



Zawartość ginsenozydów w kulturach komórkowych *Panax quinquefolium*

Ewa Kochan, Grażyna Gadomska, Halina Wysokińska
Aleksander Chmiel

Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny, Łódź

Ginsenosides contents in *Panax quinquefolium* cultures

Summary

Contents of six main saponins (Rb₁, Rb₂, Rc i Rd – protopanaxadiols, Rg₁ i Re – protopanatriols) were investigated in callus and suspension cultures of *Panax quinquefolium*. HPLC method was used to indicate saponins quantitatively. Qualitative composition and the amount of individual ginsenosides varied depending on culture age and light conditions. The younger calli, grown in dark, produced all indicated metabolites, and protopanatriols were dominant. In older callus cultures, only 3 of the saponins (Rg₁, Re, Rb₁) were present. The calli grown in light did not synthesize protopanaxadiols at all. Although suspension cultures contained all of the 6 above indicated metabolites, ginsenosides Re and Rd were predominant and reached the highest level, 2,7 mg/g d.w. and 1,2 mg/g d.w. respectively.

Key words:

Panax quinquefolium, callus cultures, suspension cultures, ginsenosides.

Adres do korespondencji

Ewa Kochan,
Katedra Biologii
i Biotechnologii
Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź;
e-mail:
biosynteza@pharm.am.
lodz.pl

biotechnologia

1 (64) 236–243 2004

1. Wstęp

Żeń-szeń (*Panax*, rodzina *Araliaceae*) jest rośliną leczniczą, od wieków stosowaną w medycynie dalekowschodniej i tradycyjnej medycynie Indian północnoamerykańskich. Rodzaj *Panax* obejmuje wiele gatunków występujących w umiarkowanej strefie klimatycznej półkuli północnej: *Panax ginseng* – żeń-szeń właściwy (Mandżuria, Korea i Rosja); *P. japonicus*, *P. vietnamiensis* i *P. notoginseng* (tereny Azji Wschodniej i Południowej) (1,2) oraz *Panax quinquefolium* (Kanada, wschodnia i środkowa część USA). Głównymi związkami

czynnymi są ginsenozydy (panaksozydy) – saponiny triterpenowe o charakterze glikozydowym. Aglikonem jest w nich układ damaranu, natomiast część cukrowa składa się z kilku cukrów prostych, najczęściej: D-glukozy, D-galaktozy, D-ksylozy, L-arabinozy, a także kwasów uronowych: D-glukuronowego, D-galakturonowego. Dotąd wyizolowano i zidentyfikowano ponad 30 saponin żeńszeniowych. Zostały one sklasyfikowane jako: 20(S)-protopanaksadiole (np. Rb₁, Rb₂, Rc, Rd), 20(S)-protopanaxatriole (np. Re, Rg₁, Rg₂) oraz pochodne kwasu oleanowego (np. Ro). Za biologiczne działanie żeń-szenia, oprócz ginsenozydów, odpowiadają także polisacharydy, poliacetyleny, peptydoglikany, witaminy, cholinę oraz mikroelementy (3).

W licznych badaniach dotyczących farmakologii żeń-szenia stwierdzono, że ekstrakt z korzeni tej rośliny wpływa na poprawę ogólnej przemiany materii, zwiększenie wydolności fizycznej i umysłowej, przeciwdziała zmęczeniu, reguluje ciśnienie krwi (3,4); ma właściwości adaptogenne, antystresowe związane z efektem oksydacyjnym, immunostymulujące oraz neuro- i radioochronne (5-11). Tak szeroki i różnorodny zakres działania spowodował wzrost zapotrzebowania na surowiec. Doprowadziło to do drastycznego zmniejszenia się naturalnych zasobów tej rośliny i wpisania jej do tzw. „Czerwonej Księgi” ginących gatunków. W kilku krajach (m.in. w Chinach, Japonii, Wietnamie, Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Polsce) żeń-szeń został wprowadzony do upraw polowych. Metoda pozyskiwania roślin z gruntu nie jest jednak doskonała z uwagi na długi okres oczekiwania na wartościowy farmakologicznie surowiec, pracochłonność upraw i podatność żeń-szenia na choroby grzybowe.

