

Iridoidiglykosidit ja niiden analytiikka

Kemiallisia selityksiä luonnonvalinnalle kukkakedoilla

Johanna Suomi

Iridoideista, kasvien aineenvaihdunnan tuotteina syntyivistä ns. karvasaineista, on tullut kasvien puolustuskeino kasvinsyöjiä vastaan. Niihin erikoistumattomat kasvinsyöjät, esimerkiksi kaaliperhosen toukat, kasvavat iridoidipitoisissa kasveissa hyvin hitaasti ja kuolevat kitukasvuisuutensa vuoksi selvästi helpommin kuin muuta ravintoa saaneen verrokkiryhmän toukat.

Eräät kasvinsyöjät, kuten esimerkiksi täpläperhoslajit, ovat erikoistuneet sietämään iridoidiglykosideja ja peräti kieltäytyvät syömästä iridoiditonta keinoravintoa. Ilmeisesti nämä karvasaineet kiihottavat niiden ruokahalua, sillä tilkka iridoidiliuosta saa jopa suodatinpaperin maistumaan niille.

Iridoideihin erikoistuneet toukat käyttävät näitä yhdisteitä kemiallisena aseenaan yleisaalistajia, kuten muurahaisia ja hämähäkkejä, vastaan. Yleisaalistajille iridoidit ovat yhtä vastenmielisiä, kuin mitä ne ovat erikoistumattomille kasvinsyöjille, ja ne ovat niille myös lievästi myrkyllisiä. Niinpä saalistajat oppivat välttämään näitä karvaalta maistuvia toukkia, jotka tavallisesti esiintyvät suurina parvina. Tutkimuksissa on todettu, että erään amerikkalaisen täpläperhosen toukista säilyivät parhaiten hengissä ne, joiden iridoidipitoisuus oli korkein. Pitoisuus voi nousta jopa viidennekseen toukan kuivapainosta.

Toukat eivät itse kykene valmistamaan iridoidiglykosideja, vaan niiden on saatava puolustautumisaineensa ravinnostaan. Koska toukat ovat yleensä liian pieniä selviytyäkseen hengissä kahden kasvin välisestä matkasta, niiden on koetettava tulla toimeen sillä kasvilla, jolle ne munittiin. Tältä pohjalta on otaksuttavissa, että perhosemo pyrkii jollakin tavoin valitsemaan jälkeläisilleen mahdollisimman soveliaan kasvin.

Juuri tällaista käytöstä onkin havaittu. Perhonen lentelee hitaasti ympäriinsä valikoiden

munintakasvia ensin silmämääräisesti, ja sopivannäköisen löydettyään se laskeutuu kasvin lehdelle ja rummuttaa sitä jaloillaan. Tällöin raajoissa olevat makuelimet pystyvät aistimaan, onko lehdessä iridoideja ja jos on, onko niitä paljon vai vähän. Omassa tutkimuksessani, joka on tehty yhteistyössä Helsingin yliopiston populaatiobiologian laitoksen metapopulaatiotutkimusryhmän kanssa, olemme havainneet, että täpläverkkoperhosnaaraan munintakasveiksi valitsemat heinäratamo- tai tähkätädykeyksilöt sisältävät kahta suurina pitoisuuksina esiintyvää iridoidiglykosidia merkittävässä määrin enemmän kuin kasvien kymmenen lähintä lajitoveria.

Iridoidien merkitys täpläverkkoperhoselle

Täpläverkkoperhonen, *Melitaea cinxia*, on täpläperhosiin kuuluva laji, jota esiintyy Suomessa enää Ahvenanmaan kedoilla. Se käyttää ravinnokseen heinäratamoa, *Plantago lanceolata* ja tähkätädykettä, *Veronica spicata*. Näistä tähkätädykettä esiintyy vain osassa Ahvenanmaata, kun taas heinäratamoa on useimmilla alueen kedoilla. Kumpikin kasvi sisältää merkittäviä määriä kahta iridoidiglykosidia: katalpolia ja aukubiinia. Niiden pitoisuus vaihtelee huomattavasti kasviyksilöiden välillä. Näiden kahden yhdisteen yhteismäärä voi nousta lähes kymmenesosaan kasvin kuivapainosta.

Täpläverkkoperhosen elämänkaari alkaa heinäkuussa, jolloin toukat kuoriutuvat ravintokasvin lehtien alle munituista munista ja alkavat heti innokkaasti nakertaa kasvia. Syyskuussa ne valmistautuvat talviunille ja kehräävät paksun verkon, jonka sisään koko parisataapäinen sisarusrykelmä mahtuu viereen. Talvehtiessaan toukat ovat vielä pieniä, enimmillään riisinjyvän kokoisia ja kuivapainol-

Mitä ovat iridoidiglykosidit?

Iridoidiglykosidit ovat karvasaineita, joita esiintyy monissa koppisiemenisiin kuuluvissa kasviheimoissa. Ne syntyvät kasvien aineenvaihduntatuotteina ja ovat kemiallisesti sukua alkaloideille. Esimerkkejä tutuista iridoidipitoisista kasveista ovat vaikkapa piharatamo ja nurmitädyke. Samansukuisissa kasveissa on usein samoja iridoidiglykosideja, ja siksi näitä yhdisteitä on käytetty apuna taksonomisissa määrittelyissä selvitettäessä, kuinka läheistä sukua kaksi kasvilajia on toisilleen.

