

STANISŁAW MUSZYŃSKI, WIESŁAW GUZEWSKI

## ANTOCYJANY ROŚLIN WYŻSZYCH

### Występowanie

Najważniejsze barwiki roślinne należą do trzech rodzajów pod względem budowy chemicznej, a mianowicie chlorofili, karotenoidów i flawonoli. Barwa zielona roślin warunkowana jest chlorofilami, barwa żółta kwiatów i owoców powodowana jest przede wszystkim karotenoidami, natomiast większość odcieni barwy czerwonej i niebieskiej łączy się z występowaniem barwików flawonoidowych (tabela I). Są to barwiki rozpuszczalne w wodzie. W komórce roślinnej zlokalizowane są w soku komórkowym. Flawonoidy dzielą się z kolei na antocyjany, flawonole i flawony.

Flawonole i flawony występują powszechnie w roślinach, warunkując barwy jasno-żółte i kremowe. W częściach zielonych roślin nie są one widoczne, ponieważ są maskowane przez chlorofile.

Najważniejszymi barwikami spośród flawonoidów są niewątpliwie antocyjany. Warunkują one barwy od pomarańczowej przez szkarłatną, karmazynową, purpurową i fioletową do niebieskiej. Występują one również powszechnie w roślinach wyższych; w największych ilościach gromadzą się w płatkach kwiatów i w owocach, chociaż występują również w liściach, korzeniach i w innych organach. Zazwyczaj antocyjany występują w liściach w niewielkich ilościach i nie są widoczne wobec przeważającej ilości chlorofili i karotenoidów; ich obecność ujawnia się w liściach bardzo młodych lub zamierających, a także w liściach form czerwolistnych, a więc w takich liściach, w których zawartość barwików zielonych i żółtych jest mniejsza.

Znaczenie barwy, zarówno kwiatów jak i owoców, polega na ułatwianiu rozmnażania roślin. Warunkowane antocyjanami barwy, najczęściej jaskrawe, ułatwiają zapylenie dzięki przywabianiu owadów. Niektórzy przyrodnicy uważają, że rośliny samopylne powstały z roślin obcopolnych i zachowały zdolność wytwarzania barwy, chociaż nie jest już ona im potrzebna do przywabiania owadów. Barwne owoce przywabiają natomiast ptaki i inne zwierzęta, przyczyniając się do rozsiewania nasion.

Antocyjany są typowymi barwnikami roślin wyższych, a ściślej mówiąc — okrytozalążkowych. Obecność ich stwierdzono również u nielicznych roślin nagozalążkowych (np. *Picea obovata*), mchów (*Bryum*) i prawdopodobnie u paprotników. Występują one u prawie wszystkich rodzin okrytozalążkowych. Do wyjątków należy np. rząd *Centrospermae*, gdzie na dziesięć rodzin jedynie *Caryophyllaceae* (goździkowate) zawierają antocyjany. Pozostałe rodziny tego rzędu zawierają betacyjaniny — barwiki, zawierające azot.

TABELA I

Zależność między występowaniem barwników a barwą kwiatów

Barwa	Barwniki	Przykłady
kość słoniowa i kremowa	flawony (np. apigenina) i /lub flawonole (np. kwercetyna)	odmiany <i>Antirrhinum majus</i> albo <i>Dahlia variabilis</i>
żółta	a) same karotenoidy b) same flawonole c) same aurony d) karotenoidy i flawonole	żółte róże ( <i>Rosa</i> ) <i>Primula vulgaris</i> żółte odmiany <i>Antirrhinum majus</i> <i>Lotus corniculatus</i>
pomarańczowa	a) same karotenoidy b) pelargonidyna i aurony	<i>Lilium regale</i> <i>Antirrhinum majus</i>
szkarłatna	a) sama pelargonidyna b) cyjanidyna i karotenoidy c) cyjanidyna i flawonoidy	<i>Pelargonium</i> , <i>Salvia splendens</i> tulipany ( <i>Tulipa</i> ) <i>Chasmanthe</i> , <i>Lapeyrousa</i>
brązowa	cyjanidyna i karotenoidy	<i>Cheiranthus cheiri</i> , <i>Rosa</i> , <i>Primula</i>
karmazynowa	sama cyjanidyna	<i>Camelia hortense</i> , <i>Begonia</i>
różowa	sama peonidyna	<i>Paeonia</i> , <i>Rosa rugosa</i>
fiolkowa	sama delfinidyna	<i>Verbena</i> , <i>Brunfelsia calycina</i>
niebieska	a) cyjanidyna i kopigment b) cyjanidyna w kompleksie c) delfinidyna i kopigment d) delfinidyna w kompleksie e) delfinidyna w zasadowym pH	<i>Meconopsis betonicifolia</i> <i>Centaurea cyanus</i> <i>Plumbago capensis</i> <i>Delphinium</i> , <i>Lupinus</i> <i>Primula chinensis</i>
czarna (ciemno-purpurowa)	delfinidyna w dużym stężeniu	tulipany ( <i>Tulipa</i> ), <i>Viola wittrockiana</i>

Badania barwników roślinnych mają bogatą historię. Zapoczątkowane zostały one w roku 1664. Słynny chemik Robert Boyle wykazał wtedy, że substancja barwna u *Viola tricolor* wykazuje szczególne własności: w środowisku kwaśnym przybiera barwę czerwoną, natomiast w alkalicznym — zieloną.

