

CSL 11 Einfluss von abiotischen Faktoren auf Wuchs und Scopolamin-Biosynthese in *Duboisia myoporoides*.

Influence of abiotic factors on growth and biosynthesis of scopolamine in Duboisia myoporoides.

Sophie Friederike Ullrich^{1,2*}, Oliver Kayser², Hansjörg Hagels¹

¹Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Binger Straße 173, 55216 Ingelheim, Deutschland

sophie_friederike.ullrich@boehringer-ingelheim.com

²Technische Universität Dortmund, Emil-Figge-Str. 66, 44227 Dortmund, Deutschland



DOI 10.5073/jka.2014.446.011

Zusammenfassung

Duboisia ist eine in Australien beheimatete Pflanze aus der Familie der Nachtschattengewächse, die Tropanalkaloide als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe enthält, deren quantitativ und ökonomisch bedeutsamstes Scopolamin ist.

Um neue Erkenntnisse hinsichtlich des Einflusses abiotischer Faktoren auf Wuchs und Scopolamin-Biosynthese zu gewinnen, wurden Pflanzen der Art *Duboisia myoporoides* in Hydrokultur in Klimakammern unter streng kontrollierten Bedingungen angebaut (kalibrierte Einstellungen für Beleuchtungsdauer, Lichtintensität und Temperatur). Wichtige Messgrößen stellten dabei Biomasse und Alkaloidgehalt dar, letzterer gemessen mittels UHPLC und LC-MS.

Stichwörter: *Duboisia*, LC-MS, Scopolamin, Tropanalkaloide

Abstract

Duboisia, a native Australian plant belonging to the family of *Solanaceae*, contains tropane alkaloids as secondary plant components, thereof quantitatively as well as economically most important scopolamine.

In order to obtain new findings regarding the effect of abiotic factors on biomass and biosynthesis of scopolamine, plants of the species *Duboisia myoporoides* were grown in climate chambers using hydroponics under strictly controlled conditions (calibrated settings regarding lighting period, light intensity and temperature). Essential measurement variables were biomass and alkaloid content, the latter analyzed via UHPLC and LC-MS.

Keywords: *Duboisia*, LC-MS, scopolamine, tropane alkaloids

Einleitung

Scopolamin, ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff der in Australien beheimateten Pflanzengattung *Duboisia*, wird aufgrund seiner anticholinergen Eigenschaften in der pharmazeutischen Industrie als Ausgangsstoff für verschiedene Wirkstoffe eingesetzt. Bis heute ist die chemische Vollsynthese dieses Tropanalkaloids teurer als die direkte Extraktion aus Pflanzenmaterial. Auch durch die Überexprimierung biosynthetischer Gene des Tropanalkaloid-Stoffwechsels konnte keine Erhöhung des Alkaloidgehalts in regenerierten Pflanzen erreicht werden (Hashimoto und Yamada, 2003; Palazón et al., 2003). Deshalb basiert die industrielle Produktion von Scopolamin zu großen Teilen auf dem landwirtschaftlichen Anbau von *Duboisia* im Freiland (Gryniewicz und Gadzikowska, 2008).

Um hierbei den Einfluss abiotischer Faktoren auf Wuchs und Scopolamin-Biosynthese genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Pflanzen der Art *Duboisia myoporoides* unter streng kontrollierten Bedingungen angebaut. Hierbei lag der Fokus auf Beleuchtungsdauer, Lichtintensität und Temperatur.

Material und Methoden

Kultivierung

Pflanzen der Art *Duboisia myoporoides* (gestellt durch Boehringer Ingelheim GmbH und Co. KG) wurden unter festgelegten Bedingungen (siehe Abb. 1) in Klimakammern in Hydrokultur über einen Zeitraum von sechs Wochen angebaut (PlantMaster, Brightboys, CLF Plant Climatics GmbH). Die bewurzelten Stecklinge wurden in Blähton getopft und mit 0,1 %-tiger Nährlösung versorgt (Wuxal Super, Wilhelm Haug GmbH & Co. KG). Zur Beleuchtung wurden Philips Master TL-D 58W/840 (4000K)-Lampen eingesetzt.