Eroja samanlajisten kasvien välillä on tavallisesti ainoastaan iridoidipitoisuudessa. Tosin joissakin tapauksissa on eri maanosissa kasvavissa saman lajin kasveissa havaittu esiintyvän joitakin toisistaan poikkeavia iridoideja pieninä pitoisuuksina, vaikka pääiridoidit ovatkin samat. Iridoidipitoisuuteen vaikuttavat elinympäristön lisäksi kasvin ikä ja etenkin perinnölliset ominaisuudet; niinpä rinnakkain kasvavissa yksilöissä saattaa olla hyvinkin erilaisia iridoidipitoisuuksia. Myös kasvin historia saattaa vaikuttaa, sillä joissakin tutkimuksissa on havaittu iridoidipitoisuuksien kasvavan muutaman viikon viiveellä sen jälkeen, kun kasvinsyöjät ovat vaurioittaneet kasvia.

Kemialliselta kannalta iridoidiglykosidit ovat poolisia ja jokseenkin haihtumattomia aineita. Ne ovat suhteellisen pienikokoisia yhdisteitä, jotka liukenevat helposti veteen ja lyhytketjuisiin alkoholeihin kuten metanoliin ja etanoliin, mutta eivät sen sijaan eetteriin tai kloroformiin. Useat iridoidiglykosidit ovat herkkiä hapoille: sokeriosan irrotessa hapon vaikutuksesta jäljelle jääneet iridoidi-aglykonit hajoavat ja muodostavat erilaisten toisiintumistuotteiden seoksia. Koska alkuperäistä yhdistettä ei tällaisista seoksista välttämättä pystytä edes tunnistamaan, pitoisuuden määrittämisestä puhumattakaan, on eristys- ja analyysimenetelmiä kehiteltäessä pyrittävä välttämään iridoidien reagoitua.

Iridoidiglykosideja on löydetty runsaasta neljästäkymmenestä kasviheimosta. Monia iridoidipitoisia kasveja on käytetty kansanlääkinnässä. Tästä on hyvänä esimerkkinä piharatamo, "rautalehti" (J. Suomi, *Kemia – Kemi* vol. 28/2001). Iridoidien on todettu mm. lievittävän tulehduksia sekä tappavan bakteereja ja viruksia.

taan 1–2 mg. Kevätpuolella ne alkavat kasvaa nopeasti. Toukat heräävät horroksestaan maaliskuuhuhtikuussa ja viettävät paljon aikaa aurinkoa ottaen. Niiden musta väri imee tehokkaasti lämpöä, ja paistatteleva toukkaryhmä voikin olla useita asteita ympäristöä lämpimämpi. Lämpö kiihdyttää toukkien kehitystä, ja toukkokuulle tullessa ne ovat kasvattaneet massansa noin kymmenkertaiseksi ja ovat valmiit koteloitumaan. Uusi perhossukupolvi lentää kesäkuussa etsimään sopivia munintakasveja omille jälkeläisilleen.

Vaikka iridoidiglykosidit suojelevat toukkia useimmilta saalistajilta, jotkut loispistiäiset ovat erikoistuneet munimaan iridoidipitoista ravintoa käyttäviin perhostoukkiin. Tällöinkin on havaittu, että paljon iridoideja sisältävät toukat ovat paremmassa turvassa loisilta kuin laihempaa iridoidiravintoa nauttineet toverinsa. Iridoidipitoisuus saattaa olla selityksenä sillekin,

miksi toukat ovat keväällä suuremmassa vaarassa joutua loispistiäisen uhriksi kuin syksyllä. Talvehtineet toukat kun sisältävät vähemmän iridoidiglykosideja ruumiinpainoan kohden kuin vasta talviunille valmistautuvat.

Iridoidien analysointiin uusi ympäristöstäytävällinen menetelmä

Kokonaisia toukkia tai kasvinlehtiä ei voi sellaisinaan analysoida. Ne täytyy ensin esikäsitellä esimerkiksi uuttamalla, jotta tutkittavat yhdisteet saataisiin eroon muusta näyttemateriaalista. Kirjallisuudessa iridoidien eristämiseen on yleensä käytetty uuttoa alkoholeilla. Uutto on tehty huoneenlämmössä ja se on kestänyt yli vuorokauden. Omassa tutkimuksessani pyrin pääsemään eroon orgaanisten liuottimien käytöstä esikäsitelyssä, minkä vuoksi päädyin käyt-

tämään kuumaa vettä. Utto kuumalla vedellä oli yksinkertaista, sillä se muistuttaa väkevän teen hauduttamista. Se oli myös paljon nopeampi, ympäristöystävällisempi ja jopa tehokkaampi menetelmä kuin kirjallisuudessa käytetyt.

