antrachinonów

Odczynnik	Dodawane objętości [cm ³]		
	Próba odnośnikowa	Próba wzorcowa	Próba badana
Ekstrakt	–	–	1,0
Wzorzec aloiny	–	1,0	–
70% CH ₃ OH	1,0	–	–
5% nadjodan sodu	0,1	0,1	0,1
25% NH ₃	0,5	0,5	0,5

1. Zawartość probówek wytrząsnąć, odstawić na 60 minut w ciemne miejsce.
 2. Dodać 5 cm³ wody destylowanej, zamieszać, odstawić w ciemne miejsce na 15 minut.
 3. Zmierzyć absorbancję wszystkich prób w kuwecie spektrofotometrycznej przy długości fali 510 nm względem próby odnośnikowej.

Opracowanie wyników

Obliczyć zawartość antrachinonów [mg] w badanych ekstraktach w przeliczeniu na 1 g ś. m. materiału:

$$C_x = \frac{A_b}{A_w} \times C_w \times 25 \div 2,5$$

gdzie:

C_x – zawartość antrazwiązków [mg] w 1 g ś. m. materiału badanego [mg g⁻¹ ś. m.],

A_b – absorbancja roztworu badanego,

A_w – absorbancja wzorca,

C_w – stężenie wzorca (0,6 mg cm⁻³),

25 – ostateczna objętość ekstraktów [cm³],

2,5 – masa tkanek poddanych ekstrakcji [g].

Wyniki dotyczące zawartości antrachinonów w badanych próbach zebrać w tabeli 20.2.

Materiał	A ₅₁₀	Zawartość antrazwiązków [mg g ⁻¹ ś. m.]
Liście		
Kalus		
Zawiesina komórkowa		

W oparciu o uzyskane wyniki analizy ilościowej ocenić różnice między zawartością antrazwiązków w tkankach liści roślin a kulturami *in vitro* aloesu.

Tabela 20.2.
Całkowita zawartość antrazwiązków w liściach i kulturach *in vitro* aloesu

Literatura

Kączkowski J., *Podstawy biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.

Kohlmünzer S., *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*, PZWL, Warszawa 2003.

Małepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.

Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Walewska E., *Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych*, PZWL, Warszawa 1982.

Wagner H., Blatt S., *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin 1996.