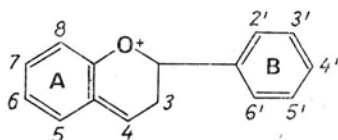
Nazwa „antocyjaniny” wprowadzona została w roku 1835 przez Marquarta. Chemia barwników flawonowych i antocyjanidyn opracowana została na przełomie obecnego stulecia przez Kostaneckiego, Willstättera i Perkinsa. Datą przełomową w badaniach nad barwnikami roślinnymi był rok 1915, kiedy to Willstät-

ter wyizolował z kwiatów chabra bławatka, a następnie oznaczył strukturę cyjanidyny.

W latach międzywojennych barwki były przedmiotem intensywnych badań zarówno biochemików jak i genetyków. Do czołowych placówek, zajmujących się barwikami, należał Instytut Johna Innesa w Anglii. Najwybitniejszymi badaczami barwików byli: Robinson w Anglii, Karrer w Szwajcarii i Hayashi w Japonii. Obecnie najobszerniejsze badania barwików flawonoidowych prowadzone są w Anglii pod kierunkiem J. B. Harborna.

### Budowa chemiczna

Cząsteczka antocyjaniny stanowi glikozyd czyli połączenie cząsteczki cukru z cząsteczką antocyjanidyny (rys. 1). Antocyjanidyny różnią się między sobą ilością grup hydroksylowych w pierścieniu B (ryc. 2). Pelargonidyna zawiera jedną grupę



Ryc. 1. Wzór strukturalny antocyjanidyn

hydroksylową, cyjanidyna — dwie takie grupy, a delfinidyna — aż trzy grupy. Ilość grup hydroksylowych wywiera decydujący wpływ na barwę antocyjanidyn. Ogólnie mówiąc, barwa różowa, szkarłatna i pomarańczowa warunkowana jest obecnością pelargonidyny, karmazynowa — cyjanidyny, fioletowa i niebieska — delfinidyny.

TABELA II

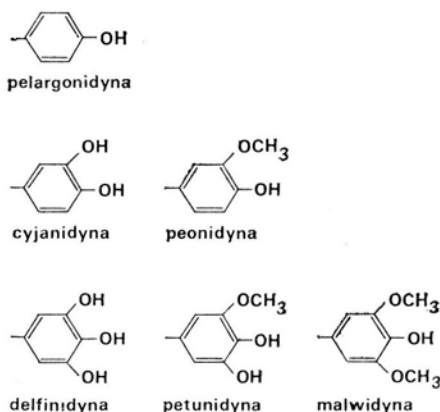
Zależność między rodzajem antocyjanidyn a barwą kwiatów u roślin Trynidadu

Barwa kwiatów	Liczba gatunków zawierających					Ogółem
	Dp	Dp + Cy	Cy	Cy + Pg	Pg	
żółtoczerwona	—	—	6	3	6	15
czerwona	7	6	57	14	8	92
niebieskoczerwona	21	8	19	1	—	49
czerwononiebieska	19	5	4	—	—	28
niebieska	11	1	2	—	—	14

Wymienione trzy antocyjanidyny należą do najczęściej spotykanych w kwiatkach (tabela II). Wśród 247 badanych gatunków roślin, barwa pomarańczowa powodowana była obecnością pelargonidyny, czerwona — cyjanidyny, fioletowa i niebieska — delfinidyny. Podobne wyniki uzyskano, badając roślinność Australii. Barwa nie-

bieska kwiatów warunkowana była obecnością delfinidyny u 90% roślin, a tylko u 10% — kopigmentacją cyjanidyny.

Grupy hydroksylowe pierścienia B antocyjanidyny ulegać mogą metylacji (ryc. 2). Metylacja powoduje niewielką zmianę barwy w kierunku czerwonej; świadczyć



Ryc. 2. Podstawniki w pierścieniu B u najczęściej występujących antocyjanidyn

o tym może niewielkie przesunięcie w widmie absorpcji (tabela III). Spośród antocyjanidyn metylowanych, najczęściej występują w roślinach malwidyna, peonidyna i petunidyna.

