Farmacie 2/05 22.2.2005 13:44 Stránka 78
proLékaře.cz | 19.12.2025

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LIV – Číslo 2 – BŘEZEN 2005

ARBUTIN, SALICIN – MOŽNOSTI JEJICH BIOTECHNOLOGICKÉ PRODUKCE

DUŠKOVÁ J., DUŠEK J[1]., JAHODÁŘ L., POUSTKA F.

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie
[1]Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie

SOUHRN

Arbutin, salicin – možnosti jejich biotechnologické produkce

Cílem práce byla transformace exogenních prekurzorů kulturami *in vitro Datura meteloides, Coronilla varia, Leuzea carthamoides* a *Schisandra chinensis.* K těmto kulturám byly přidávány námi dosud nezkoušené prekurzory arbutinu a salicinu (fenylalanin, kyselina skořicová, p-kumarová, p-anisová, o-kumarová, salicylová, salicylaldehyd, helicin). Ke kultuře *Schisandra chinensis* byl přidáván kromě výše uvedených prekurzorů rovněž hydrochinon, neboť tato kultura nebyla dosud k biotransformačním účelům použita. Testované prekurzory byly použity v koncentraci 100 mg.l^{-1} a doba jejich působení byla 6; 12; 24; 48 a 168 hodin. Pozitivní výsledky (TLC i HPLC) v produkci arbutinu byly získány u kultury *Schisandra chinensis* po přidání hydrochinonu. Nejvyšší množství arbutinu bylo v extraktech kalusů naměřeno po týdenní kultivaci s hydrochinonem (5,08 %). V této pokusné variantě docházelo i k uvolňování arbutinu do živného média. Jako optimální prekurzor salicinu se na základě našich výsledků ukázal salicylaldehyd, který byl transformován kulturou *Datura meteloides* po 6; 24 a 168 hodinách a kulturou *Coronilla varia* po 6 hodinách. Jeho množství bylo oproti arbutinu nižší.

K l í č o v á s l o v a: arbutin – salicin – prekurzor – biotransformace

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 78–81

SUMMARY

Arbutin, Salicin: The Possibilities of Their Biotechnological Production

The paper aimed to transform exogenous precursors with *in vitro* cultures of *Datura meteloides, Coronilla varia, Leuzea carthamoides* and *Schisandra chinensis.* These cultures were added the precursors of arbutin and salicin (phenylalanine, cinnamic, p-coumaric, p-anisoic, o-coumaric, salicylic acids, salicylaldehyde, helicin), not yet tested by the present authors. The culture of *Schisandra chinensis* was also added, besides the above-mentioned precursors, hydroquinone, because this culture had not been employed for biotransformation purposes yet. The precursors tested were used in a concentration of 100 mg.l^{-1} and the period of their action was 6; 12; 24; 48, and 168 hours. Positive results (both TLC and HPLC) in arbutin production were obtained in the culture of *Schisandra chinensis* after an addition of hydroquinone. The largest amount of arbutin in callus cultures was measured after a week's cultivation with hydroquinone (5.08 %). In this experimental variant, arbutin was released also to the culture medium. Our results revealed salicylaldehyde to be the optimal precursor of salicin. It was transformed by the culture of *Datura meteloides* after 6; 24, and 168 hours and by the culture of *Coronilla varia* after 6 hours. In comparison with arbutin, its amount was smaller.

