Biogeneza antocjanu

Część I. Samoutlenianie się na antocjan uprzednio częściowo zredukowanych flawonoli.

The biogenesis of anthocyanins

Part. I. Production of anthocyanidins by air-oxidation of previously partly reduced flavonols.

ANTONI KOZŁOWSKI

Wpłynęło 14.III.1953.

Wstęp

W ogólnym ujęciu, przemiana materii w komórce żywej przedstawia bardzo skomplikowaną a mimo to w najdrobniejszych szczegółach zharmonizowaną sieć, w której redukcyjno-oksydacyjne procesy odgrywają pierwszorzędą rolę.

Jedną z nici owej sieci jest pospolita w komórkach płatków kwiatów wielu wyższych gatunków roślin końcowa przemiana pewnych związków, prawdopodobnie aromatycznych aminokwasów, na związki flawonowe, które dość często przechodzą w antocyany. Flawony są rozpuszczone w soku wodniczkowym, gdzie towarzyszą im rozmaite substancje redukujące, nazwijmy je tu krótko reduktorami¹, między którymi pospolity jest kwas askorbowy. Te, dzięki różnym stopniom swego powinowactwa do tlenu powietrza, mniej lub więcej hamują samoutlenianie się rozmaitych składników treści komórki. W takim zespole powstają w pewnych warunkach częściowo zredukowane flawonole, które są łatwo przez tlen powietrza utleniane na antocjan.

Przebieg takiej przemiany flawonolu można łatwo śledzić w probówce w sposób następujący: jeśli do żółtego, wodnego roztworu flawonolu dodamy nieco substancji redukującej i rozcieńczonego kwasu solnego a następnie szczyptę proszku cynku, ten wywoła wywiązywanie się

¹ O ile autorowi wiadomo, w języku polskim nie ma jednowyrazowego terminu odpowiadającego angielskiemu, dość zresztą niezgrabnie i nietrafnie urobionemu „anti-oxidant“ („przeciw-utleniacz“) i dlatego jest tu w sposób próbny wprowadzony termin „reduktor“.

z kwasu czynnego wodoru, który szybko zredukuje i odbarwi żółty flawonol na bezbarwną jego pochodną. Jeśli więc natychmiast owo działanie wodoru przerwiemy, flawonol będzie tylko częściowo zredukowany i w takiej formie utrzyma się tak długo, dopóki dodany reduktor nie zostanie przez tlen powietrza utleniony, po czym owa bezbarwna jego pochodna sama się utleni na czerwony barwnik.

Dla bliższego wnिकnięcia w mechanizm owej redukcyjno-oksydacyjnej przemiany, użyto tu całego zespołu reduktorów soku wodniczkowego, jaki wyciągnięto przy pomocy rozcieńczonego, gorącego roztworu kwasu szczawiowego. Ten bowiem utrudnia samoutlenianie się ekstraktu i może być łatwo z niego usunięty. W ekstrakcie takim znajduje się flawonol w postaci roztworu jego glikozydu i w takim stanie lepiej się tu nadaje do badania, niż jego oczyszczony i wskutek tego trudniej w wodzie rozpuszczalny preparat.

Część doświadczalna.

a) Ekstrahowanie płatków białej róży ogrodowej (hybrydu Frau Karl Druschki).

Świeże płatki zadano wrzącym, około 0,2% roztworem wodnym kwasu szczawiowego; temperatura materiału utrzymywała się przy 70—75°C. Po kilku minutach płyn odcedzano przez muślin.

b) Redukowanie czynnym wodorem.

Próbkę powyższego ekstraktu mieszało w probówce z jedną trzecią jej objętości rozcieńczonego (1:4) kwasu solnego a następnie zadano odrobiną proszku cynku. W miarę wywiązywania się gazu wodoru powstawała obfita piana a płyn pod nią się znajdujący wkrótce uległ odbarwieniu; na powierzchni zaś piany, w miejscu jej stykania się z powietrzem, pojawiała się barwa różowa. Po paru minutach płyn przesączono do innej próbki, w której po chwili filtrat, poczynając od swej warstwy powierzchniowej, stopniowo coraz silniej zabarwiał się na czerwono. Wpływ więc tlenu powietrza był tu bardzo wyraźny.

c) Hamowanie samoutleniania się przez reduktory.

