

SAPOPENINBILDUNG IN SUSPENSIONSKULTUREN VON *DIGITALIS PURPUREA*

HORST PILGRIM

Sektion Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, 22 Greifswald, DDR

(Received 7 December 1976)

**Key Word Index**—*Digitalis purpurea*; Scrophulariaceae; tissue cultures; steroid sapogenins; plant growth regulators.

**Abstract**—The effect of various growth conditions on the saponin level in suspension cultures of *Digitalis purpurea* has been investigated. The effect of time cultivation, 2,4-D concentration and 2,4-D combined with NAA with or without casein hydrolysate, on saponin concentrations is described.

## EINLEITUNG

*Digitalis purpurea* enthält als Sapogenine Gitogenin, Digitogenin, Digalogenin und Tigogenin, wobei Tigogenin und Gitogenin am häufigsten angetroffen werden [1,2]. In den Samen überwiegt Digitogenin [3]. Gewebekulturen (Kallus und Suspensionskulturen) dieser Pflanze bilden als Aglycone der Saponine Gitogenin und Tigogenin [4]. Gitogenin wird auch in *in vitro* kultivierten Geweben von *Yucca glauca* [5] und *Trigonella foenum-graecum* [6] gefunden. Kallus- und Suspensionskulturen von *T. foenum-graecum* bilden darüber hinaus Tigogenin. Die Biosynthese- und Akkumulationsrate von Sapogeninen ist von den Kulturbedingungen (Kulturdauer, Wuchsstoffen, Präkursoren, Cofaktoren) abhängig [7-11]. Von uns aus gekeimten Samen von *D. purpurea* isolierten und als Suspension kultivierten Gewebe wurden hinsichtlich ihres Sapogeningehaltes untersucht.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Veränderung des Sapogeningehaltes, des Trockengewichtes und des Wachstumsindexes WI (Entwurkengewicht/Inokulumtrockengewicht) einer 30 Tage alten Suspensionskultur von *D. purpurea* in Abhängigkeit von der 2,4-D-Konzentration ist in Abb. 1 wiedergegeben. Tigogenin ist stets in höherer Konzentration vorhanden. Der Sapogeningehalt bezogen auf 100 g Trockengewicht erreicht bei 0.05 ppm 2,4-D sein Maximum, jedoch wird die höchste Sapogeninausbeute pro Kulturgefäß mit 0.1 ppm 2,4-D im Medium erzielt (0.05 ppm 2,4-D : 0.98 mg Sapogenin/Kulturgefäß, 0.1 ppm 2,4-D : 1.46 mg Sapogenin/Kulturgefäß). *Dioscorea deltoidea* Suspensionskulturen zeigen optimales Wachstum ohne 2,4-D im Medium, die höchste Diogeninakkumulation ist jedoch bei 0.1 ppm 2,4-D zu beobachten [8].

Ähnlich wie bei den von uns kultivierten Digitalisgeweben wird die maximale Sapogeninakkumulation bei einer für das Wachstum suboptimalen 2,4-D-Konzentration gefunden. Die Sapogeninakkumulation erreicht nach 30 Tagen ein Maximum, welches mit dem Maximum der Wachstumskurve zusammenfällt (Abb. 2). Bei weiterer Kultivierung der Gewebe bleibt die auf Trockengewicht

bezogene Sapogeninkonzentration konstant. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß durch das Absterben von Zellen Saponine ins Medium übergehen, die Trockenmasse dieser Zellen mit in das Gesamt-trockengewicht eingeht und somit auf dem Plateau der Sapogeninkurve noch eine weitere Biosynthese stattfinden muß, das heißt, in den noch lebenden und stoffwechselaktiven Zellen steigt der Sapogeningehalt weiter. *Dioscorea* Gewebe verhalten sich in Suspensionskulturen ein wenig anders [8]. Das Wachstumsoptimum liegt bei 14 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt ist das Maximum der Diosgeninakkumulation noch nicht erreicht. Trotz Abfall des zellulären Trockengewichtes steigt der auf trockene Zellmasse bezogene Sapogeningehalt bis zum 56. Tag. In Suspensionskulturen von *T. foenum-graecum* nimmt der Gesamtsapogeningehalt (Diosgenin, Tigogenin, Gitogenin) bis zur 6. Kulturwoche zu [7]. Diese Zunahme verläuft parallel dem Wachstumsindex. Die Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Sapogeninproduktion sind sicherlich auf die gewählte Pflanzenart und die voneinander abweichenden Kulturbedingungen zurückzuführen. Der Einfluß von  $\alpha$ -Naphthylessigsäure

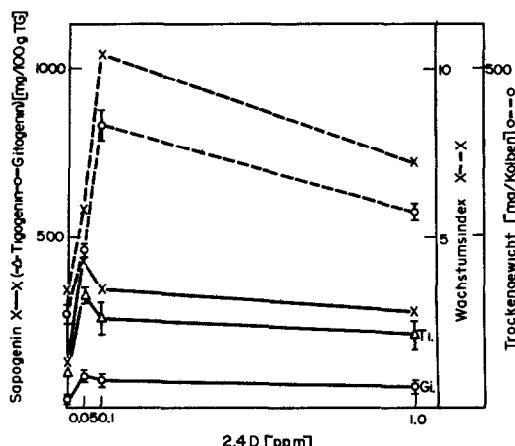


Abb. 1. Der Einfluß der 2,4-D-Konzentration auf Wachstumsindex, Trockengewicht und Sapogeninakkumulation.