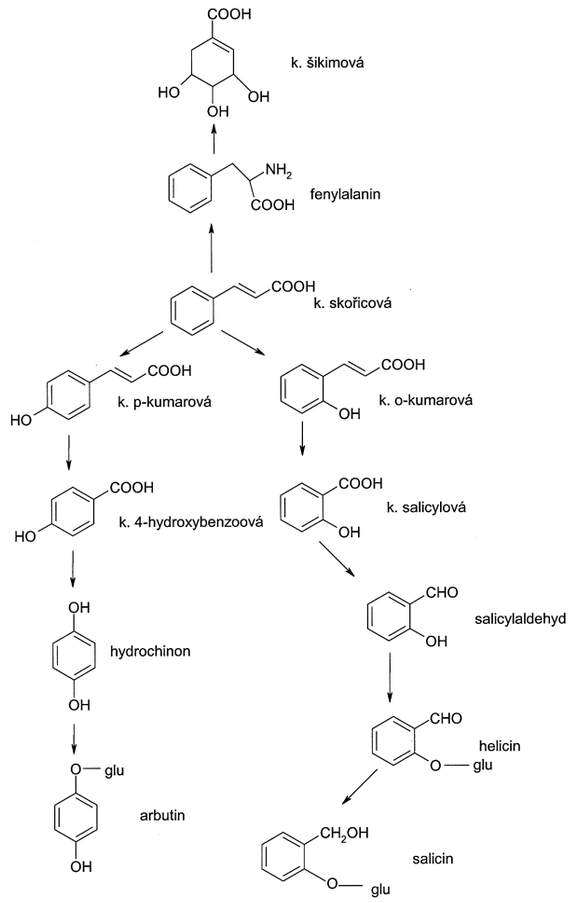
K e y w o r d s: arbutin – salicin – precursor – biotransformation

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 78–81 *Má*

Úvod

Současně se zvládnutím metodiky kultivace rostlinných buněk došlo analogicky k pokusům využít je z hlediska farmaceutické praxe pro biotechnologické získávání terapeuticky významných sekundárních metabolitů. Tomu musí předcházet teoretická studia zabývající se různými způsoby ekonomizace těchto procesů, přičemž využití prekurzorů se jeví jako jedna z teoretických cest mající nejblíže praktickému uplatnění. Biotransformaci (biokonverzi) lze definovat jako přeměnu prekurzoru (substrátu) na produkt. Provádí se tak, že se ke kultuře přivádí prekurzory požadovaných sloučenin a po určitém čase se odebírají produkty transformace [1)]. Znalost metabolických drah usnadní nalezení vhodných prekurzorů, které umožní syntézu žádané látky zvýšit. Zenk et al. [2)] uvádějí základní podmínky pro zabudování prekurzoru do žádaného produktu:

proLékaře.cz | 19.12.2025



Obr. 1. Biosyntetické pochody, z nichž vycházela volba prekurzorů

1. Přítomnost enzymu schopného inkorporace prekurzoru.

2. Produkt musí být tvořen rychleji než je metabolizován.

3. Kultura musí dodávaný prekurzor tolerovat.

Jako substráty pro biotransformace se mohou využívat:

a) látky rostlině obvykle nedostupné, tj. syntetické látky, chemické analogy či sekundární metabolity jiných rostlinných druhů, jejichž transformaci lze vysvětlit jako detoxikační reakci;

b) „přirozené substráty“, tj. látky běžně se v rostlinách vyskytující [3].

V mnoha případech vede dodání exogenních prekurzorů ke zvýšení biosyntézy produktu, na druhé straně ale u mnoha kultur zůstane přidání prekurzoru bez odezvy. V případě použití prekurzorů je nutno ověřit jejich akceptovatelnost, zjistit jejich optimální hladinu, kdy působí, a aplikovat je přesně v té růstové fázi, kdy jsou účinné.

Biotransformace může být realizována i kulturou, v níž je celá biosyntetická sekvence porušena, ale enzym schopný zprostředkovat žádanou dílčí reakci je tvořen v dostatečném množství. Tento přístup má zásadní význam ve farmaceutickém průmyslu, kde může v kombinaci s organickou syntézou usnadnit přípravu nových analogů známých léčiv, která by měla sníženou toxicitu či zvýšený terapeutický účinek, nebo pro využití některých surovin, jejichž chemické zpracování není možné nebo je ekonomicky nevýhodné. Schopnost explantátových kultur glykosylovat přidané prekurzory byla využita např. u buněčných suspenzních kultur *Costus speciosus*. Po kultivaci s přidaným diosgeninem byl následně izolován 3-*O*-[β-D-glukopyranosyl-(1“→2‘)-β-D-glukopyranosyl]- a 27-*O*-β-D-glukopyranosyl-(25*R*)-spirost-5-en-3-β-27-diol [4]. Dva nové produkty biotransformace – kyselina N-acetyl-m-aminobenzoová a kyselina N-formyl-m-aminobenzoová byly izolovány z buněčné suspenzní kultury *Solanum laciniatum* po přidání kyseliny m-aminobenzoové [5].

