



PRACE EKSPERYMENTALNE

Densytometryczna analiza diosgeniny w ekstraktach z tkanki kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All.

Przemysław Szybka-Hrynkiewicz, Zbigniew Janeczko
Katedra Farmakognozji Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński
Kraków

Densitometric analysis of diosgenin in extracts from callus tissue of *Polygonatum verticillatum* (L.) All.

Summary

In this study, we examined the effect of plant growth regulators (2, 4-D, 6-BAP) and steroidal hormone (17- β -estradiol) on a quantity of diosgenin in callus tissue of *Polygonatum verticillatum* (L.) All.

The callus grown in *in vitro* conditions on MS medium with: 1/1, 2/2, 5/5, 10/10 ([mg/dm³] 2,4-D/[mg/dm³] 6-BAP) and 1/1/1, 2/2/2, 5/5/5, 10/10/10 ([mg/dm³] 2,4-D/[μ M/dm³] 17- β -estradiol/[mg/dm³] 6-BAP) was used for the densitometric analysis to determine the presence of diosgenin. The content of diosgenin ranged from 0,0642 to 1,1458%. An increase in diosgenin content due to addition of 6-BAP and 2,4-D was observed. The developed procedure was estimated by statistical analysis which indicates that it can be used for routine analysis.

Key words:

callus, *in vitro* culture, diosgenin, 2,4-D, 6-BAP, 17- β -estradiol, auxins, cytokinins, *Polygonatum verticillatum*, densitometric analysis.

Adres do korespondencji

Przemysław
Szybka-Hrynkiewicz,
Katedra Farmakognozji,
Collegium Medicum,
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków.

1. Wstęp

W badaniach przeprowadzonych w Katedrze Farmakognozji CM UJ (1) stwierdzono, że *Polygonatum verticillatum* (L.) All. – kokoryczka okółkowa oraz inne występujące na terenie Polski gatunki rodzaju *Polygonatum* zawierają saponozydy steroidowe. Związki te, a w zasadzie ich aglikon – diosgeninę, wykorzystuje się

w półsyntezie hormonów steroidowych. Przekształcenie diosgeniny w progesteron jest wynikiem acetylacji, utleniania, hydrolizy alkalicznej i utleniania Oppenauera (2,3). Dotychczas, do izolacji tego związku na skalę przemysłową wykorzystywane są najczęściej gatunki rodzaju *Dioscorea* rosnące w strefie klimatu tropikalnego.

Należy podkreślić, że zawartość diosgeniny w kłączach gatunków rodzaju *Dioscorea*, gdzie występuje ona średnio w ilości od 2 do 8% (4,5), jest znacznie wyższa niż w tkankach gatunków występujących lub uprawianych w Polsce.

W krajowych roślinach lub w Polsce uprawianych, obecność diosgeniny stwierdzona została: w nasionach *Trigonella coerulea* Ser. – kozieradka błękitna (0,2-0,8%) (6), w nasionach *Trigonella foenum-graecum* L. – kozieradka pospolita (0,2-0,8%) (6), w tkance kalusowej *Trigonella foenum-graecum* L. (0,1-0,16%) (7), w ziele i kłączach *Maianthemum bifolium* L. – konwalijka dwulistna (8), w podziemnych i nadziemnych organach wegetatywnych *Polygonatum multiflorum* (L.) All. – kokoryczka wielokwiatowa i *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce – kokoryczka wonna (w obu gatunkach znikoma zawartość diosgeniny) (1,9) oraz w *Polygonatum verticillatum* (L.) All. – kokoryczka okółkowa (1,4-3,17%) (1).

Podobieństwo budowy diosgeniny do progesteronu uzasadnia pozyskiwanie jej z roślin w celu produkcji hormonów płciowych i kortykosteroidów. Z przebadanych do tej pory krajowych gatunków najwyższą zawartość tego związku wykazuje kokoryczka okółkowa – *Polygonatum verticillatum* (L.) All. Roślina ta, jak dotychczas, jest jedyną rosnącą w strefie klimatu umiarkowanego, o tak wysokiej zawartości diosgeniny, stwarzającą możliwości wykorzystania tego gatunku do produkcji hormonów steroidowych.