Prowadzone są prace nad wykorzystaniem kultur roślinnych *in vitro* jako alternatywnego źródła substancji leczniczych, niezależniącego w pewnym stopniu przemysł farmaceutyczny od surowców pozyskiwanych z upraw (12). Technologie przemysłowe kultur *P. ginseng* opracowano w Japonii, byłym ZSRR, Izraelu i Hong-Kongu (13). W naszym laboratorium podjęto prace mające na celu otrzymanie kultur komórkowych *P. quinquefolium* oraz badania zawartości saponin w tych kulturach.

2. Materiały i metody

2.1. Kultury *in vitro*

Materiałem do badań były wysuszone w temperaturze pokojowej kultury kalusowe i zawiesinowe. Kultury kalusowe rosły przez 5 tygodni na podłożu MS (Murashige i Skooga) z dodatkiem kwasu naftylo-1-octowego (NAA) 1mg/l; kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) 1 mg/l; 6-benzyloaminopuryny (BAP) 0,5 mg/l; 50 g/l sacharozy; na świetle (pasaż 30-35) i w ciemności (pasaże 10-18 i 31-35). Kultury zawiesinowe hodowano przez 4 tygodnie na świetle, w kolbach wstrząsanych o po-

jemności 250 ml, zawierających podłoże MS z dodatkiem 2,4-D 0,2 mg/l; TDZ 2×10^{-3} mg/l.

2.2. Ekstrakcja saponin

Ekstrakcję saponin z 1 g suchego materiału każdej próby badanego surowca prowadzono w 3-6 powtórzeniach. Materiał poddawano ekstrakcji trzykrotnie w 50 ml 80% metanolu w 250 ml kolbach przez 30 min w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną. Połączone ekstrakty metanolowe sączono i odparowano do sucha na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 60°C. Kolbę z suchą pozostałością umieszczano w eksykatorze ze środkiem suszącym. Suchy ekstrakt metanolowy ważono.

2.3. Wydzielenie saponin z frakcji metanolowej

Suchy ekstrakt metanolowy rozpuszczano w 2,5 ml wody destylowanej. Pobierano 1,8 ml roztworu i наносzono na kolumnę EXTRELUT NT 3. Po 15 min kolumnę przemywano 15 ml butanolu wysyconego wodą destylowaną. Klarowny przesącz odparowywano na wyparce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem w 70°C. Otrzymaną frakcję saponinową ważono i przechowywano w eksykatorze w postaci suchego ekstraktu.

2.4. Analiza ilościowa saponin

Suche ekstrakty rozpuszczano w 2 ml czystego metanolu (przeznaczonego do HPLC) i filtrowano przez sączki Millex[®]-FG Hydrophobic Fluoropore (PTFE) o średnicy porów 0,2 µm. Dalszą analizę przeprowadzano przy użyciu zestawu wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej składającego się z kolumny LiChro CART.[®] 250-4, pompy Waters 600 Controller oraz detektora UV-VIS Waters 996 sprzężonego z komputerem Pentium 60 PCI, wyposażonym w oprogramowanie Millennium. Próby do HPLC наносzono w objętości 5 µl. Jako eluentu używano mieszaniny acetonitrylu i wody, w dwóch proporcjach:

- a) 30 : 70 do oznaczania ginsenozydów Rb₁, Rb₂, Rc i Rd (szybkość przepływu 2 ml/min, czas analizy – 45 minut),
- b) 18 : 82 do oznaczania ginsenozydów Rg₁ i Re (szybkość przepływu 3 ml/min, czas analizy – 40 minut).

