

## KUMULACE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ V LARVÁLNÍCH STÁDIÍCH LIŠAJE SMRTIHLAVA (*Acherontia atropos*) V ZÁVISLOSTI NA SLOŽENÍ POTRAVY

RENATA KUBÍNOVÁ, EMIL ŠVAJDLENKA  
a TEREZA KULOVANÁ

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno

kubinovar@vfu.cz

Došlo 26.9.13, přijato 15.11.13.

Klíčová slova: *Acherontia atropos*, atropin, HPLC, metabolismus, secoiridoidy

### Úvod

Fytofágní zástupci hmyzu se museli v průběhu vývoje adaptovat na přítomnost sekundárních metabolitů, které rostliny často využívají jako obranu před škůdci<sup>1</sup>. Díky koevolučnímu působení a nutnosti neustálého zdokonalování obrany pak vznikají u hmyzu různé mechanismy, které jim pomáhají překonávat toxické účinky látek obsažených v potravě. Poznávání těchto vztahů mezi hmyzem a rostlinou je jednou z hlavních oblastí chemické ekologie<sup>2</sup>.

Jedním z obranných mechanismů proti potenciálně škodlivým účinkům sekundárních metabolitů je jejich kumulace v těle hmyzu. Byla popsána kumulace morfinu u *Calliphora stygia*, hmyzu, který se živí rozkládajícím se masem. Snahou tohoto mechanismu je obejití negativního účinku alkaloidu pomocí bezpečné izolace látky a její případné postupné exkrece<sup>3</sup>. Dalším příkladem adaptace je využití kumulované látky jako obrany před predátory, jak je tomu u motýlů čeledi Papilionidae, jejíž zástupci jsou díky kumulaci aristolochových kyselin pro predátory nestravitelní<sup>4</sup>. U motýlů byla prokázána kumulace celé řady sekundárních metabolitů, obzvláště pokud se jedná o motýly úzce specializované na jednu konkrétní skupinu rostlin. Fenolické glykosidy salicin a salikortin kumuluje *Limentis archippus* (Nymphalidae), chinolizidinové alkaloidy larvy *Aresiphita reversalis* (Pyralidae), kardenolidy larvy *Danaus plexipus* (Nymphalidae). Toxický glykosid cykasin byl detegován u motýla *Eumaeus atala florida* (Lycaenidae)<sup>5</sup>.

Další možností vypořádání se s toxicitou sekundárních metabolitů v potravě je jejich detoxikace. Vystavení organismu hmyzu působení xenobiotik v potravě vede ke zvýšení aktivity detoxikačních enzymů, zejména cytochromu P450 (cit.<sup>6</sup>).

V naší práci byly použity larvy motýla lišaje smrtihlava (*Acherontia atropos*). Jde o tažného motýla, jehož domovskými oblastmi jsou tropické části Afriky a Asie, vyskytuje se také ve Středozeří. Primárním zdrojem potravy jeho housenek jsou především rostliny čeledi Solanaceae. Tropanové alkaloidy, obsažené v této čeledi, patří mezi silně účinné látky. Proto existuje předpoklad adaptace *Acherontia atropos* na tyto sekundární metabolity. Jako polyfágní živočich se ovšem může stravovat velkým spektrem jiných rostlin<sup>7</sup>.

Z živných rostlin byla vybrána *Atropa bella-donna* L., ruřík zlomocný, z čeledi Solanaceae. Rostlina obsahuje zejména tropanové alkaloidy, nejvíce (–)-hyoscyamin, který skladováním racemizuje na atropin. Dále byla použita *Ligustrum vulgare* L., ptačí zob obecný, pro výskyt strukturálně jiných skupin obsahových látek, glykosidů flavonoidů a secoiridooidů.

Cílem práce bylo srovnat kumulaci sekundárních metabolitů v závislosti na složení potravy *Acherontia atropos* a přispět tak k pochopení souvislostí ve vztazích hmyz – rostlina.