Cílem naší práce byla transformace přidávaných prekurzorů na arbutin a salicin. Je pokračováním již publikovaných prací [6–9]. Arbutin jako terapeuticky významný sekundární metabolit je obsahovou látkou drogy *Folium uvae-ursi*, která je využívána v urologických čajovinách a působí jako močové desinficiens. Byly prokázány jeho další účinky jako antimikrobiální, antitussický atd. Získání této drogy z polních kultur je velmi obtížné a v uplynulých letech se ho v České republice nepodařilo realizovat. Do téže skupiny fenolických glykosidů jako arbutin patří glykosid salicin z drogy *Cortex salicis* (antirevmatikum). Některé počáteční prekurzory biosyntézy těchto glykosidů jsou shodné. Při výběru použitých prekurzorů jsme vycházeli ze schématu na obrázku 1.

POKUSNÁ ČÁST

Výchozí biologický materiál

Pro testování biotransformačních schopností byly použity *in vitro* tyto kultury:

Datura meteloides DC. (kultura odvozená z embryí, médium MS – 2,4-D 1,0 mg.l^{-1});

Coronilla varia L. (kultura odvozená ze vzrostných vrcholů, médium MS – 2,4-D 1,0 mg.l^{-1});

Leuzea carthamoides DC. (kultura odvozená ze vzrostných vrcholů, médium MS – 2,4-D 1,0 mg.l^{-1} + K 1,0 mg.l^{-1});

Schisandra chinensis (Turcz.) Baill. (kultura odvozená z květních pupenů, médium MS – 2,4-D 0,1 mg.l^{-1}).

Testované prekurzory (konc.100 mg.l^{-1}):

Kyselina salicylová, 2-hydroxybenzylalkohol, kyselina o-kumarová, kyselina skořicová, fenylalanin, salicylaldehyd, helicin, kyselina p-kumarová, kyselina p-anisová, hydrochinon.

Doba působení prekurzorů:

Odběry vzorků kalusů a médií pro analýzu metabolitů byly provedeny po 6; 12; 24; 48 a 168 hodinách působení prekurzorů.

Kvalitativní analýza metabolitů

Příprava extraktu

Kalusy byly usušeny při obyčejné teplotě, rozetřeny v třecí misce a navážka 0,500 g extrahována po dobu 48 h za studena v 10 ml ethanolu. Extrakt byl následně zfiltrován a odpařen.

proLékaře.cz | 19.12.2025

Použité standardy

0,1% methanolické roztoky arbutinu, methylarbutinu, hydrochinonu, 4-methoxyfenolu, 0,1% ethanolické roztoky kyseliny p-kumarové, p-anisové, skořicové, p-hydroxybenzoové, helicinu, salicinu a salicylalkoholu a 0,1% vodný roztok fenylalaninu.

TLC fenolických látek

Vyvíjecí soustavy:

a) chloroform–methanol (80:20),

b) butanol–kyselina octová–voda (4:1:5),

c) chloroform–ethylester kyseliny octové–toluen (80:20:5),

d) dichlormethan–kyselina octová–voda (2:1:1).

Detekce:

1. postupný postřik vodnými roztoky 4-aminoantipyrinu (0,02 mol.l^{-1}), amoniaku (20 %) a $K_3Fe(CN)_6$ (1 %) [10];

2. postřik směsí 3% kyseliny chloristé a 1% vanilinu v poměru 1:1 a zahřátí v sušárně na 90 °C [11];

3. postřik směsí 1% ethanolického roztoku $FeCl_3$ a 1% vodného roztoku $K_3Fe(CN)_6$ [11];

4. postřik směsí 5% vodného roztoku $AgNO_3$ a koncentrovaného amoniaku smíchaných v poměru 9:1 těsně před upotřebením a zahřátí v sušárně na 100 °C [11];

5. postřik 0,05% roztokem bromkresolové zeleně [10];

6. postřik 0,5% ethanolickým roztokem 1-naftylaminu, pozorování pod UV 254 nm [11];

Před detekcí methylarbutinu, salicinu a helicinu byla provedena hydrolýza postřikem HCl (1 mol.l^{-1}) a 15 min zahřátím v sušárně při 105 °C. Poté se zalkalizuje postřikem 20% roztokem amoniaku.