2. Cel badań

Głównym celem badań jest określenie wpływu, zastosowanych w różnych proporcjach, regulatorów rozwoju roślin (tj. kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), 6-benzyloaminopuryny (6-BAP)) (10) oraz hormonu steroidowego (tj. 17- β -estradiolu (17 β -E)) (11) na zawartość diosgeniny w tkance kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All. (12) oraz opracowanie metody densytometrycznego oznaczania zawartości diosgeniny w ekstraktach roślinnych.

Oznaczenie ilości diosgeniny w tkance kalusowej w hodowli *in vitro* umożliwi porównanie jej z zawartością diosgeniny w roślinie rosnącej w stanie naturalnym.

3. Materiał i metody

Do analizy wykorzystana została tkanka kalusowa *Polygonatum verticillatum* (L.) All. Tkanekę kalusową otrzymano z części hipokotylowej kiełkujących z nasion siewek. Nasiona pozyskano ze stanowisk naturalnych kokoryczki okółkowej znajdu-

jących się na obrzeżach aglomeracji krakowskiej, na terenie Tatr i Pienin oraz z ogrodów botanicznych Wrocławia, Warszawy, Berna, Zürichu, Innsbrucka, Genewy i Wiednia.

Nasiona odkażano przez mechaniczne oczyszczenie i przepłukanie ich w wodzie redestylowanej, a następnie poddanie chemicznej sterylizacji 70° alkoholem etylowym przez 60 sekund w celu odtłuszczenia i odpowietrzenia powierzchni odkażanej. Umożliwiło to lepszą penetrację właściwego roztworu odkażającego. Jako główny środek sterylizujący zastosowano 0,1% roztwór HgCl₂ przez 30 minut z dodatkiem zwiłacza zmniejszającego napięcie powierzchniowe w postaci preparatu Tween 20 (roztwór 0,05%). Dezynfekcję kończyło trzykrotne płukanie odkażonych nasion w sterylnej wodzie redestylowanej. Pierwsze płukanie trwało 60 sekund, a następne dwa płukania po 5 minut.

W celu indukcji rozwoju tkanki kalusowej z części hipokotylowej siewek, rozwijających się z nasion, najlepsze wyniki uzyskiwano stosując stałe podłoże Murashige i Skooga (MS) zawierające 100 mg/dm³ mezo-inozytolu, 30 g/dm³ sacharozy, 2 mg/dm³ 2,4-D i 1 μM/dm³ 17-β-estradolu, doprowadzone do pH 5,6-5,8, zestalone 0,6% agarem. Podłoże wyjaławiano w autoklawie pod ciśnieniem 0,1 MPa, w temperaturze 120°C przez 20 minut. Podczas doświadczenia utrzymywano temperaturę: 22°C (noc) i 26°C (dzień), 16-godzinny fotoperiod (promiennik FLUORA® firmy OSRAM emitujący głównie promieniowanie z niebieskiego i czerwonego obszaru widma) o natężeniu światła około 1500 luksów i 60% względną wilgotność powietrza (13,14). W opisanych warunkach tkanka kalusowa powstająca z hipokotylowej części siewek była możliwa do uzyskania po 7 tygodniach od początku inkubacji nasion.

W celu sprawdzenia wpływu regulatorów wzrostu roślin oraz hormonu steroidowego na zawartość diosgeniny w badanej tkance kalusowej zastosowano 9 wariantów stałej pożywki MS. Do pożywki dodano odpowiednio: 1/1, 2/2, 5/5, 10/10 ([mg/dm³] 2,4-D/[mg/dm³] 6-BAP) oraz 1/1/1, 2/2/2, 5/5/5, 10/10/10 ([mg/dm³] 2,4-D / [μM/dm³] 17-β-estradolu/[mg/dm³] 6-BAP). Zastosowano także pożywkę MS bez dodatku regulatorów wzrostu roślin oraz hormonu steroidowego. Tkankę kalusową (podzieloną na 3 grupy) pasażowano co 3 tygodnie oraz co 6 tygodni stosując opisany 16-godzinny fotoperiod, a także co 3 tygodnie hodując badaną tkankę w ciemności).

Hodowana w ten sposób tkanka kalusowa po 18 miesiącach stanowiła podstawę do dalszej analizy ilościowej.