### Experimentální část

#### Chov

Chov probíhal s ohledem na specifika pro *Acherontia atropos*<sup>7</sup>. Vajíčka byla ponechána při pokojové teplotě v Petriho miskách do vylíhnutí. Housenky byly rozděleny do dvou skupin s různými živnými rostlinami. Jedna skupina byla krmena listy *Ligustrum vulgare*, druhá listy *Atropa bella-donna*. Postupně byly housenky přesouvány z Petriho misek do větších plastových nádob a nakonec ponechány ve vzdušných housenicích tvořených monofilovými vaky na živné rostlině. Nejlépe prospívaly housenky živné *Atropa bella-donna*. Rozdíl mezi velikostí housenek ve skupinách *Ligustrum vulgare* a *Atropa bella-donna* byl patrný, nicméně se v posledním stadiu vyrovnal. Housenky byly usmrceny pomocí mrazu po několikadenním hladovění ve stadiu pre-pupy, kdy se zbavily nadbytečných tekutin a začaly hledat místo ke kuklení a následně lyofilizovány<sup>8</sup>. Váha housenek po lyofilizaci se pohybovala okolo 2 g.

#### Použité chemikálie

Methanol, kyselina sírová, 26% roztok amoniaku, chloroform, bezvodý síran sodný, acetonitril, kyselina mravenčí, atropin (Sigma-Aldrich, ČR).

#### Přístroje a pomůcky

Pro chromatografickou analýzu byl použit HPLC systém Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies, Německo) s UV detekcí (DAD) a hmotnostní detekcí s elektrosprejovou ionizací (MS-ESI), kolona SUPELCOSIL

ABZ<sup>+</sup>PLUS, 15 cm × 4,6 mm, částice o velikosti 3 μm (Supelco, USA).

#### Příprava vzorků

Extrakt z *Ligustrum vulgare* byl připraven macerací 1 g sušených listů v 20 ml methanolu 24 hodin při pokojové teplotě<sup>8</sup>. Výsledný extrakt byl dále analyzován metodou HPLC/ DAD/MS. Extrakt z *Atropa bella-donna* byl připraven extrakcí 0,5 g sušené drogy 10 ml kyseliny sírové o koncentraci 0,05 mol l<sup>-1</sup> při teplotě 40 °C za stálého míchání po dobu 30 min. Roztok byl alkalizován amoniakem do pH 9. Po filtraci byl extrakt vytřepán do chloroformu a vysušen bezvodým síranem sodným. Extrakt byl odpařen do sucha a odparek rozpuštěn v 1 ml methanolu<sup>9</sup>. Analýza probíhala metodou HPLC/DAD. Housenky byly extrahovány stejným způsobem jako živné rostliny<sup>8</sup>.

#### Mobilní fáze a podmínky měření

Při HPLC analýze byla použita gradientová eluce, mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,2% kyseliny mravenčí v poměru 10:90 v 0. minutě a 100:0 ve 36. minutě, průtok 1 ml min<sup>-1</sup>, teplota na koloně 40 °C, nástřik 10 μl. UV detekce při 280 nm a 215 nm. HPLC/MS-ESI spektra byla získána v negativním modu.

#### Určení limitů detekce

Kalibrační roztoky atropinu byly získány ředěním zásobního roztoku a proměřeny v koncentracích 100–500 μg ml<sup>-1</sup>. Závislosti odezvy detektoru na koncentraci byly zpracovány lineární regresí.

