



Wytwarzanie metabolitów wtórnych w pędach *Salvia nemorosa* L. otrzymanych metodą *in vitro*

Łukasz Kuźma, Halina Wysokińska

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Katedra Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Production of secondary metabolites in shoots of *Salvia nemorosa* L. cultured *in vitro*

Summary

The shoots of *Salvia nemorosa* were proliferated *in vitro* from shoot tips of 4-week-old seedlings on Murashige and Skoog (MS) agar (0.7%) medium containing indolilo-3-acetic acid (IAA) 0.5 mg/l and benzylaminopurine (BAP) 1 mg/l. Four sterols (campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, stigmastanol) and two triterpenes (ursolic acid, oleanolic acid) were detected by GC-MS method in the chloroform extract obtained from the dry *in vitro* cultured shoots of *S. nemorosa*. From the methanolic extract, rosmarinic acid both as isomer *trans* and *cis* was isolated and identified on the basis of $^1\text{H-NMR}$ and HH-COSY spectral data. It is the first report on the detection of *cis*-rosmarinic acid in plants.

Key words:

shoot culture, sterols, triterpenes, rosmarinic acid.

Adres do korespondencji

Łukasz Kuźma,
Zakład Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Katedra Biologii
i Biotechnologii,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź.

1. Wstęp

Rodzaj *Salvia* (rodzina *Lamiaceae*) obejmuje około 500 gatunków, z których liczne mają zastosowanie w medycynie ludowej i oficjalnej oraz w przemyśle spożywczym (środki przyprawowe) i kosmetycznym (środki zapachowe). Ekstrakty szalwii wykazują aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybową, przeciwwirusową, przeciwzapalną i cytotoksyczną (1). Z przeprowadzonych dotychczas badań fitochemicznych wynika, że rośliny te syntetyzują

różnego typu metabolity wtórne takie, jak olejki eteryczne, związki polifenolowe (oligomery kwasu kawowego), flawonoidy, trójterpeny oraz dwuterpeny (2,3).

Salvia nemorosa L. (syn. *Salvia sylvestris* V.) – szalwia omszona w stanie naturalnym występuje w Azji Mniejszej, południowej Syberii i południowowschodniej Europie (4). Liście tej rośliny wykorzystywane są w medycynie ludowej w Turcji, w postaci okładów, przy hamowaniu krwawień (5). Wodne i etanolowe wyciągi z nadziemnych części szalwii omszonej wykazują działanie przeciwbólowe, porównywalne z klasycznymi analgetykami (6). Stwierdzono, że nadziemne części *S. nemorosa* zawierają: dwuterpeny (nemorozyina, horminon, 7-acetylohorminon, nemoron, salwipison, pachystazon), glikozydy megastigmanu (salwinozydy A–C), trójterpeny (salwinemorol, α -amyryna, kwas ursolowy i oleanolowy), sterole (stigmast-7-en-3-on, 24-metylenocykloartanol, stigmast-4-en-3-on, β -sitosterol, stigmast-7-enol) i flawonoidy (salwigenina, eupatylina, apigenina i luteolina) (5,7). W liściach tego gatunku wykryto olejek eteryczny (0,04%) (4).

W naszym laboratorium opracowano metodę mikrorozmnażania *S. nemorosa* z pąków szczytowych oraz poprzez organogenezę tkanki kalusowej. Celem pracy było określenie składu trójterpenów i steroli w wyciągu chloroformowym z namnożonych *in vitro* pędów tej rośliny. Badaniom fitochemicznym poddano również wyciąg metanolowy otrzymany z hodowanych *in vitro* pędów.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły kultury pędów *Salvia nemorosa* uzyskane z wierzchołkowych części aseptycznie wyhodowanych 4-tygodniowych siewek. Kultury prowadzono na stałym podłożu (0,7% agar) Murashige i Skogg'a (MS) (8) uzupełnionym sacharozą (30 g/l) i regulatorami wzrostu: kwasem indolilo-3-octowym (IAA) 0,5 mg/l i benzyloaminopuryną (BAP) 1 mg/l. W odstępach 4-tygodniowych pędy pasażowano na świeże podłoże. Kultury rosły w fitotronie w temperaturze $26 \pm 2^\circ\text{C}$ przy ciągłym oświetleniu lampami fluorescencyjnymi ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Użyte do badań fitochemicznych pędy pochodziły z pasażu 21-27 (po około 2 latach w kulturze *in vitro*).

2.2. Ekstrakcja materiału roślinnego

Wysuszone i sproszkowane pędy (9 g) poddano ekstrakcji chloroformem, a następnie metanolem. Czas ekstrakcji każdym z rozpuszczalników wynosił 48 godzin.