W celu zahamowania owego utleniania, świeży, z kwasem solnym mieszały ekstrakt zadano 25 mg kwasu askorbowego (A), do drugiej takiej samej próbki dodano 1—2 ml (cm³) świeżo z cytryny wyciśniętego soku (B); dla kontroli zaś zostawiono próbkę bez dodanych reduktorów (C). Do wszystkich próbek dodano po odrobinie proszku cynku. Po 2—3 minutach płyn przesączono do czystych probówek; po kilku minutach płyn w C zaczął się zabarwiać czerwono; natomiast w A i B przez kilka godzin płyn został bezbarwny i dopiero nazajutrz był czerwony.

Podobnie jak kwas askorbowy i sok cytrynowy hamująco działały tu cukry monozy, zarówno pentozy jak i heksozy, podczas gdy cukier trzcinowy nie wykazał żadnego hamującego wpływu.

d) Wyizolowanie antocjanogenu.

W celu zidentyfikowania owego chromogenu przeprowadzono jego wydzielenie z ekstraktu w sposób następujący: powyższy (a) świeży ekstrakt zadano podczas mieszania małą ilością roztworu obojętnego octanu ołowiu, który wytrącił kwas szczawiowy i część śluzu. Filtrat po tym białym osadzie zadawno większą ilością owego roztworu octanu ołowiu tak długo jak wypadał żółty osad. Ten oddzielono przez płótno a płyn nasyciono roztworem zasadowego octanu ołowiu; otrzymano jeszcze nieco ciemno-żółtego osadu. Obie wytrącone frakcje wyprasowano z nadmiaru wody i rozcierano w moździerzu z 95% alkoholem i nieco sproszkowanym kwasem szczawiowym. Pozostały nierozpuszczone, pianę tworzące śluz oraz inne zanieczyszczenia, które oddzielono przez filtrowanie. Skoncentrowany, ciemno-żółto zabarwiony filtrat zadawano już niedużą ilością obojętnego, w gorącym alkoholu rozpuszczonego octanu ołowiu. Znowu wypadł, jakkolwiek nieliczny, żółty osad. Ten przeniesiono z filtru Buchnera do moździerza i rozcierano z małą ilością wodnego roztworu kwasu szczawiowego. Ciemno-żółty, po szczawianiu ołowiu otrzymany filtrat użyto do powyższych (b, c) i do poniższego badania (e).

e) Określenie wyizolowanego chromogenu jako kwercetyny.

1. Małą próbkę powyższego (d) ciemno-żółtego roztworu mieszano z rozcieńczonym kwasem solnym i zadano proszkiem cynku. Powstał intensywny barwnik czerwony, jaki też pojawił się tu pod działaniem rtęci sodowej.

2. Kropla 1% roztworu chlorku żelaza zabarwiała płyn w obecności małej ilości kwasu solnego ciemno-zielono; po ogrzaniu, względnie po dodaniu kwaśnego węglanu sodu kolor zielony przeszedł w fioletowo-czerwony.

3. Hydroliza glikozydu: część powyższego (d) roztworu mieszano z taką ilością rozcieńczonego kwasu solnego, by zawierała ona około 3% HCl i ogrzewano we wrzącej kąpeli wodnej przez 30 minut. Płyn zmętniał wskutek wydzielenia nierozpuszczalnego aglukonu. Ten po 24 godzinach odsączono i oczyszczono przez kilkakrotne rozpuszczanie w gorącym, rozcieńczonym alkoholu; otrzymano substancję krystalizującą w postaci żółtych, trudno w wodzie rozpuszczalnych igiełek. Te dawały powyższe (e 1, 2) reakcje barwne i zostały określone jako kryształy kwercetyny. Widocznie flawonol ekstraktu był w postaci glikozydu kwercetyny.

Podobną do powyższej barwnej przemiany flawonolu w antocjanidynę wykazywały ekstrakty i preparaty glikozydów flawonoli otrzymane z białych, względnie żółtych odmian niektórych innych gatunków, jakie też posiadają odmiany czerwone, jak np. *Pelargonium zonale*, *Campanula* sp., *Paeonia* sp., *Viola tricolor* i *Tagetes erecta*.