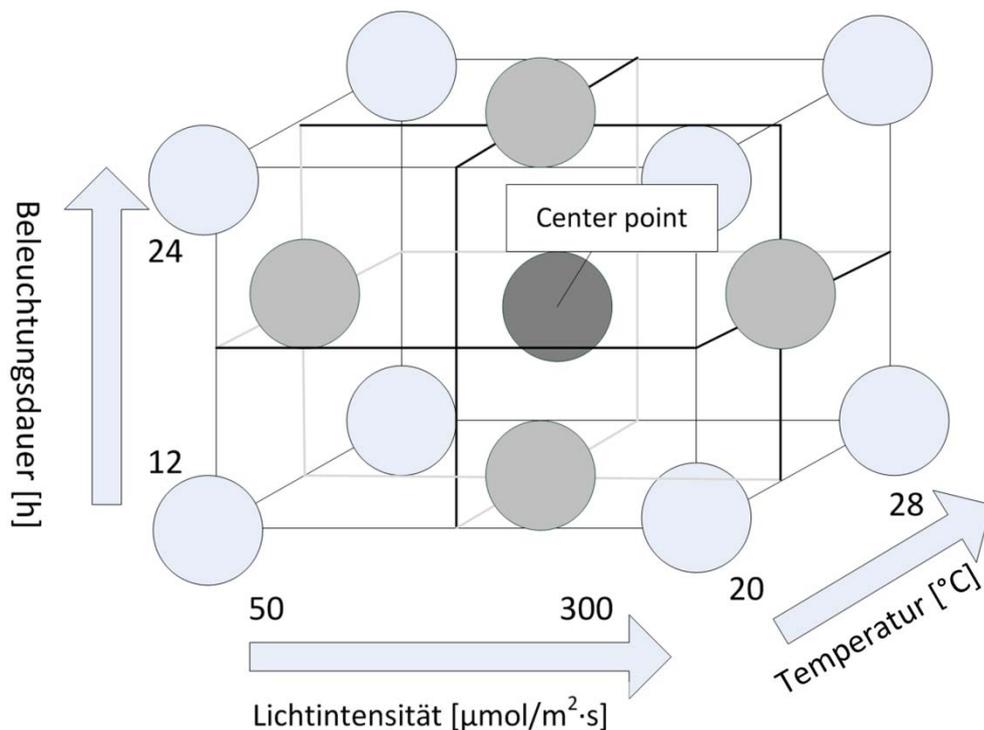


Abb. 1 Experimentelles Design für die Kultivierungsparameter Licht und Temperatur

Fig. 1 Experimental design of the cultivation parameters light and temperature

Extraktion:

Zum Abschluss des Experiments wurden alle Blätter entnommen und Frisch- und Trockengewicht nach 24-stündiger Trocknung bei 60 °C bestimmt. Alle getrockneten und anschließend gemahlene Proben wurden dreifach extrahiert, um den Alkaloidgehalt zu bestimmen. 50 mg +/- 1 mg wurden in einen 15 ml Falcon-Tube eingewogen und anschließend 10 ml Phosphorsäure 0,5 % V/V zugegeben. Nach 15-minütigem Ultraschallbad bei 30 °C (Sonorex Super 10P Digital, Bandelin electronic GmbH & Co. KG), wurden die Proben 18 h bei 200 rpm geschüttelt (Infors Ht-shaker, Orbitron) und anschließend 1 ml Probe entnommen und ins Vial filtriert.

HPLC-Messung

Zur Analyse wurde eine HPLC-Anlage (1200 series-Entgaser, 1260 Infinity-Pumpe, 1200 series-HiP-ALS SL+-Autosampler, 1260 Infinity TCC-Säulenofen, 1260 Infinity 1260-VWD-Detektor) von Agilent Technologies genutzt. Als Säule kam eine Kinetex Core Shell C18-Säule (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) von Phenomenex zum Einsatz und eine Gradientenmethode (12 min Dauer) mit zwei verschiedenen mobilen Phasen wurde für die Messung verwendet. Mobile Phase A bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure V/V und mobile Phase B aus einer Mischung von Methanol und Acetonitril im Verhältnis 4:1. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl, die Säulentemperatur 30 °C und die Flussrate lag bei 1.05 ml/min. Die Detektion von Scopolamin, Hyoscyamin und anderen Nebenalkaloiden wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm durchgeführt.

Ergebnisse

Der Schwerpunkt bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen wurde auf den Einfluss unterschiedlicher Lichtintensität auf Alkaloidgehalt und Biomasse gelegt. Hierzu wurden erste, bereits getestete Kultivierungsbedingungen aus dem oben gezeigten Design herausgegriffen (siehe Abb. 1). Beim Vergleich unterschiedlicher Lichtintensitäten unter konstant gehaltener Temperatur zeigt sich, dass der höchste Scopolamingehalt bei geringster Lichtstärke auftritt (siehe Abb. 2). Die Nebenalkaloide liegen in ähnlicher Konzentration vor, während der relative Gehalt an Scopolamin bei niedriger Lichtintensität signifikant ($p < 0,05$) erhöht ist.