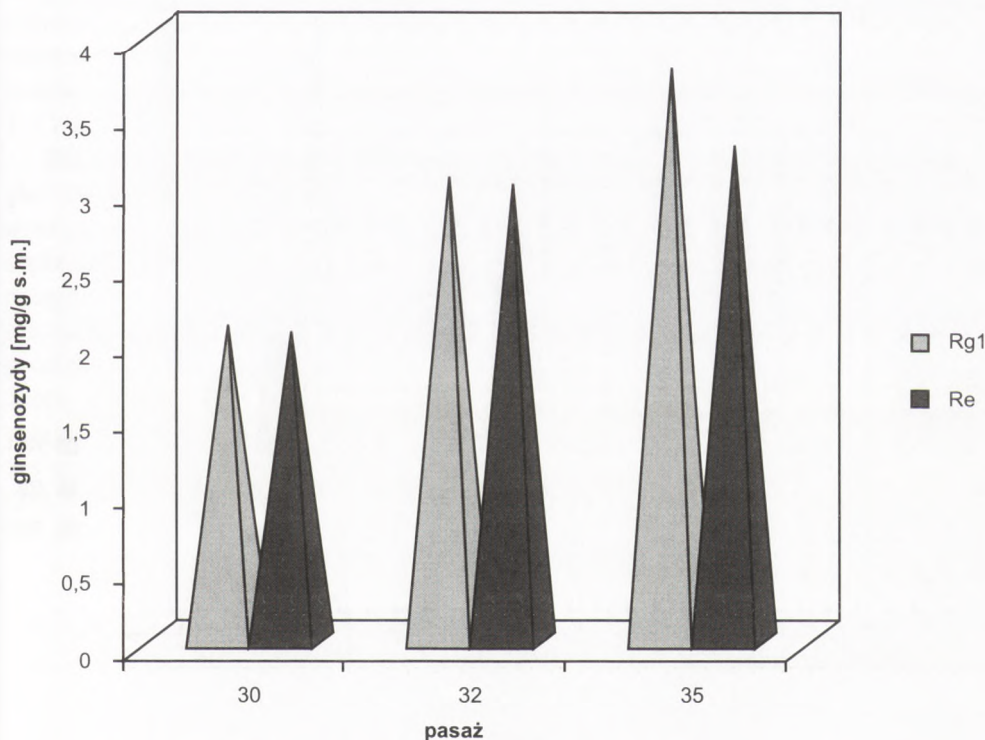
Oznaczenia wykonano przy długości fali 203 nm.

3. Wyniki i ich dyskusja

Przedmiotem pracy są wstępne badania zawartości saponin w kulturach kalusowych i zawiesinowych *P. quinquefolium*.

3.1. Kultury kalusowe

W kulturach kalusowych kompozycja i zawartość ginsenozydów zmieniały się w zależności od wieku kultury i warunków oświetlenia. Kalusy młodsze (pasaże 10-18), rosnące w ciemności produkowały saponiny należące do obu grup: protopanaksadioli i protopanaksatrioli; przy czym ilościowo dominowały protopanaksatriole, stanowiące około 60% całości oznaczanych saponin. Zawartość metabolitów Rg₁ i Re stopniowo wzrastała. Spośród protopanaksadioli najwięcej gromadziło się ginsenozydu Rb₁ (około 1 mg/g s.m.), mniej Rd i Rb₂, a w najmniejszej ilości występował ginsenozyd Rc (około 0,06 mg/g s.m.). W starszych kalusach (pasaże 31-35), zaobserwowano stopniowy wzrost zawartości jednego z oznaczanych protopanaksatrioli



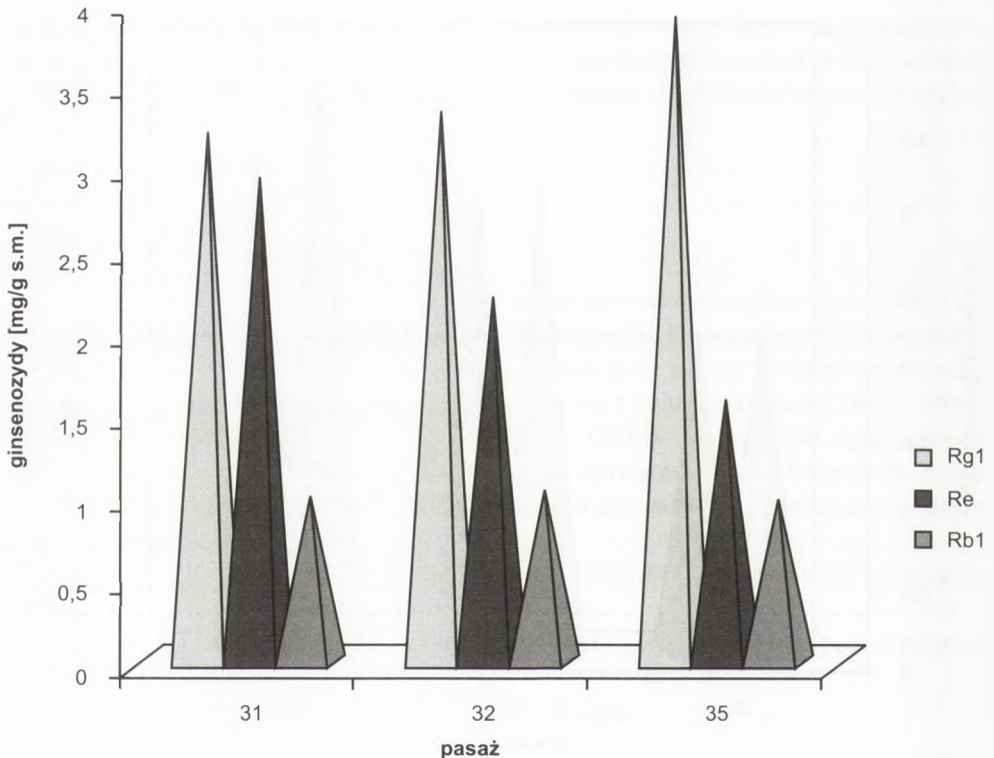
Rys. 1. Zawartość ginsenozydów w kalusach hodowanych na świetle.