TLC aminokyselin

Vyvíjecí soustava: n-butanol–propanol–kyselina octová–voda (30:10:10:10) vyvíjení 2x.

Detekce: postřik směsí 0,5 g ninhydrinu rozpuštěného v 50 ml ethanolu, 14,5 ml kolidinu a 10 ml kyseliny octové; následné zahřátí v sušárně na 105 °C [11].

TLC salicinu

Vyvíjecí soustava: chloroform–methanol (85:15).

Detekce: postřik směsí 3 ml H_2SO_4 (3 mol.l^{-1}) s 10 ml vody a zahřátí v sušárně na 100 °C.

Stejné metabolity jako v extraktech kalusů byly sledovány ve slepých vzorcích (tj. bez přidaného prekurzoru) a v živných médiích.

U všech vzorků byla provedena rovněž TLC s denzitometrickou detekcí. Nanášení vzorků v tomto případě bylo prováděno pomocí přístroje Linomat 5. Vyvinuté desky po umístění do komory vyhodnocuje PC, který je součástí přístroje Camag TLC scanner 3. Použité UV světlo v rozsahu 200–450 nm.

Kvantitativní analýza sledovaných metabolitů

Kvantitativní analýza sledovaných metabolitů byla provedena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) [12]:

pumpa: PU 4100

detektor: PU 4110 UV/VIS
DAD PU 4021 multichannel detektor

předkolona: 30x3 mm CGC SGX C_{18}, velikost částic 10 µm (TESSEK Praha)

teplota: 25 °C

HPLC fenolických látek

Kolona: 250x4 mm SGX C_{18} 7 µm.

Analýza frakce „kyselin“:
eluce isokratická, methanol:vodný roztok H_3PO_4 (0,01 mol.l^{-1}) v poměru 50:50 (v/v),
průtoková rychlost mobilní fáze 1,5 ml.min^{-1},
detekce UV/VIS PU 4110,
monitorovaná vlnová délka 224 nm.

Analýza frakce „alkoholů“:
eluce gradientová, methanol:vodný roztok H_3PO_4 (0,01 mol.l^{-1}) v poměru 5:95 (v/v) s lineárně se zvyšujícím poměrem methanolu až na poměr 95:5 v průběhu 15 min,
průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml.min^{-1},
detekce UV/VIS PU 4110, monitorovaná vlnová délka 285 nm.

HPLC salicylátů

Kolona: 250x4 mm PUROSPHER RP – 18 endcaped, velikost částic 5 µm (Merck, Darmstadt).

Analýza frakce „kyselin“:
eluce isokratická, methanol:vodný roztok H_3PO_4 (0,01 mol.l^{-1}) v poměru 50:50,
průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml.l^{-1},
detekce UV/VIS PU 4110, monitorovaná vlnová délka 224 nm.

Analýza frakce „alkoholů“:
eluce gradientová, methanol:voda 15:85 s lineárně se zvyšujícím podílem methanolu až na poměr 35:65,
průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml.min^{-1},
detekce UV/VIS PU 4110, monitorovaná vlnová délka 224 nm.

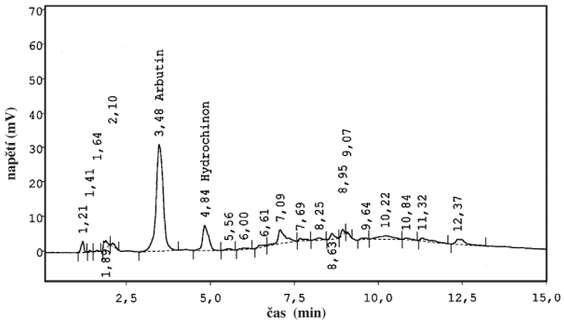
K identifikaci látek byl použit záznam UV spektra pořízeného pomocí DAD (diode array detektor), monitorovaná oblast byla 190–390 nm.