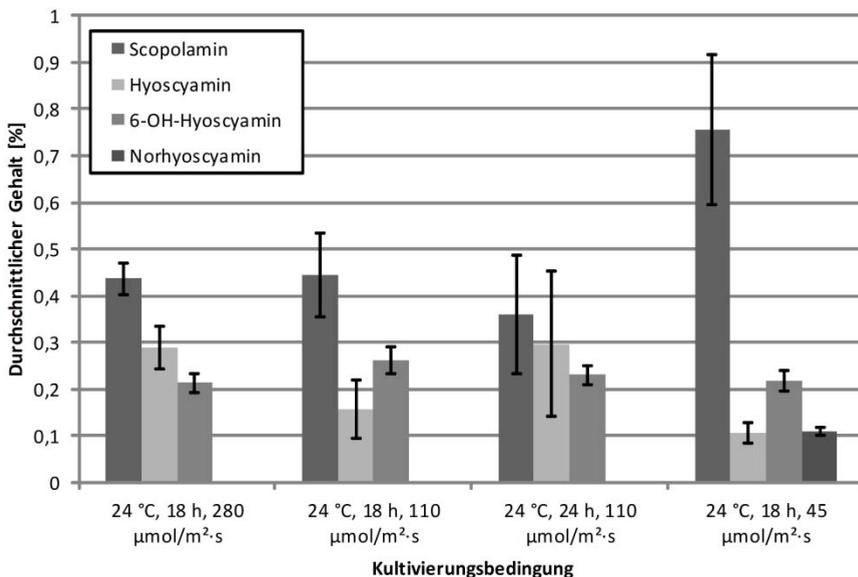


Abb. 2 Durchschnittlicher Alkaloidgehalt von *Duboisia myoporoides* bei unterschiedlicher Lichtintensität nach sechswöchiger Kultivierung, 4 Replikate pro Kultivierungsbedingung (Temperatur [°C], Beleuchtungsdauer/Tag [h], Lichtintensität [$\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$])

Fig. 2 Average alkaloid content of *Duboisia myoporoides* with focus on different settings of light intensity after 6 weeks of cultivation, 4 replicates per cultivation condition (temperature [°C], daily exposure to light [h], light intensity [$\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$])

Bei geringer Lichtexposition von 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ist die durchschnittliche Biomasse (Trockengewicht) nach sechswöchiger Kultivierung am niedrigsten, was vermutlich durch eine verringerte Photosyntheserate zustande kommt (siehe Abb. 3). Betrachtet man die Biomasse bei mittlerer und höherer Beleuchtungsintensität (110 und 280 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$), zeigen sich im Durchschnitt vergleichbare Trockengewichte. Eine Erhöhung der Lichtmenge von 110 auf 280

$\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ führt hier zu keinem weiteren Anstieg der Biomasse. Auch die Veränderung der Beleuchtungsdauer von 18 h auf 24 h täglich bei einer Lichtintensität von $110 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ resultiert in keinem erkennbaren Unterschied hinsichtlich Biomasse und Alkaloidgehalt. Analoge Resultate ließen sich auch in parallel durchgeführten Versuchen mit *Duboisia* Hybriden (*Duboisia myoporoides* x *D. leichhardtii*) unter den gleichen Kultivierungsbedingungen feststellen.

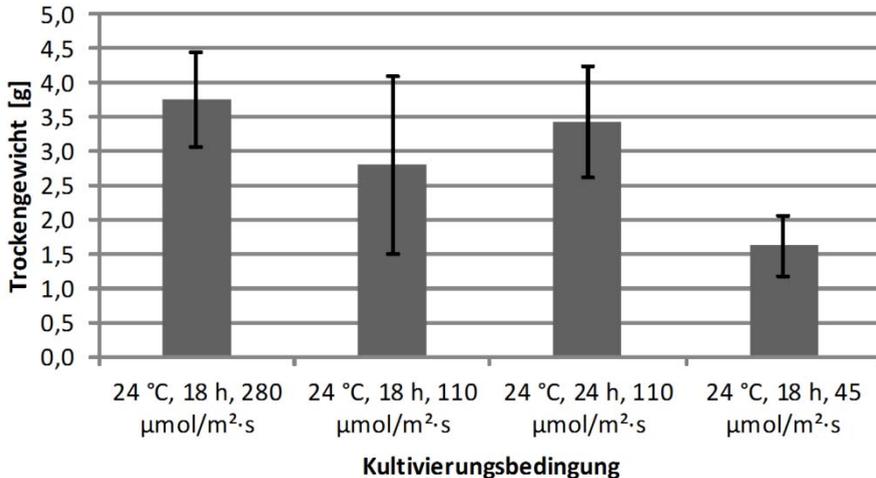


Abb. 3 Durchschnittliche Biomasse bei unterschiedlicher Lichtintensität nach sechswöchiger Kultivierung, 4 Replikate pro Kultivierungsbedingung (Temperatur [°C], Beleuchtungsdauer/Tag [h], Lichtintensität [$\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$])

Fig. 3 Average biomass with focus on different settings of light intensity after 6 weeks of cultivation, 4 replicates per cultivation condition (temperature [°C], daily exposure to light [h], light intensity [$\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$])

In den weiteren Experimenten (siehe Abb. 1) soll nun untersucht werden, inwieweit die Temperatur und Beleuchtungsdauer Wuchs und Scopolamin-Biosynthese beeinflussen und in welchem Umfang Licht und Temperatur miteinander wechselwirken.

Literatur

- GRYNKIEWICZ, G. und M. GADZIKOWSKA, 2008: Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives. *Pharmacol. Rep.* **60**, 439-463
- HASHIMOTO, T. und Y. YAMADA, 2003: New genes in alkaloid metabolism and transport. *Curr. Opin. Biotech.* **14**, 163-168
- PALAZÓN, J., MOYANO, E., CUSIDÓ, R. M., BONFILL, M., OKSMAN-CALDENTEY, K.-M. und M. T. PIÑOL, 2003: Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the *h6h* gene. *Plant Sci.* **165**, 1289-1295