– ginsenozydu Rg_1 . Spośród protopanaksadioli ilościowo oznaczono tylko metabolit Rb_1 , przy czym jego poziom wahał się nieznacznie w zależności od wieku badanej hodowli (tab., rys. 2). Kalusy ze światła (pasaże 30-35) produkowały jedynie saponiny z grupy protopanaksatrioli. Zawartość zarówno Rg_1 jak i Re wzrastała stopniowo i wynosiła dla Rg_1 około 2,1 mg/g s.m. (w pasażu 30) i 3,8 mg/g s.m. (w pasażu 35) oraz dla Re odpowiednio około 2,0 i 3,3 mg/g s.m. (rys. 1).

Tabela

Zawartość ginsenozydów w kalusach hodowanych w ciemności

Pasaż	Ginsenozydy [mg/g]						Suma
	Rg_1	Re	Rb_1	Rb_2	Rc	Rd	
10	0,75	1,57	0,94	0,38	0,05	0,58	4,26
13	1,29	1,91	1,07	0,47	0,07	0,62	5,39
18	1,33	1,98	0,98	0,44	0,07	0,74	5,54
31	3,20	2,93	0,10	—	—	—	5,32
32	3,32	2,21	1,04	—	—	—	6,36
35	3,90	1,58	0,98	—	—	—	6,46



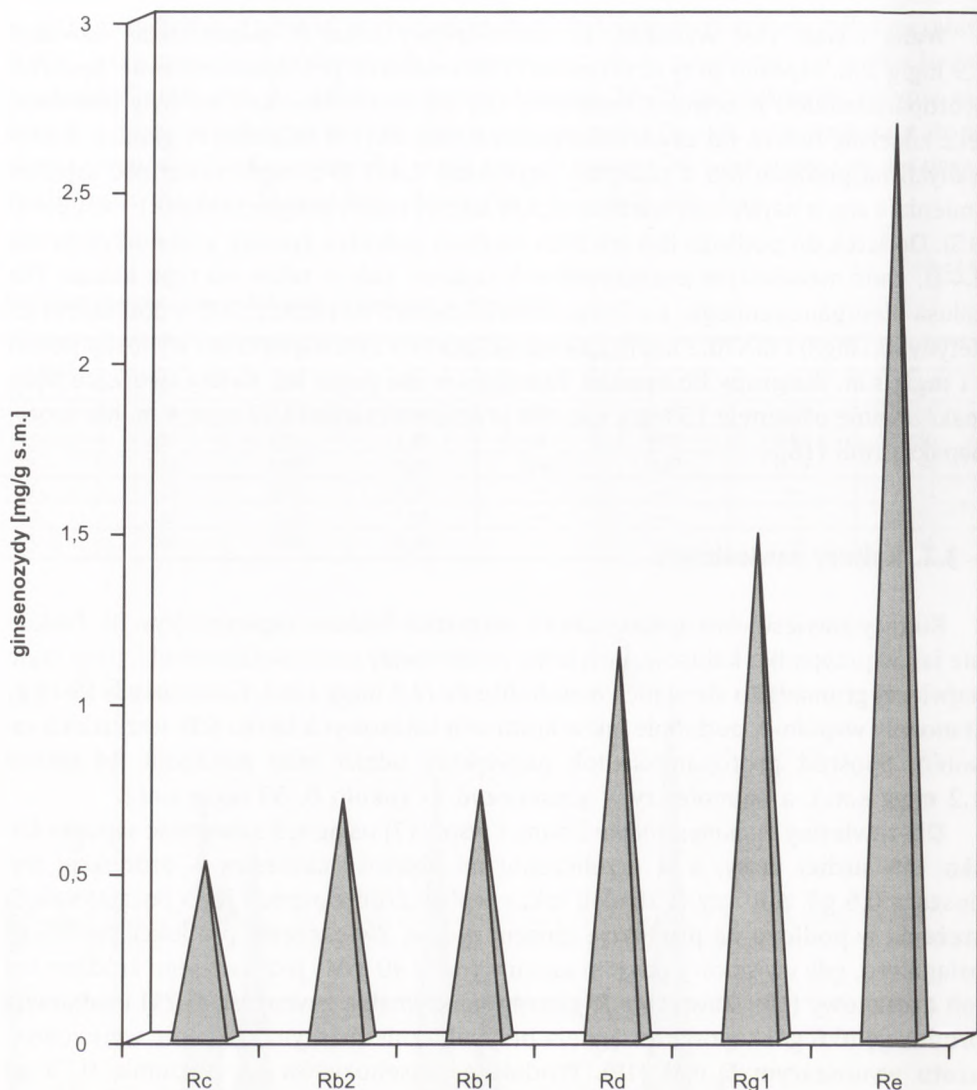
Rys. 2. Zawartość ginsenozydów w kalusach hodowanych w ciemności.