Pro výpočet množství látek byla použita metoda vnějšího standardu. Výsledek je uveden v hmotnostních procentech – vztaženo na navážku suchého extraktu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Pokrokem při získávání biologicky aktivních látek je využití biomasy rostlinných buněk *in vitro* jako suroviny pro jejich izolaci. V posledním období nastal významný posun ve vývoji nových technik, kterými je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace terapeuticky významných sekundárních metabolitů v těchto kulturách. Jednou z možností, kterou se zabývá i naše práce, je využití biosyntetické kapacity kultur rostlinných buněk pro biotransformační reakce exogenních prekurzorů. Znalost metabolických drah usnadní nalezení vhodných prekurzorů, které umožní syntézu žádané látky. V intaktní rostlině *Arctostaphylos uva-ursi* je arbutin tvořen z tyrosinu přes kyselinu 4-hydroxybenzoovou a hydrochinon. Lze jej získat izolací z intaktní rostliny nebo několikastupňovou chemickou syntézou. Obě cesty jsou časově a ekonomicky náročné. Další možností je využití kultur *in vitro*. Tkáňová kultura *Arctostaphylos uva-ursi* arbutin, methylarbutin ani jejich aglykony neprodukuje [13]. Proto jsme se v další práci pokusili iniciovat tvorbu těchto látek v kultuře pomocí exogenních prekurzorů (tyrosinu, kyseliny 4-hydroxybenzoové a hydrochinonu). Byly testovány jejich různé koncentrace, nejvhodnější doba podání prekurzorů a různé časové intervaly působení prekurzorů. Bylo zjištěno, že v tkáňové kultuře *Arctostaphylos uva-ursi* neprobíhá dekarboxylace kyseliny 4-hydroxybenzoové na hydrochinon. Následná glykosylace hydrochinonu na arbutin byla prokázána [6]. Schopnost transformovat výše jmenované prekurzory na arbutin se nám podařilo dále prokázat u kultur *Datura meteloides*, *Datura innoxia*, *Rhodiola rosea*, *Rheum palmatum*, *Leuzea carthamoides*, *Leonurus cardiaca*, *Coronilla varia*, *Brassica oleracea*, *Bergenia crassifolia* a *Bellis perennis*, přičemž procento arbutinu dosaže-

Farmacie 2/05 22.2.2005 13:49 Stránka 81
proLékaře.cz | 19.12.2025



Obr. 2. Chromatogram extraktu kalusu Schisandra chinensis (prekurzor hydrochinon, interval odběru = 1 týden)

né transformací hydrochinonu kulturami rodu *Datura* odpovídá procentuálnímu obsahu v intaktní rostlině medvědice léčivé [7, 9]. Biotransformace hydrochinonu na arbutin byla popsána rovněž kulturami *Rauwolfia serpentina* a *Catharanthus roseus* [14, 15]. Cílem této práce bylo pokračování v testování biotransformačních schopností kultur *Datura meteloides*, *Coronilla varia, Leuzea carthamoides* a *Schisandra chinensis,* které byly na základě předchozích pokusů vytipovány jako perspektivní. K těmto kulturám byly přidávány další dosud nezkoušené prekurzory arbutinu (fenylalanin, kyselina skořicová, p-kumarová a p-anisová) a dále dosud nezkoušené prekurzory vedoucí k salicinu (fenylalanin, kyselina skořicová, o-kumarová, salicylová, salicylaldehyd, helicin). Ke kultuře *Schisandra chinensis* byl přidáván kromě výše uvedených prekurzorů rovněž hydrochinon, neboť tato kultura nebyla dosud k biotransformačním účelům použita. Pozitivní výsledky (TLC i HPLC) v produkci arbutinu byly získány pouze po přidání hydrochinonu ke kultuře *Schisandra chinensis*. Nejvyšší množství arbutinu (5,08 % – odpovídá obsahu v intaktní rostlině *Arctostaphylos uva-ursi*) bylo v extraktech kalusů naměřeno po týdenní kultivaci s hydrochinonem (obr. 2). V této pokusné variantě docházelo i k uvolňování arbutinu do živného média (0,18 %).