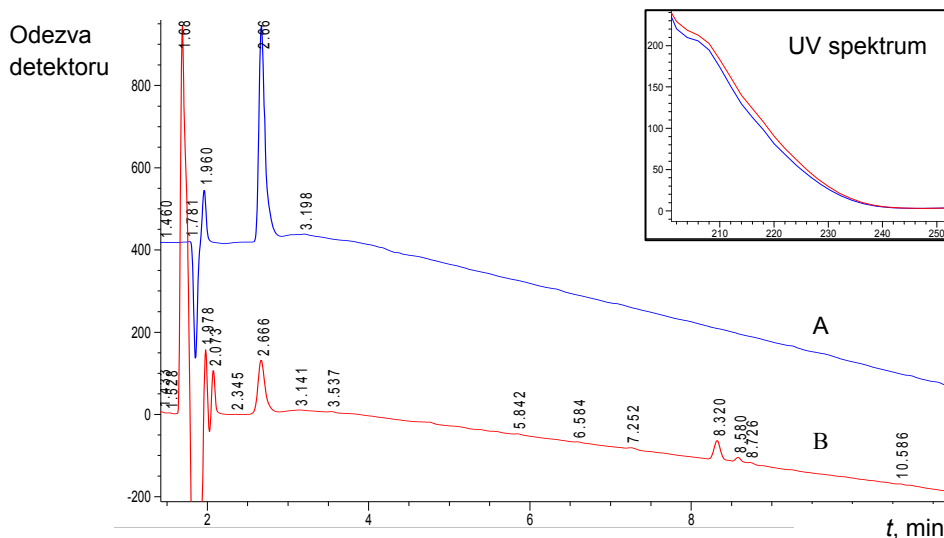
## Výsledky a diskuse

#### Analýza rostlinných extraktů

HPLC analýzou extraktu *Atropa bella-donna* byl srovnáním se standardem prokázán atropin s retenčním časem 2,7 min (obr. 1). Extrakt z *Ligustrum vulgare* vykazoval velké množství látek s absorpčním maximem při 280 nm. Podle UV spektra šlo zejména o secoiridoidy, fenypropanoidy a flavonoidy, srovnáním s knihovnou standardů se nám podařilo identifikovat akteosid a rutin. Další látky byly identifikovány metodou HPLC/MS-ESI (tab. I) a jde o sloučeniny již dříve v rostlině popsane<sup>10,11</sup>.

#### Analýza housenek

HPLC analýzou housenek s živnou rostlinou *Atropa bella-donna* a srovnáním se standardem byl v housenkách prokázán atropin, dochází tedy k jeho kumulaci v tkáních housenek (obr. 2). Jeho množství v jedincích byla stanovena na základě srovnání plochy píku se standardem na 3,5 ± 0,4 μg (n=3). Housenky i dospělci motýla *Ideopsis similis* kumulují alkaloidy z živné rostliny *Tylophora tanakae*<sup>2</sup>, jejich množství v jedinci se pohybovala v závislosti na druhu alkaloidu od 3,5 do 14 μg. Kromě kumulace může docházet v těle housenek i k metabolizaci sekundárních metabolitů. Tato byla pozorována u motýlů rodu *Longitarsus* v případě pyrrolizidových alkaloidů<sup>12</sup>. Alkaloidy jsou v těle hmyzu hydrolyzovány a dále oxidovány cytochromem P450 a také pomocí specifických N-oxidas, které jsou přítomny v hemolymfě<sup>12</sup>. Tropanové alkaloidy z živných rostlin čeledi Solanaceae jsou využívány larvami motýla *Placidula euryanassa* a mají velký význam v jeho ochraně před predátory<sup>9</sup>. V předchozích studiích s *Ache-ronia atropos*, krmených na *Solanum tuberosum*, byla