Do analizy densytometrycznej wykorzystano ekstrakty otrzymane z rozdrobnionej i przesianej przez sito 1,6 mm tkanki kalusowej. Naważki badanych surowców (0,5 g w 3 próbkach tkanki kalusowej dla każdego z 9 wariantów pożywki MS) zwilżano wodą destylowaną (pH 6) i inkubowano w cieplarni w temperaturze 40°C przez 24 godziny. Z wilgotnych próbek umieszczonych w kolbkach okrągłodennych po dodaniu 50 ml metanolu ekstrahowano saponozydy w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 1 godzinę. Ekstrakcję powtarzano trzykrotnie, a połączone ekstrakty metanolowe zagęszczano do sucha. Do zagęszczonych ekstraktów dodano po 20 ml 3 M metanolowego roztworu chlorowodoru i prowadzono hydrolizę

w temperaturze wrzenia przez 3 godziny. Hydrolizaty rozcieńczano dwukrotnie wodą, odparowywano metanol i wytrząsano pięciokrotnie po 3 minuty w rozdzielaczu z 15 ml eteru etylowego w celu eluowania aglikonów. Warstwa eterowa po odparowaniu i rozpuszczeniu suchej pozostałości w chloroformie oraz po przeniesieniu do kolbek miarowych o pojemności 10 ml, została użyta do analizy chromatograficznej (1).

Chromatografię cienkowarstwową (TLC) prowadzono na płytkach firmy Merck (Alufolien Kieselgel 60 bez wskaźnika fluorescencyjnego, art. nr 1.05553.). Na płytki chromatograficzne nanoszono aplikatorem LINOMAT IV firmy CAMAG (Mutenz – Szwajcaria) wzorcowy 0,05% chloroformowy roztwór diosgeniny (2271h Diosgenin pure KOCH-LIGHT LABORATORIES LTD) w ilości 2 μ l oraz od 10 do 30 μ l próbek badanych. Chromatogramy rozwijano techniką wstępującą na drodze 10 cm w fazie ruchomej: n-heksan : aceton (4 : 2) w komorze chromatograficznej firmy Merck (22 \times 12 \times 4 cm). Po rozwinięciu suszono strumieniem powietrza, spryskiwano 16% wodnym roztworem kwasu siarkowego i ogrzewano w temperaturze 100-105°C przez 2 minuty.

Analizy wykonywano na densytometrze firmy CAMAG (Mutenz – Szwajcaria) przy długości fali $\lambda = 500$ nm.

4. Wyniki i dyskusja

Wyniki eksperymentów można podsumować w następujących punktach:

1) opracowano skuteczną metodę dezynfekcji nasion; kiełkowało średnio 34% z wysianych nasion, inkubowanych w temperaturze 26°C,

2) dzięki zastosowaniu podłoża MS z dodatkiem 2 mg/dm³ 2,4-D i 1 μ M/dm³ 17- β -estradiolu uzyskano tkankę kalusową z hipokotylowej części siewek,

3) zoptymalizowano metodę przygotowywania ekstraktów z materiału roślinnego służących do późniejszej analizy ilościowej poprzez zwielokrotnienie procesu eluowania aglikonów, co w efekcie dało zwiększenie wydajności pozyskiwania diosgeniny z surowca, w porównaniu do metody zastosowanej w pracy (1),

4) opracowano densytometryczną metodę oznaczania diosgeniny w ekstraktach z tkanki kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All.,

5) przy zastosowaniu płytek chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym 60 i fazy ruchomej: n-heksan : aceton (4 : 2) uzyskano dobry rozdział związków umożliwiający densytometryczne oznaczenie diosgeniny,

6) dla poszczególnych plam związków zarejestrowano widma absorpcji w zakresie 350-600 nm i ustalono analityczną długość fali dla diosgeniny przy $\lambda = 500$ nm,

7) oznaczono procentową zawartość diosgeniny w badanych próbkach (tab.),

8) w analizie uzyskanych wyników stwierdzono, że zastosowaną metodę cechuje czułość rzędu 5×10^{-5} mg \times ml⁻¹,

9) wyznaczona krzywa kalibracji zachowuje liniowość w szerokim zakresie stężeń od 0,5 [mg \times ml⁻¹] \times 10⁻⁴ do 40 [mg \times ml⁻¹] \times 10⁻⁴ (rys.),