TABELA III

Znane antocyjanidyny

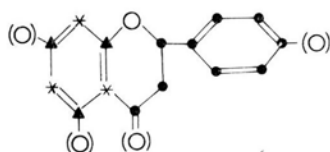
Nazwa i skrót	Podstawniki w obu pierścieniach	Długość fali maksymalnej absorpcji (m $\mu$ )	Barwa
Apigenidyna (Ap)	5,7,4'-trójhidroksy	476	pomarańczowożółta
Luteolinidyna (Lt)	5,7,3',4'-tetrahydroksy	493	pomarańczowa
Tricetinidyna (Tr)	5,7,3',4',5'-pentahydroksy	520	—
Pelargonidyna (Pg)	3,5,7,4'-tetrahydroksy	520	szkarłatna
Cyjanidyna (Cy)	3,5,7,3',4'-pentahydroksy	535	niebieskawoczerwona
Peonidyna (Pn)	eter Cy-3'-0-metylowy	532	— „ —
Rozynidyna (Rs)	eter Cy-7,3'-dwumetylowy	524	— „ —
Delfinidyna (Dp)	3,5,7,3',4',5'-heksahydroksy	546	purpurowoniebieska
Petunidyna (Pt)	eter Dp-3'-0-metylowy	546	— „ —
Malwidyna (Mv)	eter Dp-3',5'-dwo-0-metylowy	542	purpurowa
Hirzutydyna (Hs)	eter Dp-7,3',3',5'-trój-0-metylowy	536	niebieskoczerwona
Kapensinidyna (Cs)	eter Dp-5,3',5'-trój-0-metylowy	538	purpurowa
Kolumnidyna	5,7,8,3',4'- albo 5,6,7,3',4'-penta-hydroksyflawylum	511	pomarańczowoczerwona
Aurantynidyna	6- lub 8-hydroksypelargonidyna	499	— „ —
Pulchellidyna	eter Dp-5-0-metylowy	543	purpurowa
Europinidyna	eter Dp-5,3'-dwo-0-metylowy	542	purpurowa

Wszystkie występujące w przyrodzie antocyjaniny istnieją w postaci glikozydów. Są to połączenia antocyjanidyn z cukrami, zarówno jednocukrami jak i dwucukrami i trójcukrami. Cukry przyłączane są z reguły w pozycji 3 albo w pozycji 3 i 5 jednocześnie. Najczęściej występującymi w antocyjaninach cukrami prostymi są glukoza i galaktoza, a spośród dwucukrów — rutynoza, sambubioza i soforoza. Trzeba zaznaczyć, że glikozydacja nie wywiera wpływu na barwę antocyjanin.

### Biosynteza barwików flawonoidowych

Drobina antocyjanidyny składa się z piętnastu atomów węgla, tworzących trójpierścieniowy szkielet typu  $C_6-C_3-C_6$  oraz z przyłączonych do tego szkieletu podstawników. Szkielet węglowy obejmuje dwa sześciowęglowe pierścienie (zwane A i B) oraz łączący je mostek trójwęglowy, który wraz z jednym atomem tlenu tworzy pierścień środkowy (ryc. 1).

Pierścień A powstaje wskutek połączenia (kondensacji) trzech drobin acetylowych lub malonowych. Pierścień B wraz z trzema atomami węgla tworzącymi mostek łączący pochodzi z drobin fenylopropanu (ryc. 3). Są to najczęściej takie kwasy cynamonowe, jak kwas kawowy i kwas p-kumarowy.

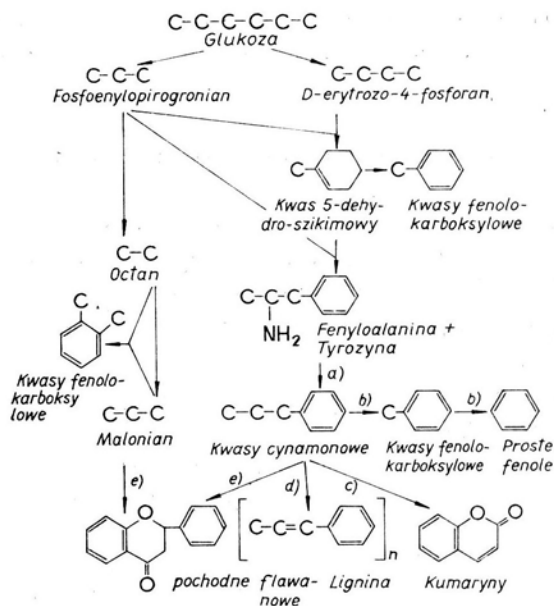


- jednostka fenylopropanu
- ▲ grupa karboksylowa octanu  
(malonianu)
- \* grupa metylowa octanu  
(malonianu)

Ryc. 3. Wzór strukturalny antocyjanidyn, pokazujący pochodzenie poszczególnych atomów węgla

Ogólnie mówiąc, nie zawierające azotu związki aromatyczne, do jakich należą związki fenolowe, a tym samym antocyjanidyny, powstają w roślinach dwoma sposobami. W pierwszym przypadku substancją wyjściową są octany z udziałem acetylokoenzymu A malonylokoenzymu A. W drugim przypadku substancją wyjściową jest glukoza, a szlak przemian prowadzi przez fosfoenolpirogronian, kwas 5-dehydrochinowy, kwas 5-dehydroszikimowy, kwas szikimowy, który w obecności dalszych drobin fosfoenolpirogronianu daje kwas p-fenowy. W tym miejscu szlak metaboliczny rozdziela się, prowadząc do utworzenia dwu aminokwasów, fenylalaniny i tyrozyny. Oba te aminokwasy stanowią punkt wyjścia do syntezy roślinnych związków fenolowych, w tym również ligniny (ryc. 4). Przemiany tych aminokwasów prowadzą najpierw przez dezaminację i odpowiednie podstawianie do utworzenia kwasów cynamonowych (a); dopiero z nich powstają inne związki,

a mianowicie proste fenole wskutek utlenienia i dekarboksylacji (b); kumaryny dzięki utlenieniu i utworzeniu laktonu (c); ligniny wskutek redukcji i polimeryzacji (d) oraz flawonoidy wskutek połączenia z trzema jednostkami octanu (e).