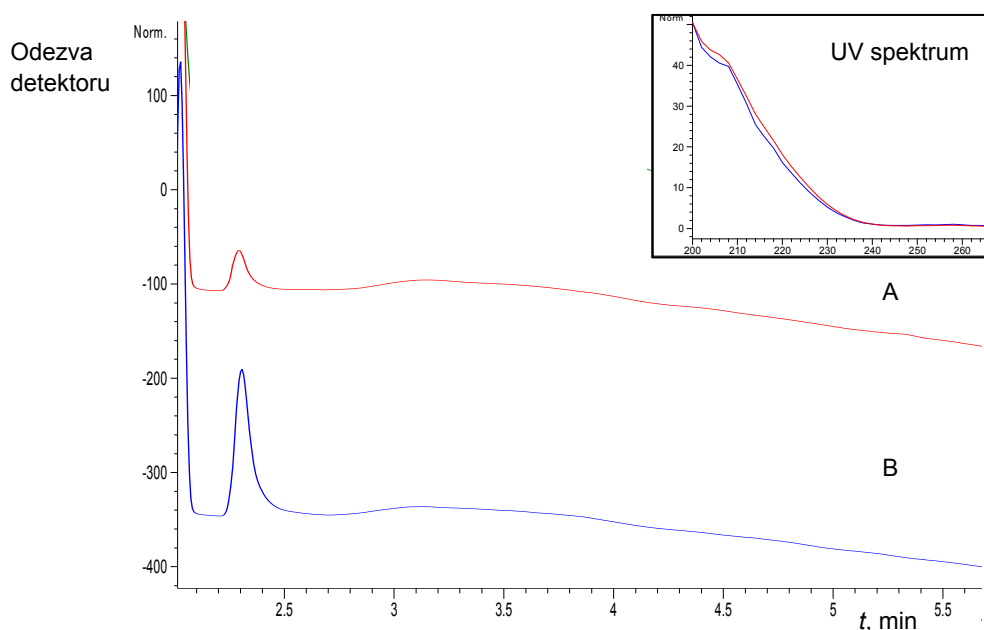


Obr. 1. HPLC analýza extraktu *Atropa bella-donna* (B), srovnání se standardem atropinem (A)

Tabulka I

HPLC/MS-ESI analýza obsahových látek methanolového extraktu *Ligustrum vulgare* s molekulárním ionem  $[M-H]^-$  a následnými fragmenty v MS/MS spektru

| Retenční čas [min] | $[M-H]^-$ | MS/MS         | Sloučenina                |
|--------------------|-----------|---------------|---------------------------|
| 1,7                | 315       | 153, 135      | hydroxytyrosol-glukosid   |
| 7,9                | 623       | 461           | akteosid                  |
| 9,1                | 785       | 623           | echinakosid               |
| 10,1               | 609       | 301           | rutin                     |
| 10,5               | 555       | 393, 273      | ligustalosid A            |
| 11,1               | 577       | 267           | apigenin-rutinosid        |
| 12,4               | 539       | 377, 307, 275 | oleuropein/ligustalosid B |
| 13,6               | 523       | 361, 291, 259 | ligstrosid                |



Obr. 2. HPLC analýza extraktu housenky *Acherontia atropos* na živné rostlině *Atropa bella-donna* (A), srovnání se standardem atropinem (B)

prokázána kumulace polyhydroxylovaných tropanových alkaloidů, které byly také detegovány v živné rostlině<sup>13</sup>.

Z HPLC analýzy housenek s živnou rostlinou *Ligustrum vulgare* je patrné, že v extraktech se vyskytovaly zejména polární látky, nicméně se žádnou pomocí HPLC/DAD/MS-ESI nepodařilo identifikovat, ani nebyla zjištěna shoda UV spekter s UV spektry obsahových látek extraktu *Ligustrum vulgare*. Z výsledků vyplývá, že jsme neprokázali kumulaci secoiridoidů popř. fenylypropanoidů *Ligustrum vulgare* v tělech housenek *Acherontia atropos*. Kumulace iridoidů ve tkáních celé řady druhů motýlů je běžná, nicméně se jedná převážně o monofágní druhy, případně druhy úzce specializované na rostliny s vysokým

obsahem iridoidních látek<sup>14,15</sup>. Nebyla prokázána ani kumulace flavonoidů *Ligustrum vulgare*. V případě kumulace flavonoidů jde o proces méně častý a projevuje se zejména pigmentací křídel motýlů v závislosti na typu flavonoidu, který byl kumulován<sup>16</sup>.