Ekstrakty natomiast z białej odmiany *Digitalis purpurea*, *Antirrhinum majus* oraz z pomarańczowych odmian *Dahlia variabilis* nie dawały ani czerwonego ani jakiegokolwiek innego barwnika przy zastosowaniu w powyższy sposób cynku, podczas gdy przy użyciu rtęci sodowej dawały barwnik pomarańczowy, co dowodzi, że nie zawierały flawonolu lecz jakieś flawony, względnie ich pochodne.

f) Odwracalne odbarwienie antocjanu.

Zgodnie z powyższym przebiegiem redukcyjno-oksydacyjnej przemiany flawonoli w antocjanidyny odbywa się też podobna przemiana naturalnej antocjanidyny, która, jako produkt utlenienia łatwo ulega redukcji na bezbarwny leuko-związek, który następnie pod działaniem tlenu powietrza łatwo odzyskuje barwę czerwoną. Także tu reduktory hamują powrót barwy czerwonej.

Powyżej podane metody dla badania flawonoli, także tu były stosowane. Powtarzanie więc ich jest zbędne. Także w tym przypadku przedłużenie działania czynnego wodoru prowadzi do nieodwracalnego odbarwienia.

Badano czerwone odmiany wyżej wymienionych gatunków a nadto barwnik czerwony z *Tagetes patula*, który ma nieco odmienną budowę, niż antocjanidyny dotychczas opisane. O tym będzie mowa osobno.

g) Redukowanie częściowo oczyszczanych preparatów flawonolu.

Świeże płatki białego, pełnego goździka ogrodowego (*Dianthus* sp.) zalano wrzącym, 0,3% roztworem kwasu szczawiowego. Po 10 minutach ekstrakt odlano i zadano niedużą ilością roztworu obojętnego octanu ołowiu; wypadł obfity, żółtawy osad (Pb. I). Ten odsączono a do filtratu dodano roztworu zasadowego octanu ołowiu; wypadł żółty osad (Pb. II). Oba osady przepłukano wodą i osobno rozłożono wodnym roztworem kwasu szczawiowego. Filtraty po szczawianiu ołowiu mieszały z osobna 1/3 objętości rozcieńczonego (1:4) kwasu solnego i przeniesiono w ilości około 5 ml (cm³) do próbek; w celu utrudnienia dopływu powietrza, płyn przykryto około 1 cm grubą warstwą oleju parafinowego. Następnie dodano nieco, uprzednio wodą zwilżonego cynku sproszkowanego. Żółtawy płyn pod olejem uległ natychmiast odbarwieniu; po kilku minutach przeniesiono go pipetą spod warstwy oleju do otwartych próbek. Podczas gdy w zredukowanej próbce całkowitego ekstraktu nastąpiło utlenienie z wytworzeniem różowej barwy już po upływie 7 minut, w powyższych

próbkach zaczął się pojawiać barwnik różowy dopiero po dwóch godzinach, przy czym próbka płynu po Pb. II była o wiele silniej, niż próbka po Pb. I, różowo zabarwiona.

h) Redukowanie ekstraktów w nieobecności powietrza.

W powyższym celu mogą służyć rurki w postaci litery Y (opisane w Actach Soc. Bot. Pol. z 1930 r.) a w braku tych najlepiej nadają się próżniowe rurki Thunberg, których zatyczki są wewnątrz puste i na bok zgięte. W te ostatnie wkładano około 20 mg sproszkowanego cynku; w rurki zaś przenoszono pipetą około 3 ml uprzednio z rozcieńczonym kwasem solnym zmieszanego ekstraktu z białych kwiatów róży (hybrydu Texas centennial wzgl. Port's Down Ivory), a nadto nieco reduktorów a mianowicie: 1) 1 ml świeżo wyciśniętego soku cytryny; 2) 1 ml ekstraktu z liści *Portulaca sativa*, jaki sporządzono świeżo przez zalanie liści 0,3% wrzącym roztworem kwasu szczawiowego; 3) Do trzeciej rurki dodano około 12 mg kwasu askobrowego (pół tabletki preparatu witaminy C); 4) 15 mg glukozy wzgl. 5) 15 mg hydrochinonu dodano do innych rurek. Po uszczelnieniu zatyczek gęstą wazeliną rurki połączono z manometrem a ten z rurką absorbcyjną, zawierającą węglan wapnia i dołączoną do pompy olejowej, przy pomocy której osiągnano około 0,9 ml słupa rtęci. Próżnię taką utrzymywano przez 10 minut; następnie zatyczkę przekreślono i odłączono od manometru; przez lekkie przechylenie rurki przesypało cynk do płynu. Nastąpiło silne wywiązywanie wodoru; płyn, pierwotnie żółtawo zabarwiony, momentalnie uległ odbarwieniu. Po pięciu minutach przeniesiono go przez filtr do próbki i notowano czas wystąpienia w nim barwy czerwonej. Podczas gdy w próbce kontrolnej barwa różowa pojawiła się natychmiast, w próbkach zawierających jeden z dodanych do nich reduktorów barwa różowa zaczęła się pojawiać dopiero po upływie 5 lub więcej godzin. Stosunkowo najsilniej było utrudnione utlenianie zredukowanego flawonolu przez sok cytrynowy i ekstrakt z liści *Portulacca*.