Ryc. 4. Schemat podstawowych etapów biosyntezy roślinnych związków fenolowych

Nie zostało rozstrzygnięte, w jakim momencie przyłączają się podstawniki do pierścienia B. Istnieją bowiem dwie możliwości: 1) podstawniki pierścienia B to niezmienione podstawniki kwasów cynamonowych, tworzących jednostki fenylopropanowe; 2) podstawniki zostają przyłączone do pierścienia B już po utworzeniu podstawowego szkieletu piętnastowęglowego.

## Genetyka barwy

Rodzaj podstawników w pierścieniu B antocyjanidyn (Rys. 2) decyduje o odcieniu barwy. Silniej utlenione są bardziej niebieskie od słabiej utlenionych. Decydujący wpływ wywierają podstawniki w pierścieniu B. Delfinidyna (3',4',5'-tróhydroksyflawylium) jest purpurowa, cyjanidyna (3',4'-dwohydroksyflawylium) jest czerwona, natomiast pelargonidyna (4'-monohydroksyflawylium) jest pomarańczowo-szkarłatna. Metylacja grup hydroksylowych powoduje różowienie antocyjanidyn. Peonidyna (3'-metoksy-4'-hydroksyflawylium) jest bardziej różowa od cyjanidyny.

Zarówno hydroksylacja jak i metylacja antocyjanidyn warunkowana jest obecnością odpowiednich genów barwy. U jednych roślin formy silniej utlenione są dominujące w stosunku do słabiej utlenionych, jak np. delfinidyna jest dominująca

w stosunku do cyjanidyny. Jednakże stwierdzono też, że niekiedy formy słabiej utlenione dominują nad silniej utlenionymi. Tak np. u maku (*Papaver rhoeas*) obecność pelargonidyny dominuje nad występowaniem cyjanidyny (tabela IV).

TABELA IV

Wybrane przykłady dziedziczenia barwików, warunkowanych jedną parą alleli (wg Alstona 1964)

Barwik dominujący	Barwik ustępujący	Przykłady
cyjanidyna pelargonidyna delfinidyna delfinidyna	pelargonidyna cyjanidyna cyjanidyna pelargonidyna	<i>Antirrhinum majus</i> , <i>Cheiranthus cheiri</i> , <i>Pharbitis nil</i> <i>Papaver rhoeas</i> <i>Callistephus chinensis</i> , <i>Lathyrus odoratus</i> , <i>Streptocarpus</i> <i>Lathyrus odoratus</i> , <i>Pelargonium zonale</i> , <i>Primula sinensis</i> <i>Verbena</i>
pelargonidyna dwuglukozydy monoglukozydy odczyn kwaśny	delfinidyna monoglukozydy dwuglukozydy odczyn zasadowy	<i>Verbena</i> <i>Callistephus chinensis</i> , <i>Streptocarpus</i> , <i>Verbena</i> <i>Verbena</i> <i>Lathyrus odoratus</i> , <i>Papaver rhoeas</i> , <i>Primula chinensis</i> , <i>Verbena</i>
barwik acylowany	barwik nieacylowany	<i>Papaver rhoeas</i>

Dziedziczenie barwy bywa też bardziej skomplikowane. U maku szereg genów wywiera wpływ na syntezę barwików. Gen F posiada efekt plejotropowy. Warunkuje on występowanie pelargonidyny, a jednocześnie wzmacnia intensywność syntezy wszystkich antocyjanidyn. Gen E powoduje występowanie cyjanidyny obok pelargonidyny, natomiast w obecności alleli ustępujących ee wytwarzana jest tylko pelargonidyna.

Ciekawą sytuację zaobserwowano u mieszańców werbeny (*Verbena*). Odmiany szkarłatne zawdzięczają swą barwę serii alleli P<sup>d</sup>, P i p, warunkujących występowanie monoglukozydów pelargonidyny i delfinidyny, oraz serii alleli M<sup>d</sup>, M i m, warunkujących występowanie analogicznych dwuglukozydów.

U wielu roślin synteza antocyjanidów warunkowana jest obecnością dwu lub większej liczby par alleli o działaniu komplementarnym. U *Pharbitis nil* trzy pary alleli komplementarnych warunkują występowanie barwików antocyjanowych. U *Lathyrus odoratus* dwie pary alleli odpowiedzialne są za syntezę antocyjanów.

Niekiedy dziedziczenie barwy kwiatów może być bardzo złożone. U pierwiosnków (*Primula sinensis*) barwa warunkowana jest wieloma genami (tabela V). Do najlepiej zbadanych roślin pod względem dziedziczenia barwy kwiatów należy wyżlin czyli lwia paszcza (*Antirrhinum majus*).