Wang i wsp. (14) wykazali, że embriogenny kalus *P. quinquefolium* zawierał 1,9 mg/g s.m. saponin przy czym ponad 70% stanowiły protopanaxatriole. Spośród protopanaxadioli przeważał metabolit Rb₁ zaś ilości Rb₂, Rc i Rd były podobne, lecz znacznie niższe od zawartości ginsenozydu Rb₁. W kalusach *P. ginseng*, hodowanych na podłożu MS z różnymi stężeniami 2,4-D (0-5 mg/l) zawartość saponin zmieniała się, a najwyższą wartość (0,82% suchej masy) osiągnęła dla 0,1 mg/l 2,4-D (15). Dodatek do podłoża IBA lub NAA bardziej pobudza syntezę ginsenozydów niż 2,4-D, choć metabolizm poszczególnych saponin zależy także od typu kalusa. Dla kalusa nieorganogennego, po 5 tygodniach hodowli na podłożu MS z dodatkiem kinetyny (0,1mg/l) i IBA (0,2 mg/l), zawartość saponin była najwyższa i wynosiła ponad 11 mg/g s.m. dla grupy Rb i ponad 30 mg/g s.m. dla grupy Rg. Kalusy tworzące pędy maksymalnie osiągnęły 15 mg/g s.m. dla protopanaxadioli i 32 mg/g s.m. dla protopanaxatrioli (16).

3.2. Kultury zawiesinowe

Kultury zawiesinowe syntetyzowały wszystkie badane saponiny (rys. 3). Podobnie jak w przypadku kalusów, ilościowo dominowały protopanaxatriole, przy czym najwięcej gromadziło się w nich metabolitu Re (2,7 mg/g s.m.). Ginsenozydy Re i Rg₁ stanowiły wspólnie, podobnie jak w kulturach kalusowych blisko 60% wszystkich saponin. Spośród protopanaxadioli największy udział miał metabolit Rd (około 1,2 mg/g s.m.), a najmniejszy – ginsenozyd Rc (około 0, 53 mg/g s.m.).

Dla zawiesiny *P. quinquefolium* Zhong i wsp. (17) osiągnęli zawartość saponin blisko 11% suchej masy, a w przeliczeniu na objętość zawiesiny – produkcję wynoszącą 0,6 g/l. Autorzy ci zbadali także wpływ źródła azotu i jego początkowego stężenia w podłożu na produkcję ginsenozydów. Zwiększenie produkcji do 1,5 g/l osiągnięto, gdy wyjściowy poziom azotu wynosił 40 mM i jedynym jego źródłem był jon azotanowy (18). Zawiesina *P. ginseng* maksymalną zawartość (5,2%) i całkowitą produkcję (0,6 g/l) saponin osiągnęła przy znacznie niższym poziomie wyjściowym azotu wynoszącym 5 mM (19). Produkcję ginsenozydów na poziomie 0,73 g/l osiągnięto modyfikując początkową zawartość jonów K⁺ do stężenia 60 mM (20), zaś przy zmianie stężenia Cu⁺ do 10 μM produkcja maksymalnie wyniosła 1,19 g/l (21).