D y s k u s j a

Powyższe doświadczenia przedstawiają dalszy ciąg w jesieni 1949 r. rozpoczętych badań (6), w których stwierdzono powstawanie barwnika o cechach antocjanu z jakichś substancji zawartych w wodnych ekstraktach z liści i z dojrzewających, jeszcze żółtych śliwek „Victory“, zanim pojawił się w nich barwnik czerwony. Zauważono wtedy, że ów barwnik nie utrwał się w ekstrakcie przed utlenieniem w nim reduktorów. W celu więc bliższego wniknięcia w istotę owego redukcyjno-oksydacyjnego procesu przystąpiono do powyżej opisanych doświadczeń, przeprowadzanych (znów dorywczo tj. w wolnych od zarobkowych zajęć chwilach) na ekstraktach z korony kwiatów, które czasem obfitują w flawonole względnie w antocjan. Dało się przy tym ustalić, że antocjan

powstaje z flawonoli po uprzednim ich częściowym zredukowaniu a następnie utlenieniu ich pochodnej.

Przemianę flawonolu w barwnik czerwony obserwował po raz pierwszy już Stein (1863) i Hlasivetz (1864), jak to cytuje Czapek (2) oraz Willstätter i Mallison (11). W owym doświadczeniu czynny wodór był wywiązywany z kwasu solnego przy pomocy rtęci sodowej i działał na alkoholowy roztwór kwercetyny. Później stosowano cynk względnie magnez dla barwnej przemiany flawonoli, podczas gdy rtęć sodowa służy do wykrycia obecności flawonów. Okazało się przy tym, że kwercetyna występuje w dwóch izomerach i reaguje zarówno jako flawonol jak też jako flawon (Kostanecki).

Barwnik czerwony, jaki w powyższych reakcjach powstaje, został przez Everesta (3) zidentyfikowany jako antocjanidyna, jak to Everest przedstawił w następujących wzorach strukturalnych:

Tak więc zdaniem Everesta antocjanidyna ma zasadniczo taki sam wzór strukturalny, co podane przez Kostaneckiego (5) związki flawonowe. Pogląd Everesta, że antocjanidyny powstają przez redukcję flawonoli, podzielał też współpracujący z nim wówczas Willstätter, który potem zbadał cały szereg antocjanów i podał dla nich budowę chemiczną (11). Dzięki jego licznym pracom, hipoteza redukcji została przyjęta, jako pewna, w podręcznikach fizjologii roślin.

Trudno jednak było pogodzić ów pogląd z obserwacjami, jakie poczynili francuscy botanicy, według których tlen powietrza jest niezbędny dla pojawienia się w roślinach antocjanu (Malvezin, Mollard, Combes, ... cyt. Czapek). Na tej to podstawie angielscy botanicy postawili hipotezę, że antocjan powstaje w roślinach na drodze utleniania przez enzymy utleniające, oksydazy i peroksydazy, jak to przedstawiła Wheldale Onslow (10) oraz Keeble i Armstrong (4), do których ostatnio przyłączył się Robinson (8); ten odrzucił hipotezę Everesta i Willstättera jako zupełnie nieuzasadnioną w następującym stanowczym orzeczeniu: „I consider that identification of the anthocyan chromogen with the flavonol was an unfortunate obsession of the plant physiologists, and that in different forms the oxidase hypothesis of Keeble