U wyżlinu gen N warunkuje syntezę flawonoidów w płatkach, natomiast w obecności nn kwiaty są białe (albinotyczne). Gen P warunkuje syntezę flawonoli i antocyjanów. Gen M powoduje hydroksylację antocyjanidyn i flawonoli w pozycji 3'; w jego obecności występują więc określone barwki, a mianowicie spośród antocyjanidyn — cyjanidyna, spośród flawonoli — kwercetyna, spośród flawonów — luteolina. W obecności mm występują związki 4'-hydroksy, a więc pelargonidyna

spośród antocyjanidyn, kampferol spośród flawonoli, apigenina spośród flawonów. Oprócz tych genów, występują u wyżłinu jeszcze inne, które wpływają na ilość wytwarzanych barwików. Tak np. gen Dil powoduje zwiększenie ilości wytwarzanych barwików.

TABELA V

Dziedziczenie barwy u *Primula sinensis* (wg Alstona 1964)

Gen barwy	Działanie genu barwy	Efekt fenotypowy, barwki oraz pH w kwiatach mutantów
K	zmienia substrat antocyjanin w formę 3',5'-utlenioną oraz metylowaną typu malwidyny;	blady koral; monoglukozyd pelargonidyny; pH = 5,3;
B	warunkuje wytwarzanie antoksyantyn, będących kopigmentami antocyjanidyn;	czerwony; primulina = monoglukozyd malwidyny; brak antoksyantyn; pH ± 6;
R	daże kwaśne pH w płatkach (prócz genotypów DG) oraz w czerwonych rurkach korony kwiatów pp i gg;	niebieski; primulina i antoksyantyny; pH ± = 6,0;
„DD”	inhibuje syntezę antocyjanin w płatkach, inhibuje działanie R;	biały; antoksyntyny; pH = 6,0;
„Dd”	częściowo inhibuje syntezę antocyjanin i zmniejsza działanie R;	odcień fuksynowy; pH = 6,0;
G	inhibuje syntezę antocyjanin pośrodku kwiatów i wraz z D inhibuje działanie R w płatkach; inhibuje syntezę antocyjanin i działanie R w rurkach;	czerwone znamiona, ciemny środek (pH = = 5,3), czerwone rurki (pH = 5,6);
V	intensyfikuje antocyjaniny;	blade lub białe (pędy zielone); pH = 5,4; dużo antoksyntyn; prążkowany; pH = 5,5;
E	warunkuje rozmieszczenie antocyjanin w płatkach;	prążkowany; pH = 5,5;
H	warunkuje jednolitość wybarwienia płatków;	„Arlekin”; obecność antoksyntyn;
J	intensyfikuje antocyjaniny;	„Sirdar” (pędy zielone); pH ± 5,8;
I	lekko rozcieńcza antocyjaniny;	ciemna barwa; primulina;
P	ograniczenie barwików plastydowych w oczku; inhibicja antocyjanin i działania R w rurce;	widoczne „oczko”, czerwona rurka, pH ± 5,7;
„DzDz”	wytwarza 3-monoglukozyd pelargonidyny, który nie jest zmieniany przez K;	jaskrawy karmin; primulina oraz 3-monoglukozyd pelargonidyny; pH ± 5,3;
„DzdZ”	wytwarza małe ilości 3-monoglukozydu pelargonidyny, maskowanej lub inhibowanej w obecności K;	karmin; głównie primulina; ślady 3-monoglukozydu pelargonidyny.

Geny barwy mogą również przejawiać efekt addytywności, kiedy działanie ich sumuje się. Ilościową zależność procesu metylacji antocyjanidyn od obecności alleli B stwierdzono np. u pierwsników (tabela VI).



Zjawisko kopigmentacji czyli niebieszczenia barwy antocyjanidyn pod wpływem substancji pokrewnych, jak np. flawony, wykryte zostało w roku 1931 przez Robinsona, a następnie przez Lawrence'a w roku 1832. Prawie niebieskie odmiany róż, jak np. „Reine de Violette”, zawierają barwik róż karmazynowych, 3,5-dwuglukozyd cyjanidyny oraz duże ilości kopigmentu — gallotaniny. Kopigmenty występują

TABELA VI

Względne ilości glikozydów petunidyny i malwidyny w różnych genotypach *Primula malcoides* (wg. Seyfferta)

Genotyp	Względne ilości	
	petunidyny	malwidyny
bbbb	1,00	ślady
bbbB	0,63	0,37
bbBB	0,34	0,66
bBBB	0,08	0,92
BBBB	ślady	1,00

w kwiatach takich roślin, jak *Primula sinensis*, *Lathyrus*, *Delphinium consolida*.

Obok kopigmentacji, ważną rolę w kształtowaniu barwy kwiatów odgrywa zjawisko tworzenia kompleksów chelatowych z jonami metali. Najlepiej poznanym przykładem jest barwa kwiatów u *Centaurea cyanus*, (chaber bławatek). W tym przypadku 3,5-dwuglukozyd cyjanidyny, warunkujący normalnie barwę czerwoną, tworzy kompleks z jonami żelaza, glinu i magnezu, dając barwę niebieską. Podobnie u łubinu (*Lupinus*) niebieszczenie powodowane jest utworzeniem kompleksu delfinidyny z żelazem i glinem.