2.2.1. Analiza ekstraktu chloroformowego

Wyciąg chloroformowy zagęszczono *in vacuo* uzyskując 370 mg oleistej pozostałości, którą naniesiono na kolumnę chromatograficzną (długość 103 cm, średnica 2 cm) zawierającą 300 g żelu krzemionkowego firmy Merck (średnica ziaren 0,063-0,2 mm). Kolumnę wymywano chlorkiem metylenu oraz mieszaniną chlorku metylenu i octanu etylu w stosunku 9 : 1 (v/v) i 8 : 2 (v/v). Kontrolę rozdziału prowadzono metodą TLC (układ chlorek metylenu : octan etylu 8 : 2, v/v). Frakcje wyluowane mieszaniną chlorek metylenu : octan etylu 8 : 2 (v/v), łączono, oddestylowano do sucha i przeznaczono do badań za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową. W tym celu niewielką ilość suchej pozostałości frakcji poddano silylacji odczynnikiem BSTFA (bis-trójmetylosililo(trójfluoroacetamol)) firmy Merck. Użyto chromatogramu gazowego firmy Hewlett – Packard model HP – 5972, wyposażonego w automatyczny dozownik HP-GC-SFC-7673. Wykorzystano kolumnę HP-5MS o długości 30 m, średnicy 0,25 mm. Analizy prowadzono przy zastosowaniu programu parametrów przedstawionych poniżej: czas izotermi początkowej 4 min, temperatura izotermi początkowej – 110°C, temperatura izotermi końcowej – 270°C, czas izotermi końcowej – 49 minut, ciśnienie – praca w trybie stałego przepływu – 30 cm/sek; parametry komory nastrzykowej split/splitless – temperatura 280°C, pojemność komory nastrzykowej – 200 ml, parametry detektora MSD: energia jonizacji – 70 eV. Program komputerowy aparatu pozwalał na automatyczne sterowanie chromatografem i detektorem oraz opracowanie wyników pomiarów na bazie wzorcowej biblioteki widm masowych Wiley 275L, zawierającą 275 000 rekordów.

2.2.2. Analiza ekstraktu metanolowego

Ekstrakt metanolowy, po usunięciu rozpuszczalnika (3,2 g), rozpuszczono w gorącej wodzie i ekstrahowano eterem etylowym (5 × 100 ml), w celu usunięcia chlorofilu. Frakcję wodną po zagęszczeniu (0,89 g) naniesiono na kolumnę zawierającą 20 g Sephadex LH-20, firmy Pharmacia. Kolumnę rozwijano w układzie metanol : woda 2 : 8 (v/v). Frakcje o podobnym składzie (TLC) połączono i po oddestylowaniu rozpuszczalnika, poddano dalszemu oczyszczaniu za pomocą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej na płytkach szklanych firmy Merck pokrytych żel krzemionkowym o grubości warstwy 2 mm. Fazą rozwijającą był metanol. Otrzymano 90 mg substancji, którą poddano badaniom spektroskopowym ¹H-NMR i HH-COSY. Widma te zarejestrowano na spektrometrze Varian 300 MHz. Jako wzorzec wewnętrzny użyto tetrametylosilan (TMS). Wartości stałych sprzężenia wyrażono w hercach (Hz). Przesunięcia chemiczne podano w skali δ, a ich wartości – w ppm.

3. Wyniki i dyskusja

Tematem pracy były badania fitochemiczne namnożonych *in vitro* pędów *Salvia nemorosa*. Pędy namnażano z wierzchołków 4-tygodniowych siewek na stałym podłożu MS zawierającym IAA 0,5 mg/l i BAP 1 mg/l. W tych warunkach z jednego wierzchołka można było otrzymać średnio 4 pędy boczne w ciągu 4 tygodni hodowli. Analizie fitochemicznej poddano ekstrakt chloroformowy i metanolowy otrzymany z wysuszonych pędów przebywających około 2 lata w kulturze *in vitro*.