and Armstrong will be received". (Uważam utożsamianie chromogenu antocjanu z flawonolem jako niefortunne opanowanie fizjologów roślin (przez ową ideę) i (sądzę), że w odmiennych formach zostanie do życia przywrócona hipoteza oksydaz, jaką podali Keeble i Armstrong). (por. też *Nature* 1936). Przyczynę niepewności owych dwóch, wzajemnie się wykluczających hipotez wykazują powyższe doświadczenia, które wprawdzie potwierdzają pogląd, że antocjanidyny mają swe początki we flawonolach lecz zarazem wyraźnie zaznaczają fakt, że nie ma tu ani czystej redukcji, jak to sądził Everest i Willstätter, ani też czystego utleniania przez enzymy, jak to przypuszczają botanicy angielscy; w owym bowiem zjawisku zachodzi zarówno redukcja jak i utlenianie. Częściowe uwodornienie drobin flawonolu na jego bezbarwną i na działanie tlenu bardzo wrażliwą pochodną jest tu warunkiem tak samo niezbędnym, jak następne utlenienie owej pochodnej na barwnik czerwony.

Na razie trudno jest określić budowę owej labilnej pochodnej, można tylko przyjąć tu z dużym prawdopodobieństwem, że jest to dwuhydroflawonol. Z przyjęciem więc owego zastrzeżenia można tu przedstawić genezę antocjanidyny następującymi wzorami strukturalnymi:

W powyższych, próbnych wzorach strukturalnych jest zbyt częste uciekanie się do czysto spekulatywnego przyjmowania hipotetycznego

istnienia czterowartościowego atomu tlenu i rzekomego również niczym nie uzasadnionego przegrupowania wiązań podwójnych w pierścieniu gama-pyronowym, jako warunku powstania antocjanidyny, jak to usiłowali przedstawić Everest i Willstätter. Natomiast zachodzi tu wielkie prawdopodobieństwo, że w momencie samoutleniania się dwuhydroflawonolu dwie jego drobiny łączą się w jedną dwukrotnie większą drobinę antocjanidyny, analogicznie jak to stwierdzono w chemii wielu innych barwników, a między innymi w przypadku powstawania z dwóch drobin bezbarwnego indoksyłu jednej drobinie błękitu idygowego (indigotyny):

Przyjęcie powyższego lub też podobnego wzoru strukturalnego antocjanidyny łatwo wyjaśnia też fakt jej przemiany, jaka zachodzi na odwracalnej drodze redukcji i utleniania.

Wyjaśnić tu też należy, że w powyższej reakcji odbarwiania antocjanidyny na jej „leuko-związek” powstaje właściwa leuko-antocjanidyna, która łatwo z powrotem się utlenia na antocjanidynę. Termin więc ów nie ma nic wspólnego z terminem w niewłaściwym znaczeniu przez Rosenheim (9) podanym a następnie przez Robinsonów przyjętym, którym oznaczano bliżej jeszcze nieokreślone (prawdopodobnie pochodne antocjanidyny), w liściach pospolite związki bezbarwne, które dają barwne pochodne antocjanidyny przez samą już ich hydrolizę, a przy której ani redukcja ani też utlenienie nie jest niezbędne.

Należy tu też zaznaczyć, że rolę kwasu askorbowego w procesach przemiany pokrewnych (z flawonami) garbników obserwowali Bokchava, Popow i Shubert (1) w swych badaniach nad rolą garbników w oksydacyjno-redukcyjnych procesach roślin, którzy też stwierdzili, że „zanim kwas askorbowy nie zostanie utleniony, nie powstaje żaden barwnik ani też nie zmniejsza się miano garbników” (until ascorbic acid is oxidized, no pigment formation or loss of the tannins takes place”) cytując z Chem. Abstr. 45. 8088 (1951).

Lecat (7) stwierdził, że w kwiatach ilość kwasu askorbowego zmniejsza się w miarę ich rozwoju, podczas gdy w soczystych owocach (pomidorach) przybywa go w miarę ich dojrzewania.

Streszczenie i wnioski.