Mniejszą rolę, niż sądzono dawniej, odgrywa pH. Stwierdzono bowiem, że pH soku komórkowego w płatkach kwiatów jest lekko kwaśne (około 5,5) niezależnie od barwy. Jednakże małe różnice w wartości pH mogą występować i mogą powodować niebieszczenie barwy. Ma to miejsce np. u *Primula* i *Papaver*. Zmiany pH soku komórkowego warunkowane są obecnością określonych genów. Tak np. u maku (*Papaver rhoeas*) niższe pH (4,9) jest dominujące w stosunku do wyższego (pH 5,8). Podobnie u pierwiosnka (*Primula sinensis*) dominująca barwa czerwona łączy się z niskim pH (pH 5,4), natomiast ustępująca barwa niebieska — z wyższym (pH 6,0).

Acylacja czyli przyłączenie cząsteczki kwasu organicznego do reszty cukrowej antocyjaniny może mieć istotny wpływ na barwę kwiatów. Np. u zawieratki ogrodowej (*Petunia hybrida* hort.) wszystkie spośród badanych odmian o kwiatach ceglastoczerwonych i czerwonych zawierały barwiki nieacylowane, natomiast wystąpienie acylacji powodowało wyraźne niebieszczenie barwy.

Bardzo ciekawe efekty barwne uzyskuje się przez połączenie antocyjanów z barwikami żółtymi, jak to ma miejsce u niektórych odmian róż czy u laka (*Cheiranthus cheiri*).

W większości przypadków dziedziczenie barwy nie jest aż tak skomplikowane. Opracowano zresztą proste i łatwe metody analizy barwików roślinnych, które znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach genetycznych oraz w pracach hodowlanych.

### Metody oznaczania barwików antocyjanowych

Oznaczanie antocyjanów roślinnych dokonywane jest z pomocą chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej. Ekstrakcję antocyjanów z tkanki roślinnej przeprowadzamy w ten sposób, że analizowane części roślin rozdrabniamy w moździerzu lub homogenizatorze w obecności bezwodnego metanolu, zakwaszonego kilkoma kroplami stężonego kwasu solnego. Zakwaszenie jest konieczne, ponieważ w środowisku alkalicznym antocyjany ulegają rozkładowi do związków bezbarwnych. Unikać trzeba też nadmiaru kwasu solnego, gdyż powoduje on hydrolizę połączenia glikozydowego i odłączenie cukru od antocyjanidyny.

Po odwirowaniu lub odsączeniu na bibule filtracyjnej, ekstrakt może być rozdzielony metodą chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej. W niektórych przypadkach, gdy analizowane tkanki zawierają duże ilości innych substancji (cukry, pektyny, śluzu, karotenoidy itp.), które mogą utrudniać rozdzielenie antocyjanów na chromatogramach, konieczne jest oczyszczenie ekstraktu antocyjanów. Oczyszczenia dokonujemy strącając antocyjaniny dodatkiem roztworu zasadowego chlorku glinu w metanolu, a następnie 1—3-krotnie przemywając osad wodą destylowaną. Przy strącaniu antocyjaniny zwracamy uwagę na doprowadzenie pH roztworu do około 8 z pomocą dodania kilku kropli amoniaku. Reekstrakcji antocyjanin z osadu dokonujemy bezwodnym metanolem, zawierającym 2% kwasu solnego.

Ekstrakty antocyjanin można przechowywać przez dłuższy okres czasu, najlepiej w niskiej temperaturze i w ciemności. Długie przechowywanie prowadzi jednak do stopniowego zmniejszania się ilości antocyjanów wskutek ich rozkładu.

Dobre wyniki daje przechowywanie antocyjanin w stanie suchym po odparowaniu metanolu. Odparowania dokonujemy pod wyciągiem w strumieniu powietrza, na szalkach Petriego. Można również przechowywać wysuszone części roślin, np. płatki. W każdym jednak przypadku należy liczyć się z postępującym rozkładem antocyjanów przy dłuższym przechowywaniu.

Rozdzielenia antocyjanów dokonujemy bądź metodą chromatografii bibułowej (Harborne 1967) bądź chromatografii cienkowarstwowej (Guzewski, Muszyński 1969). Rozwijanie chromatogramów bibułowych dokonuje się zazwyczaj wstępująco i w jednym tylko kierunku, rzadziej stosowane jest rozwijanie dwukierunkowe jednego chromatogramu. Najczęściej też badany ekstrakt rozdziela się kilkakrotnie w różnych solwentach (tabela VII).