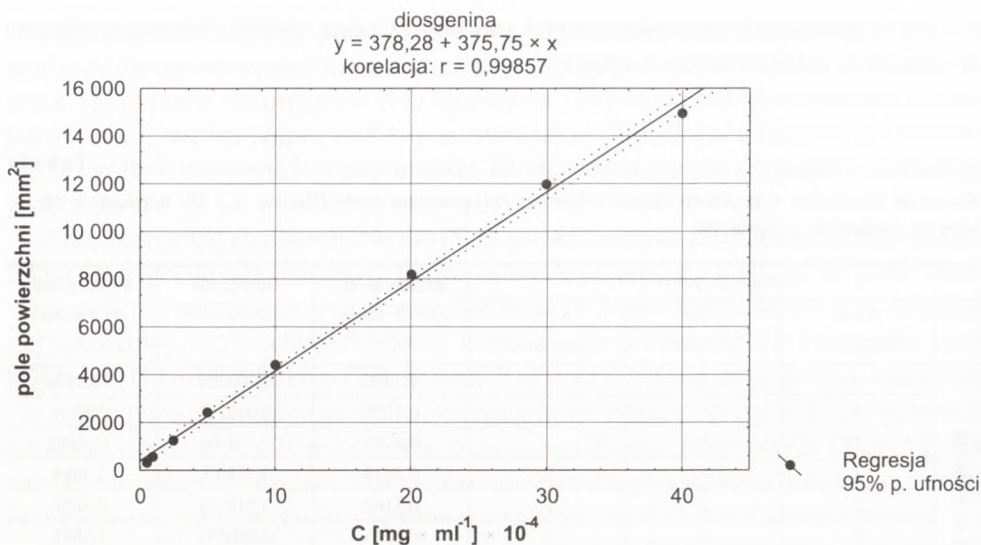
10) w ustalonych warunkach uzyskano powtarzalne wyniki. Mieszczą się one w granicach od 0,0642 do 1,1458%.

Tabela

Zawartość diosgeniny w próbkach tkanki kalusowej *Polygonatum verticillatum* (L.) All. uzyskanych na różnych wariantach pożywki MS

	Dodatki do pożywki MS			Średnia arytm. zawart. diosg. x [%]	Odchylenie standardowe S	Współczynnik zmienności V
	2,4-D [mg/dm ³]	17β-E [μM/dm ³]	6-BAP [mg/dm ³]			
pasaż co 6 tygodni	–	–	–	0,1590	0,000204	12,8476
	1	–	1	0,1670	0,000131	7,8504
	1	1	1	0,0642	7,15E-05	11,1492
	2	–	2	0,1629	4,51E-05	2,7665
	2	2	2	0,1168	9,91E-05	8,4836
	5	–	5	0,1875	0,000105	5,5881
	5	5	5	0,1515	6,43E-05	4,2460
	10	–	10	0,1353	0,000151	11,1367
pasaż co 3 tygodnie	–	–	–	0,2154	0,000154	7,1665
	1	–	1	0,2121	9,91E-05	4,6704
	1	1	1	0,1374	0,00011	7,9994
	2	–	2	0,2644	0,000143	5,4203
	2	2	2	0,1203	0,000192	15,9394
	5	–	5	0,2095	0,000172	8,1967
	5	5	5	0,2217	8,18E-05	3,6879
	10	–	10	0,1952	0,000198	10,1196
pasaż co 3 tygodnie w ciemności	–	–	–	0,1487	0,000138	9,2643
	1	–	1	0,1276	0,000113	8,8841
	1	1	1	0,6465	0,000439	6,7833
	2	–	2	1,1458	0,000832	7,2583
	2	2	2	0,5122	0,000257	5,0219
	5	–	5	0,1834	0,000159	8,6458
	5	5	5	0,1434	0,000151	10,5595
	10	–	10	0,8850	0,000753	8,5125
10	10	10	0,1541	0,000123	7,9868	

Średnia arytmetyczna z oznaczeń $\bar{x} = 0,2636\%$, odchylenie standardowe średniej arytmetycznej $S_{\bar{x}} = 0,002495\%$, przedział ufności średniej arytmetycznej dla przyjętego prawdopodobieństwa 95% ($\alpha = 0,05$) wynosi od 0,2626 do 0,2646%; $\eta = 0,2636 \pm 0,001$.