Powyżej opisane doświadczenia nad redukcją flawonolu przez czynniki wodór na bezbarwną pochodną i nad następnym utlenianiem tej ostatniej na antocjanidynę, rzucają nowe światło na problem powstawania

antocjanu w roślinach; wysuwają bowiem na plan pierwszy niezbędność badania redukcyjno-oksydacyjnego systemu, w którym pierwszorzędą rolę odgrywają enzymy redukujące (dehydrogenazy, hydrogenazy, ich ko-enzymy, donatory i akceptory wodoru).

Stwierdzenie zaś faktu, że owa bezbarwna pochodna flawonolu utleniana jest działaniem molekularnego tlenu powietrza, pozwala wnioskować, że w roślinach odbywa się owo utlenianie bez współdziałania jakichkolwiek enzymów (oksydaz i peroksydaz).

SUMMARY

When aqueous, flavonol containing extracts of various yellow or white flowers are mixed with some anti-oxidants (ascorbic acid, monose-sugars) and exposed for a short time to the influence of active hydrogen, flavonols become decolorized; after that, however, when the added reductors are by air oxidized those colorless flavonol-derivatives too become oxidized by air oxygen with a production of anthocyanidins.

Neither the hypothesis of reduction (Everest, Willstätter) nor that of oxidation (Wheldale Onslow, Keeble and Armstrong, Robinson) have been found by the above method to be justified.

There is full evidence that flavonols in a reduction-oxidation system are transformed into anthocyanidins. A reduction of a flavonol into a partly hydrogenated, colorless, very labile and to the action of molecular oxygen very sensitive derivative (possibly to a dihydroflavonol) represents an indispensable condition (*conditio sine qua non*) of its consecutive oxidation by air-oxygen into an anthocyanidin.

It is very probable that in the moment of such oxidation two molecules of that „dihydroflavonol“ are bound together in a similar form as in the case of an oxidation of the colorless indoxyl into indigoblue (indigotin). In the proposed structural formula of the anthocyanidin a hypothetical presence of a quadrivalent atom of oxygen and of a shifting of double bonds in the gama-pyrone ring, as it was suggested by Everest, is here eliminated.

The fact of the reduction of a flavonol by active hydrogen demands, consequently, as in many other biochemical processes, also here an interaction of reducing enzymes. On the other hand, an easy oxidation of that dihydroflavonol into anthocyanidin by molecular oxygen indicates that in nature an action of oxidizing enzymes (oxidases, peroxidases) in the formation of anthocyanidins is superfluous.

One should take also into consideration that a prolonged action of active hydrogen brings a flavonol as well as an anthocyanidin into an irreversibly colorless compound.

To the presence of quercitin in the flowers of white and yellow varieties corresponds that of cyanin in red varietals of the garden rose as well as of many other species.

LITERATURA

1. Bokuhava, Popow i Shbert, Doklady Akad. Nauk S. S. S. R. 76. 439 (1951). Chem. Abstr. 45.8088 (1951).
2. Czapek Fr., Biochemie der Pflanzen. Praga 1913, 2-gie wyd. 1921 3 tomy.
3. Everest, Proc. Roy. Soc. (London). B. 87.444 (1914, B. 90.257 (1918).
4. Keeble and Armstrong, Proc. Roy. Soc. (London). B. 8.214,466 (1912), B. 87.113 (1913).
5. Kostanecki i współpracownicy. Seria prac ogłoszonych w Ber. d. d. chem. Ges. w latach 1895—1904, w tomach 28, 31, 32, 37 i in.
6. Kozłowski A., Acta Soc. Bot. Pol. XX. 251—259 (1949—1950).
7. Lecat. Ann. Sci. Nat. Bot. 10. 71—90 (1949). Plant and Soil. 3. 267—308 (1951). Chem. Abstr. 46. 9670 (1952).
8. Robinson. Nature. 135.732 (1935). 137.172 (1936).
9. Rosenheim. Biochem. J. 14. 178 (1920)..
10. Wheldale Onslow (Muriel). The anthocyan pigments of plants. 2-gie wydanie University Press, Cambridge.
11. Willstätter und Everest, Liebig's Ann. 401 (1913).
 „ und Mallison, „ „ 408.15 (1915).
 „ i współpracownicy, seria prac ogłoszonych w Liebig's Ann. w latach 1913—1917, w tomach 401—412.