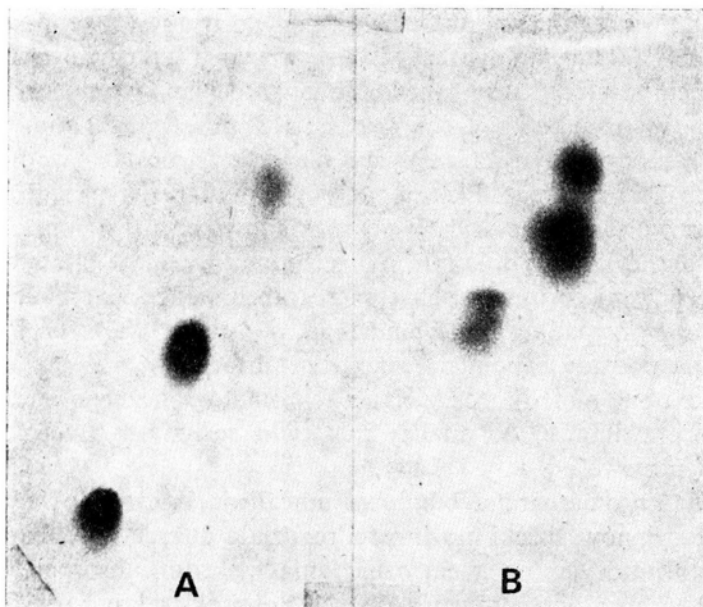
Chromatografia cienkowarstwowa polega na zastosowaniu płytek szklanych lub plastikowych, pokrytych proszkiem celulozowym. Bardzo często stosowane jest rozwijanie dwukrotne tego samego chromatogramu w dwu różnych solwentach: po rozwinięciu w solwencie pierwszym chromatogram suszy się, a następnie rozwija

TABELA VII

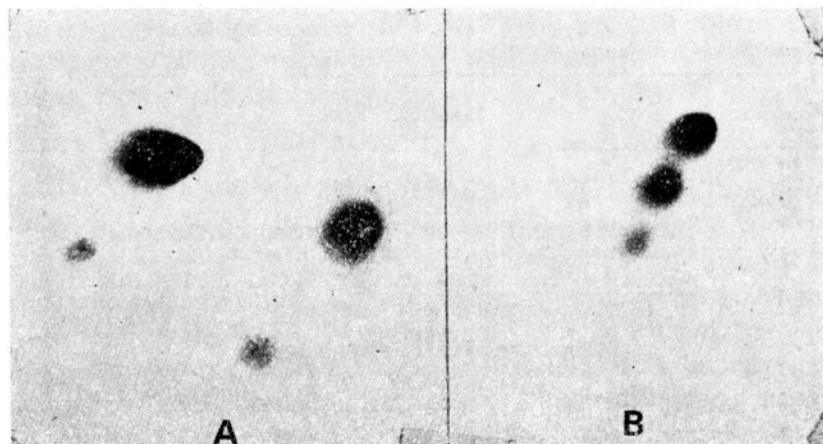
Skład najczęściej stosowanych solventów do rozdzielania chromatograficznego antocyjanów

Nazwa solventu	Skład chemiczny	Proporcje objętościowe
<b>Chromatografia bibułowa antocyjanidyn</b>		
Forestal	kwas octowy lodowaty + kwas solny stęż. + woda	30 : 3 : 10
Mrówkowy	kwas mrówkowy + kwas solny stęż. + woda	5 : 2 : 3
BAW	n-butanol + kwas octowy lodowaty + woda (faza górna)	4 : 1 : 5
Solny (HCl)	1% HCl w wodzie (stęż. HCl + woda)	3 : 97
<b>Chromatografia bibułowa antocyjanin</b>		
BAW	n-butanol + kwas octowy lodow. + woda (faza górna)	4 : 1 : 5
BuHCl	n-butanol + 2N HCl (faza górna)	1 : 1
Solny (HCl)	1% HCl w wodzie (stęż. HCl + woda)	3 : 97
HoAcHCl	kwas octowy lodow. + stęż. kwas solny + woda	15 : 3 : 82
<b>Chromatografia cienkowarstwowa antocyjanidyn</b>		
—	stęż. kwas mrówkowy + stęż. kwas solny + woda	10 : 1 : 3
—	alkohol amyłowy + kwas octowy lodow. + woda	2 : 1 : 1
<b>Chromatografia cienkowarstwowa antocyjanin</b>		
—	stęż. kwas solny + stęż. kwas mrówkowy + woda	4 : 1 : 8
—	n-butanol + kwas octowy lodow. + woda	6 : 1 : 2

w solwencie drugim, ale w kierunku prostopadłym do kierunku pierwszego. Po rozdzieleniu dwukierunkowym, antocyjaniny tworzą regularne, okrągłe plamy na chromatogramach cienkowarstwowych (Ryc. 5 i 6).



Ryc. 5. Fotografie chromatogramów cienkowarstwowych antocyjanidyn (punkt nanoszenia w lewym dolnym rogu): A) pelargonidyna (u góry), cyjanidyna (w środku) i delfinidyna (na dole); B) (od góry): pelargonidyna, malwidyna, cyjanidyna i petunidyna



Ryc. 6. Fotografie chromatogramów cienkowarstwowych antocyjanin (punkt nanoszenia w lewym dolnym rogu): A) w rzędzie lewym: monoglukozyd pelargonidyny (u góry) i monoglukozyd cyjanidyny (niżej); w rzędzie prawym: dwuglukozyd pelargonidyny (wyżej) i dwuglukozyd cyjanidyny (u dołu); widoczna jest wyraźna przewaga ilościowa glukozydów pelargonidyny (plamy duże) nad glukozydami cyjanidyny (plamy małe); B): dwuglukozydy pelargonidyny (u góry), peonidyny (w środku) i malwidyny (u dołu)

Identyfikacji poszczególnych antocyjanin dokonujemy na podstawie wartości  $R_f$ , porównując dane uzyskane z dostępnymi danymi z literatury dla tego samego sposobu rozwijania; zazwyczaj trzeba porównać wartości  $R_f$  uzyskane w kilku różnych solwentach. Gdy nie jest to wystarczające dla identyfikacji, dokonujemy eluacji antocyjanin z chromatogramu i pomiaru spektrum absorpcji.