Rys. 1. Krzywa kalibracji.

Informacje dotyczące wpływu 17- β -estradiolu na procesy fizjologiczne roślin przedstawione w (9) stanowiły przesłankę do podjęcia badań wpływu tego związku na zawartość w niej diosgeniny. Wyniki badań przedstawione w tabeli wskazują, że wpływ 17- β -estradiolu nie ma istotnego znaczenia na zawartość diosgeniny. Jedyne odstępstwo można było zaobserwować w tkance kalusowej pasażowanej co 6 tygodni po dodaniu dużej ilości ($10 \mu\text{M}/\text{dm}^3$) tego związku, ale również w tej samej próbce dodano po $10 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 2,4-D oraz 6-BAP. W tej sytuacji przedwczesne byłoby stwierdzenie, że przyrost ten jest skutkiem dodania 17- β -estradiolu.

Natomiast oceniając wpływ związku 6-BAP, który dodawany łącznie ze związkiem 2,4-D w jednakowych ilościach w sposób nieznaczny, ale widoczny wykazuje dodatnią korelację z zawartością procentową diosgeniny w badanej tkance pasażowanej co 3 i co 6 tygodni, w warunkach 16-godzinnego fotoperiodu. Uwagi te dotyczą uśrednionych wartości wyników procentowej zawartości diosgeniny (dla tych samych ilości dodawanych związków: 6-BAP i 2,4-D). Eksperyment przeprowadzony na tkance pasażowanej co 3 tygodnie, hodowanej w warunkach braku dostępu światła nie potwierdza ww. oceny.

5. Wnioski

1. Stwierdzono korzystny wpływ 6-benzyloaminopuryny (6-BAP) oraz kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) na zawartość diosgeniny w tkance kalusowej.

2. Właściwie dobrane warunki oznaczania pozwalają uzyskać zadowalającą powtarzalność wyników, a metodę cechuje szeroki zakres liniowości, czułość rzędu $5 \times 10^{-5} \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ oraz krótki czas wykonywania oznaczenia (około 1 godz.).

3. Opracowana metoda analizy densytometrycznej może być wykorzystana do ilościowego oznaczania diosgeniny w ekstraktach z materiału roślinnego pochodzącego zarówno z hodowli sztucznej, jak i ze stanowisk naturalnych.

Literatura

1. Janeczko Z., (1993), *Badania nad saponozydami steroidowymi krajowych gatunków w rodzaju Polygonatum All.*, rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna, Kraków.
2. Fazli F. R., (1968), Pak JSCI 20 (1 and 2), 64-67.
3. Janik I., Janeczko Z., (1995), *Farmacja Polska*, 51 (12), 518-527.
4. Furmanowa M., Guzewska J., (1988), Ed. Y. P. S. Bajaj, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 7, Medicinal and Aromatic Plants II, Springer, Berlin, 162-184.
5. Šavikin-Fodulović K., Grubišić D., Ćulafić L., Menković N., Ristić M., (1998), *Plant Science*, 135, 63-67.
6. Nowak A., Krajewska A., (1982), *Herba Polonica*, 28, 75.
7. Furmanowa, M., Guzewska J., Beldowska B., Rzędowski M., (1985), *Herba Polonica*, 31(3-4), 155-166.
8. Sibiga A., Sendra J., (1983), *Streszczenia Ref. XII Nauk. Zjazdu Pol. Tow. Farm.*, Kraków.
9. Mirek Z., Piękoś-Mirek H., Zając A., Zając M., (1995), *Vascular Plants of Poland a Checklist*, Wyd. Inst. Botaniki PAN, Kraków.
10. Jankiewicz L. S., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, PWN, Warszawa.
11. Janeczko A., (2000), *Wpływ wybranych steroidów na procesy fizjologiczne roślin ze szczególnym uwzględnieniem indukcji kwitnienia*, praca doktorska, Akademia Rolnicza, Kraków.
12. Nowak A., Krajewska A., Dedio I., (1980), *Herba Polonica*, 26, 1.
13. Chmiel A., (1992), *Biotechnologia*, 4 (19), 5-16.
14. Sengupta J., Sen S., (1987), *Current Science*, 56 (24), 1287-1289.