Ekstrakt chloroformowy po rozfrakcjonowaniu za pomocą chromatografii kolumnowej (zob. rozdz. 2), badano metodą GC-MS na obecność steroli i trójterpenów. Na podstawie porównania czasów retencji i widm masowych siliłowych pochodnych badanych związków z czasami retencji i widmami masowymi siliłowych substancji wzorcowych stwierdzono, że pędy *S. nemorosa* namnażane *in vitro* syntetyzują cztery sterole i dwa pentacykliczne związki trójterpenowe (tab. 1). Stigmasterol i β -sitosterol zostały wcześniej wyizolowane z nadziemnych części szalwii omszonej rosnącej w gruncie (7). W literaturze brak natomiast danych o obecności kampesterolu i stigmastanolu w tych roślinach. Z trójterpenów, w wyhodowanych *in vitro* pędach *S. nemorosa*, wykryto kwas ursolowy i jego izomer kwas oleanolowy (tab. 1). Z porównania otrzymanych wyników z danymi uzyskanymi przez Ulubelena i wsp. (7) wynika, że w materiale z kultury *in vitro* i w roślinach rosnących *in vivo* skład trójterpenów jest podobny. W tych ostatnich, obok kwasu ursolowego i oleanolowego wykryto także α -amyrynę (7). W analizie ilościowej przeprowadzonej metodą chromatografii gazowej wykazano, że zawartość kwasu ursolowego w hodowanych *in vitro* pędach wynosi 0,54%, w przeliczeniu na suchą masę i jest dwukrotnie wyższa od zawartości kwasu oleanolowego (0,25% suchej masy). Oba kwasy posiadają szereg interesujących właściwości farmakologicznych. Działają przeciwzapalnie i hamują powstawanie nowotworów skóry u myszy (9). Z badań Lee i wsp. (10) oraz Fang i McLanghlina (11) wynika, że kwas ursolowy wykazuje silną aktywność cytotoksyczną w testach z komórkami białaczki P-388 i L-1210 oraz w stosunku do ludzkich komórek raka płuc A-549. Cytotoksyczność kwasu ursolowego potwierdzono również w badaniach przeprowadzonych na liniach ludzkich komórek HCT-15 COLADAR (komórki nowotworu jelita grubego) i OVCAR-5 (komórki guza jajnika) (12).

Tabela 1

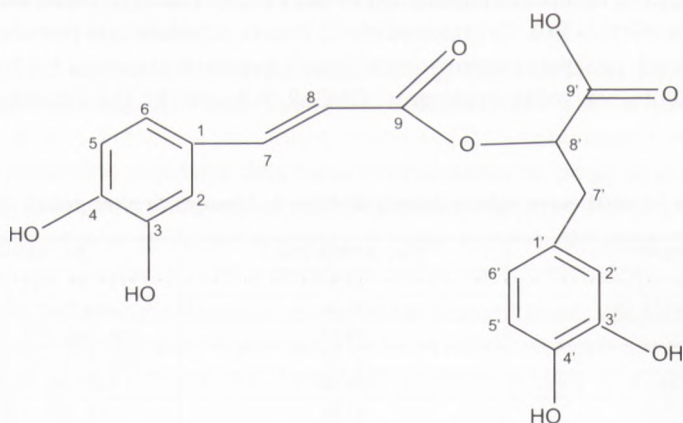
Związki sterolowe i trójterpenowe wykryte metodą GC-MS w hodowanych *in vitro* pędach *Salvia nemorosa*

Związek	Czas retencji [min]	Jon masowy m/e
Kampesterol-TMS	33,31	472, 382, 343, 261, 161, 129
Stigmasterol-TMS	34,28	484, 394, 351, 255, 129
β -sitosterol-TMS	36,99	486, 396, 357, 275, 255, 129
Stigmastanol-TMS	37,07	488, 473, 383, 305, 215, 107
Kwas ursolowy-TMS	49,76	585, 482, 320, 203, 133
Kwas oleanolowy-TMS	47,04	585, 482, 320, 203, 133

Pędy hodowano na podłożu MS z regulatorami wzrostu IAA 0,5 mg/l i BAP 1 mg/l. Okres wzrostu: 4 tygodnie.

Na uwagę zasługuje fakt, że w ekstrakcie chloroformowym z wyhodowanych *in vitro* pędów *S. nemorosa*, oprócz trójterpenów i steroli znaleziono także substancje dotąd nie zidentyfikowane, które na TLC (układ chlorek metylenu : octan etylu 1:1 v/v) dawały 8 plam, barwiących się odczynnikiem anyżowym. Substancje te, prawdopodobnie dwuterpeny, będą przedmiotem naszych dalszych badań.

W przeprowadzonej analizie ekstraktu metanolowego wykazano, że pędy *S. nemorosa* w kulturze *in vitro* syntetyzują kwas rozmarynowy. Identyfikację tego związku oparto na porównaniu danych spektralnych ($^1\text{H-NMR}$, HH-COSY) z danymi literaturowymi (13). Kwas rozmarynowy (depsyd kwasu kawowego i kwasu α -hydroksydwuhydrokawowego) (rys.) charakteryzuje się silnymi właściwościami antyutleniającymi i występuje dość powszechnie w rodzaju *Salvia* (14). Znaleziono go również w kulturze zawiesinowej i zarodkach somatycznych *S. officinalis*, w kulturze zawiesinowej i zregenerowanych *in vitro* roślinach *S. miltiorrhiza* oraz w kalusie, kulturze zawiesinowej i w kulturze korzeni *Salvia fruticosa* (15-18). Związek ten może występować w postaci dwóch izomerów *cis* i *trans*, ale dotychczas w roślinach był wykrywany jedynie w postaci trwalszego energetycznie izomeru *trans* i dane spektralne dla kwasu *cis*-rozmarynowego nie były dostępne. Na podstawie danych spektralnych widma protonowego i widma dwuwymiarowego związku wyizolowanego z pędów *in vitro* *S. nemorosa* można stwierdzić, że w tym materiale kwas rozmarynowy występuje zarówno w postaci izomeru *trans* jak i *cis* (tab. 2). Niektórzy badacze twierdzą, że dla pochodnych kwasu kawowego izomer *cis* jest artefaktem powstającym w wyniku obróbki materiału roślinnego (19) lub jako produkt konwersji izomeru *trans* pod wpływem światła (20). Dlatego w naszych badaniach cały tok postępowania związany z izolacją kwasu rozmarynowego był prowadzony bez dostępu światła. Na podstawie stosunków intensywności par sygnałów H-7 *trans* H-7 *cis*, H-2 *trans* H-2 *cis*, H-5 *trans* H-5 *cis* stwierdzono, że w pędach *S. nemorosa* hodowanych *in vitro* stosunek izomeru *cis* do *trans* kwasu rozmarynowego wynosi 1:9.