W przypadku większej liczby antocyjanin koniecznym jest przeprowadzenie oznaczenia aglikonów (antocyjanidyn). Hydrolizy wiązania glikozydowego dokonujemy na łaźni wodnej, gotując ekstrakt metanolowy antocyjanów z dodatkiem stężonego kwasu solnego (w stosunku objętościowym 1 : 1) w przeciągu 30 min. Po ostudzeniu, ekstrahujemy antocyjanidyny z roztworu niewielką ilością bezwodnego alkoholu amylowego lub izoamylowego. Ekstrakt antocyjanidyn trzeba przechowywać w ciemności, ponieważ ulegają one szybkiemu rozkładowi pod wpływem światła.

Rozdziału antocyjanidyn dokonujemy na chromatogramach bibułowych lub cienkowarstwowych w nieco innych solwentach (tabela VII). Identyfikacji dokonujemy podobnie, jak w przypadku antocyjanin: na podstawie wartości  $R_f$ , a w razie trudności — na podstawie pomiaru spektrum absorpcji.

Porównując obie metody rozdzielania chromatograficznego antocyjanin oraz oceniając ich przydatność do analizy materiału roślinnego trzeba stwierdzić, że każda z nich ma swoje zalety i wady.

Niewątpliwie chromatografia bibułowa umożliwia bardzo dokładne oznaczenie badanych antocyjanów, dzięki możliwości rozdziału dużych ilości barwików i elucji poszczególnych antocyjanów celem oznaczenia spektrum absorpcji. Wadą tej metody jest konieczność przygotowania dużych ilości ekstraktu barwików oraz długi czas trwania analizy.

W badaniach, a zwłaszcza genetyczno-hodowlanych, dysponujemy najczęściej niewielkimi ilościami materiału roślinnego, a nawet musimy analizować zawartość barwików w pojedynczych kwiatach. Chromatografia bibułowa jest w tych przypadkach nieprzydatna. Jediną metodą, możliwą do zastosowania, jest wtedy chromatografia cienkowarstwowa. Jest to metoda umożliwiająca analizę bardzo małych ilości materiału roślinnego (Opieńska-Blauth i współpr. 1967). Pionierem wykorzystania chromatografii cienkowarstwowej do badania barwików antocyjanowych był Nybom, który dokonał adaptacji tej metody i uzyskał wartościowe wyniki w oznaczaniu antocyjanów (Nybom 1964). Metodę tą stosowano również z powodzeniem w pracowni autorów (Muszyński 1964, 1968).

Najlepszy sposób uniknięcia podstawowej wady chromatografii cienkowarstwowej, jaką jest znaczna rozbieżność w uzyskiwanych wartościach  $R_f$ , również przy rozdzielaniu antocyjanów (Muszyński 1972a), polega na kochromatografii czyli jednoczesnym rozdzielaniu badanego ekstraktu z dodatkiem odpowiednich standardów. Ponieważ zakup standardów sprawia poważne trudności, można je uzyskać we własnym zakresie w stosunkowo prosty sposób (Muszyński 1972b).

Również oprzyrządowanie do chromatografii cienkowarstwowej wykonać można w zakresie własnym (Guzewski, Muszyński 1969).

#### LITERATURA

- Alston R. E. 1964. *The genetics of phenolic compounds*. Biochemistry of phenolic compounds. Academic Press, London.
- Guzewski W., Muszyński S. 1969. *Chromatografia cienkowarstwowa w wersji uproszczonej*. Wiadomości Botaniczne 13. 207—214.
- Harborne J. B. 1967. *Comparative biochemistry of the flavonoids*. Academic Press, London.
- Muszyński S. 1964. *A survey of anthocyanidins in Petunia*. Physiol. Plantarum 17. 975—979.
- Muszyński S. 1968. *A survey of anthocyanins in Petunia*. Acta Soc. Botan. Polon. 37. 427—432.
- Muszyński S. 1972a. *Oznaczanie antocyjanów metodą chromatografii cienkowarstwowej*. Hod. Roślin, Aklimat. i Naś. 16. 165—172.
- Muszyński S. 1972b. *Antocyjany a barwa kwiatów*. Zeszyty Naukowe SGGW — Ogrodnictwa 7. 147—156.
- Nybom N. 1964. *Thin-layer chromatographic analysis on anthocyanidins*. Physiol. Plantarum 17. 157—164.
- Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuszkiewicz H. 1967. *Zarys chromatografii cienkowarstwowej*. PWRiL Warszawa.