Rys. 3. Zawartość ginsenozydów w kulturach zawiesinowych po 28 dniach hodowli.

4. Podsumowanie

Skład jakościowy i zawartość ginsenozydów w kulturach kalusowych zmieniały się w zależności od wieku kultur i warunków oświetlenia. Młodsze kalusy produkowały wszystkie badane saponiny Rb₁, Rb₂, Rc, Rd (protopanaksadiole), Re i Rg₁ (protopanaksatriole), przy czym protopanaksatriole stanowiły 60% całości badanych ginsenozydów. Starsze kalusy spośród protopanaksadioli syntetyzowały tylko metabo-

lit Rb₁. W kalusach hodowanych na świetle oznaczono jedynie metabolity Re i Rg₁. Zawiesiny podobnie jak młodsze kalusy produkowały wszystkie badane saponiny. Ilościowo dominował ginsenozyd Re (2,7 mg/g s.m.), zaś spośród protopanaxadioli najwyższą zawartość osiągnął metabolit Rd (1,2 mg/g s.m.).

Praca finansowana przez KBN, grant nr 0399/P05/2002/23.

Literatura

1. Berbec S., Dziedzic M., (1996), *Uprawa żeń-szenia amerykańskiego*, Wyd. AR, Lublin, 7-24.
2. Lutomski J., (1992), *Herba Polonica XXXVIII*, 4, 203-211.
3. Court W. E., (2000), *Ginseng. The Genus Panax (Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles)*, Harwood Academic Publishers.
4. Wenes K. A., Ward T., McGinty A., Petrini O., (2000), *Phytopharmacol.*, 152 (4), 353-361.
5. Lewis R., Wake, Court J. A., Pickering A. T., Kim Y., Perry E. K., (1999), *Phytother. Res.*, 13, 1, 59-64.
6. Kitts D. D., Wijewiokremo A. N., Hu C., (2000), *Mol. and Cell. Biochem.*, 203 (1-2), 1-10.
7. Park K. M., Kim Y. S., Jeong T. C., Joe C. O., Shin H. J., Lee Y. H., Nam K. Y., Park J. D., (2001), *Planta Med.*, 67, (20), 122-126.
8. Lim J. H., Wen T. C., Matsuda S., Tanaka J., Maeda N., Peng H., Ishihara K., Sanaka M., (1997), *Neurosci. Res.*, 23, 3, 191-200.
9. Siddique M. S., Eddeb F., Mantle D., Mendelow A. D., (2000), *Acta Neurochir. Suppl.*, 76, 87-90.
10. Court W.E., (2000), *Ginseng The Genus Panax (The pharmacology and therapeutics of ginseng)*, Harwood Academic Publ., Amsterdam, 134-139.
11. Nocerino E., Amanto M., Izzo A. A., (2000), *Fitoterapia*, 29, 2, 113-133.
12. Skrzypczak-Pietraszek E., Grzybek J., (1997), *Biotechnologia*, 2(37), 92-105.
13. Wu J., Zhong J. J., (1999), *J. Biotechnol.*, 68, 89-99.
14. Wang X., Proctor J. T. A., Kakuda Y., Raj S. K., Saxena P. K., (1999), *J. Herbst Species Med. Plants*, 6 (3), 1-10.
15. Furuya T., Yoshikawa T., Kajii K., (1983), *Planta Medica*, 47, 183-187.
16. Bonfill M., Cusidó R. M., Palazón J., Pióol M. T., Morales C., (2002), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 68, 73-78.
17. Zhong J-J., Bai Y., Wang S.-J., (1996), *J. Biotechnol.*, 45, 227-234.
18. Zhong J-J., Wang S.-J., (1998), *Process Biochem.*, 33(6), 671-675.
19. Liu S., Zhong J-J., (1997), *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 518-524.
20. Liu S., Zhong J-J., (1996), *J. Biotechnol.*, 52, 121-126.
21. Zhong J-J., Wang D. J., (1996), *J. Biotechnol.*, 46, 69-72.