Rys. Kwas rozmarynowy.

Tabela 2

Dane $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) kwasu rozmarynowego wyizolowanego z kultury pędów *Salvia nemorosa*

H	trans		cis	
	δ [ppm]	J[Hz]	δ [ppm]	J[Hz]
7- $\text{H}_{\text{olefinowy}}$	7,51	d; 15,9	5,79	d; 12,7
8- $\text{H}_{\text{olefinowy}}$	6,29	d; 15,9	6,72	d; 13,0
H-2	7,03	d; 2,1	7,36	d; 2,1
H-5	6,76	d; 8,2	6,68	d; 8,2
H-6	6,93	dd; 8,4; 2,1	6,89	dd; 2,0; 8,3
H-2'	6,76	d; 2,0	6,73	d; 2,0
H-5'	6,67	d; 8,03	6,59	d; 9,4
H-6'	6,63	dd; 2,0; 8,07	6,57	dd; 2,0; 8,1
H-8'	5,06	dd; 3,3; 9,8	4,98	dd; 3,3; 10,0
H-7'	3,08	dd; 3,3; 14,4	3,04	dd; 3,6; 14,9
	2,93	dd; 9,8; 14,3	2,88	dd; 10,0; 14,2

Literatura

- Kaurosou R., Hanlidou E., Kokkini S., (2000), *Sage the genus Salvia*, Ed. Kintzios S. E., 27-46, Harwood Academic Publishers, Australia, Canada, France.
- Ulubelen A., (2000), *Sage the genus Salvia*, Ed. Kintzios S. E., 55-68, Harwood Academic Publishers, Australia, Canada, France.
- Lu Y., Foo L.Y., (2002), *Phytochemistry*, 59, 117-140.
- Hocking G. M., (1997), *A dictionary of natural products*, Ed. Padgett L., 691-692, Plexus Publishing Inc., USA, Medford.
- Takeda Y., Zang H., Matsumoto T., Otsuka H., Oosio Y., Honda G., Tabata M., Fujita T., Sun H., Sezik E., Yesilada E., (1997), *Phytochemistry*, 44, 117-120.
- Hosseinzadeh H., Amel S., (2000), *Arch. Iran. Med.*, 3, 81-84.
- Ulubelen A., Topcu G., Sönmez U., Eriş C., (1994), *Phytochemistry*, 35, 1065-1067.
- Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Tokuda H., Onigashi H., Koshimizu K., (1986), *Cancer Letters*, 33, 279-285.
- Lee A. R., Chang W. L., Lin H. C., King M. L., (1987), *J. Nat. Prod.*, 50, 157-161.
- Fang X. P., McLaughlin J. L., (1989), *Fitoterapia*, 61, 176-177.
- Rios M. Y., González-Morales A., (2001), *Planta Med.*, 67, 683-684.
- Lu Y., Foo L. Y., (1999), *Phytochemistry*, 51, 91-94.
- Adzet T., Canigual S., Iglesias J., (1988), *Biochem. Syst. Ecol.*, 16, 29-32.
- Hippolite I., (2000), *Sage the genus Salvia*, Ed. Kintzios S. E., 233-242, Harwood Academic Publishers, Australia, Canada, France.
- Chen H., Chen F., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 710-717.
- Morimoto S., Goto Y., Shoyama Y., (1994), *J. Nat. Prod.*, 57, 817-823.
- Nabila S. Karam, Fawzia M. Jawad, Naser A. Aricat, Rida A. Shibli, (2003), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 73, 117-121.
- Saito N., Harborne J., (1992), *Phytochemistry*, 31, 3009-3015.
- Skrzypek Z., Wysokińska H., Świątek L., Wróblewski A., (1997), *J. Nat. Prod.*, 62, 127-129.