Utteiden analysointiin käytettiin ns. misellistä sähkökineettistä kapillaarikromatografiaa, joka on yksi kapillaarielektroforeettisista erotusmenetelmistä. Erotus perustuu yhdisteiden liikkeeseen hyvin ohuessa kapillaarissa, jonka päiden välillä vallitsee yleensä 10 000 – 30 000 voltin suuruinen sähkökenttä. Kapillaarin sisällä on sähköä johtavaa liuosta, joka käyttämässäni menetelmässä sisälsi myös useissa pesuaineissa käytettyä pinta-aktiivista ainetta. Optimoiduissa olosuhteissa kyettiin määrittämään kaksitoista neutraalia iridoidiglykosidia noin 20 minuutissa. Yhdisteet voitiin tunnistaa kytkemällä systeemiin ilmaisimeksi massaspektrometri, joka ionisoi yhdisteet ja erottaa ne toisistaan poikkeavien massojen perusteella.

Mitä tulokset kertovat?

Vasta menetelmänkehittelyn jälkeen päästiin tutkimaan näytteitä; erityisesti keskityttiin täpläverkkoperhosen ravintokasvien analysointiin. Sen ohella analysoitiin myös perhosen toukkia ja aikuisia yksilöitä. Kehitetty analyysimenetelmä osoittautui kyllin herkäksi määrittämään jopa talvehtimaan valmistautuvan, 1–2 mg painoisen toukan iridoidipitoisuuden. Parhaissa olosuhteissa voitiin puolessa tunnissa määrittää kaksitoista iridoidiglykosidia puhdasaineseoksesta.

Jo aiempien tulosten pohjalta osattiin epäillä, että heinäratamo ja tähkätädyke sisältäisivät katalpoli- ja aukubiini-nimisiä iridoidiglykosideja. Näitä kumpaakin oli kasvien kuivapainosta parhaimmillaan jopa 4 prosenttia. Lisäksi kasveissa esiintyi neljää muuta iridoidiglykosidia pienempinä pitoisuuksina. Sen sijaan perhosista ja toukista löytyi vain katalpolia ja aukubiinia, jotka ovat erityisen kitkerän makuisia. Tutkimuksen pohjalta ei kuitenkaan pystytty vielä selvittämään, keräävätkö toukat näitä kahta yhdistettä itseensä selektiivisesti, vai muuttaako niiden aineenvaihdunta muut kasveista saadut iridoidit katalpoliksi ja aukubiiniksi.

Laajemmassa osatutkimuksessa selvitettiin suuren näytemäärän pohjalta katalpoli- ja aukubiinipitoisuuden vaihtelua eri puolilta Ahvenanmaata kerätyissä heinäratamo- ja tähkätädykenäytteissä. Tällöin havaittiin, että samalla kedolla kasvavat kasvit saattoivat poiketa kemiallisesti toisistaan enemmän kuin toisella puolen Ahvenanmaata sijaitsevan kedon saman lajin kasveista.

Iridoidipitoisuuksia tutkittiin myös ajan funktiona keräämällä kasvinäytteitä toukokuun loppuun, keskipäivän ja elokuussa. Heinäratamon keskimääräinen iridoidipitoisuus kasvoi kesän loppua kohden, mutta tähkätädykkeen pitoisuudet pysyivät jokseenkin vakioina.

Täpläverkkoperhosen munintakasveja verrattiin myös niiden lähimpiin lajitovereihin. Tällöin havaittiin perhosemon valitseman munintakasvin katalpoli- ja aukubiinipitoisuuksien olevan selvästi korkeampia kuin lähimpien samanlajisten kasvien. Edes kasvin ulkonäkö ei näyttänyt vaikuttavan valintaan siinä määrin kuin sen iridoidipitoisuus.

Tulokset siis tuntuivat tukevan teoriaa, että täpläverkkoperhostoukalle on hyötyä yleissaa-listajille jopa lievästi myrkyllisten iridoidien nauttimisesta, ja että tuo hyöty ylittää ne haitat, joita yhdisteet toukille itselleen aiheuttavat. Ilmeisesti iridoidiglykosidit suojelevat toukkia myös verkkoperhosiin erikoistuneiden loispistiäisten hyökkäyksiltä, sillä kaikkein eniten iridoideja sisältäneillä kasveilla eläneet toukat – joiden saattoi aiempien kokeiden perusteella olettaa olevan myös keskimääräistä iridoidipitoisempia – kärsivät vähemmän loispistiäisistä kuin ne toukat, joiden iridoidipitoisuus oli matala.

Kirjoittaja on fil.tri ja opettava tutkija epäorgaanisen ja analyttisen kemian laboratorioissa Teknillisellä korkeakoululla. Kirjoitus perustuu Helsingin yliopistossa 29.11.2002 järjestetyssä väitöstilaisuudessa pidettyyn alustukseen. Kirjoittajan väitöskirja on nimeltään "Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography in the Analysis of Iridoid Glycosides in Melitaea cinxia and its Host Plants" (Misellinen sähkökin-eettinen kapillaarikromatografia iridoidiglykosidien analysoinnissa täpläverkkoperhosesta ja sen ravintokasveista).