### Závěr

V rámci studie bylo prokázáno, že nedochází ke kumulaci obsahových látek *Ligustrum vulgare* v tělech housenek *Acherontia atropos* krmených touto živnou rostlinou. Negativní výsledek může být ovlivněn faktem, že

*Ligustrum vulgare* nepatří do čeledi, která je primární potravou tohoto druhu. U housenek krmených živnou rostlinou *Atropa bella-donna* byla prokázána kumulace atropinu ve tkáních. Výsledky naznačují, že u *Acherontia atropos*, kterého zařazujeme mezi polyfágy s širokým spektrem živných rostlin, existují kromě kumulace i jiné mechanismy vypořádání se s nepříznivými účinky sekundárních metabolitů, jako je metabolismus (hydrolyza, oxidace) a exkrece.

## LITERATURA

1. Arimura G., Kost C., Boland W.: *Biochim. Biophys. Acta* 1734, 91 (2005).
2. Abe F., Yamauchi T., Honda K., Omura H., Hayashi N.: *Phytochemistry* 26, 697 (2001).
3. Parry S., Linton S. M., Francis P. S., O'Donnell M. J., Toop T.: *J. Insect Physiol.* 57, 62 (2011).
4. Priestap H. A., Velandia A. E., Johnson J. V., Barbieri M. A.: *Biochem. Syst. Ecol.* 40, 126 (2012).
5. Opitz S. E. W., Müller C.: *Chemoecology* 19, 117 (2009).
6. David J. P., Boyer S., Mesneau A., Ball A., Ranson H., Dauphin-Villemant C.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 410 (2006).
7. Kovařík F.: *Hmyz – chov, morfologie*. Madagaskar, Jihlava 2000.
8. Lampert E. C., Bowers M. D.: *J. Chem. Ecol.* 37, 496 (2011).
9. Freitas A. V. L., Trigo J. R., Brown K. S., Witte L., Hartmann T., Barata L. E. S.: *Chemoecology* 7, 61 (1996).
10. Romani A., Pinelli P., Mulinacci N., Vincieri F. F., Gravano E., Tattini M.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4091 (2000).
11. Czerwińska M. E., Granica S., Kiss A. K.: *Planta Med.* 79, 924 (2013).
12. Haberer W., Dobler S.: *Chemoecology* 9, 169 (1999).
13. Rothschild M., Porter E. A., Watson A. A., Waigh R. D., Waterman P. G.: *Phytochemistry* 34, 1281 (1993).
14. Trigo J. R.: *J. Braz. Chem. Soc.* 11, 551 (2000).
15. Willinger G., Dobler S.: *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 335 (2001).
16. Knüttel H., Fiedler K.: *J. Exp. Biol.* 204, 2447 (2001).

**R. Kubínová, E. Švajdlenka, and T. Kulovaná**  
*(Department of Natural Drugs, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno): Accumulation of Secondary Metabolites in Larvae of Death's-head (hawk) moth (Acherontia atropos) Food in Dependence of Food Composition*

Selective uptake and storage of various secondary metabolites by phytophagous insects are important aspects of insect – plant interactions. This phenomenon – sequestration – is one of many adaptation processes of phytophagous insects in defence against toxic effects of plant compounds. The larvae of *Acherontia atropos* were fed on various diets (*Atropa belladonna*, *Ligustrum vulgare*) and sequestration of secondary metabolites from foodspace-plants was studied. HPLC/DAD/MS-ESI analysis demonstrated that *Acherontia atropos* larvae sequester moderate amounts of atropine from *Atropa belladonna*. Secondary metabolites of *Ligustrum vulgare* were not sequestered. Some data indicate that these metabolites are hydrolysed and excreted. *Acherontia atropos* larvae reduce toxic effects of plant compounds also by their metabolism.