Na základě výsledků TLC i HPLC se jako optimální prekurzor salicinu ukázal salicylaldehyd. Po jeho aplikaci v koncentraci 100 mg.l^{-1} produkovala salicin kultura *Datura meteloides* při působení prekurzoru 6 hod. (7,91.10^{-2} %), 24 h (1,61.10^{-2} %) a 168 h (6,12.10^{-2} %) a kultura *Coronilla varia* při působení prekurzoru 6 h (1,38.10^{-2} %). Ostatní přidávané prekurzory nebyly výše uvedenými kulturami transformovány.

Z dosažených výsledků vyplývá, že ani detailní znalost biosyntéz a z nich odvozených prekurzorů nemusí vést vždy k pozitivním výsledkům. Dosažených 5 % arbutinu v kultuře *Schisandra chinensis* (intaktní rostlina arbutin neprodukuje) po transformaci hydrochinonu je však velmi nadějným výsledkem, zvláště s přihlédnutím k neschopnosti realizovat polní kulturu *Arctostaphylos uva-ursi* na straně jedné a s ojedinělým výskytem divoce rostoucích rostlin a jejich ochranou na straně druhé. Uvedené cesty jsou jednou z možností jak zabránit totálnímu vyhubení 4 až10 tisícům druhů rostlin v důsledku jejich spotřeby jako suroviny pro výrobu léčiv (výsledek celosvětového odhadu) a pomoci tak zabezpečit každoroční 10% nárůst výroby léčiv přírodního původu.

Práce byla vypracována za podpory Výzkumných záměrů (CEZ J 13/98:11600003) a Výzkumného centra LNOOB125.

LITERATURA

1. **Mühlbach, H. P.:** Biotechnol. Annu. Rev., 1998; 4, 113.
2. **Zenk, M. H., El-Shagi, H., Stöckigt, J. et al.:** In Plant tissue culture and its biotechnological application (Bartz, W., Reinhard, E. Zenk, M. H. eds.), Berlin, Springer Verlag, 1977, s. 27.
3. **Dušek, J., Dušková, J., Tůmová, L., Spilková, J.:** Čes. slov. Farm., 1996; 45, 209.
4. **Indrayanto, G., Zumaroh, S., Syahrani, A., Wilkins, A. L.:** J. Asian Natur. Prod. Res., 2001; 3, 161.
5. **Syahrani, A., Panjaitan, T. S., Indrayanto, G., Wilkins, A. L.:** J. Asian Natur. Prod. Res., 2000; 2, 305.
6. **Dušková, J., Jahodář, L., Dušek, J.:** Čes. slov. Farm., 1990; 39, 452.
7. **Dušková, J., Jahodář, L., Dušek, J.:** Pharmazie, 1994; 49, 624.
8. **Jahodář, L., Dušková, J., Polášek, M., Papugová, P.:** Pharmazie, 1999; 54, 234.
9. **Dušková, J., Dušek, J., Jahodář, L.:** Herba Pol., 1999; 45, 23.
10. **Šaršúnová, M., Schwarz, W., Michalec, Č.:** Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a klinickej biochémii. 2. vyd. Martin, Osveta, 1997.
11. **Gasparič, J., Churáček, J.:** Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin. 1. vyd. Praha, SNTL, 1981.
12. **Holopainen, M., Jahodář, L., Seppänen-Laakso, T. et al.:** Acta Pharm. Fenn., 1988; 97, 197.
13. **Dušková, J., Dušek, J.:** Čes. slov. Farm., 1989; 38, 257.
14. **Stöckigt, J., Obitz, P., Falkenhagen, H. et al.:** Plant Cell Tissue Organ Cult., 1995; 43, 97.
15. **Yokoyama, M., Inomata, S., Seto, S., Yanagi, M.:** Plant Cell Physiol., 1990; 31, 551.

Došlo 3. 4. 2004.
Přijato ke zveřejnění 1. 7. 2004.

doc. RNDr. Jiřina Dušková, CSc.
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail duskova@faf.cuni.cz