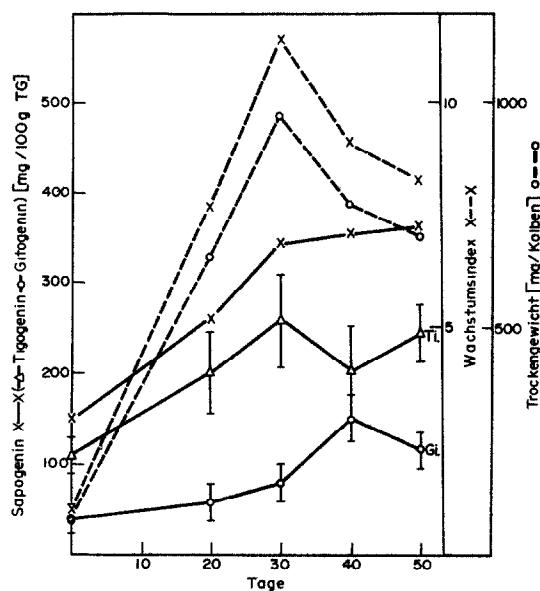


Abb. 2. Die Sapogeninakkumulation und der Wachstumsindex in Abhängigkeit vom Alter der Suspensionskultur.

(0.1 und 1.0 ppm) und vitaminfreiem Caseinhydrolysat (0.5 g/1000 ml Medium) in 0.1 ppm 2,4-D enthaltenden Medien auf die kultivierten Gewebe (30 Tage) ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Caseinhydrolysat ohne NAA verursacht trotz Wachstumsretention keine entscheidende Beeinträchtigung der Sapogeninakkumulation. Die Sapogeninmenge ist nur gering vermindert, wovon hauptsächlich Gitogenin betroffen ist. Andererseits führt die Steigerung des Zellwachstums auf NAA und Caseinhydrolysat enthaltenden Nährmedien zu keiner verstärkten Sapogeninakkumulation. So wird zwar im letzten Fall pro Kolben die

größte Sapogeninausbeute erreicht, jedoch lassen diese Bedingungen keine kontinuierliche Passagierung zu.

In allen Fällen ist die in das Medium freigegebene Saponinmenge bis zum 30. Tag sehr gering, so daß sie mit dem Hämolysetest nur schwer nachzuweisen ist. Bei Kultivierung über den 30. Tag hinaus werden im Medium steigende Mengen Saponin angetroffen, was wahrscheinlich auf die aus den absterbenden Zellen stammenden Saponine zurückzuführen ist.

#### EXPERIMENTELLES

**Suspensionskultur.** Die aus Samen von *D. purpurea* isolierten Gewebe wurden in einem variierten Murashig-Skoog Medium mit 0.1 ppm 2,4-D und 0.1% Agar auf einem Rundschütteltisch (Schüttelfrequenz = 240 Umdrehungen/min.) bei  $25 \pm 1^\circ$  im Dunkeln kultiviert.

**Gewebeextraktion und Hydrolyse.** Das zur Trockengewichtsbestimmung lyophilisierte Gewebe (100 mg) wurde mit Quarzsand verrieben und mit 15 ml HCl (3 + 7 v/v) 4 Stunden auf  $90^\circ$  erhitzt. Danach wurde das Hydrolysat abgesaugt und mit dest.  $H_2O$  neutral gewaschen. Das Filter mit dem Gewebehydrolysat wurde lyophilisiert und 2 mal mit 3 ml Benzol 30 min. in der Wärme extrahiert sowie mit 3 ml Benzol nachgewaschen. Die Extrakte wurden vereinigt, klar filtriert und auf 10 ml aufgefüllt.

**Sapogeninbestimmung.** Die Bestimmung erfolgte kolorimetrisch nach dünnenschichtchromatografischer Trennung auf aktivierten Kieselgelplatten [12]. Von jedem Extrakt wurden 3 mal je 2 ml und 10,30 und 50  $\mu$ l einer 0,2% igen Lösung von Tigogenin und Gitogenin als 1.5 cm langer Strich aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte nach Kammersättigung in  $CHCl_3\text{-}Me_2CO$  (8:2) 2 mal aufsteigend. Nach Lufttrocknung wurden die Platten mit Wasser besprüht und die Sapogeninflecken mit einer Nadel markiert. Anschließend wurden die Platten 30 min bei  $105^\circ$  getrocknet und die Flecken durch Auskratzen in Reagenzgläser überführt. Die Proben wurden mit je 0.1 ml einer 0,5% igen Anisaldehydlösung in absolv.  $C_2H_5OH$  versetzt und 15 min. in ein siedendes Wasserbad gestellt. Anschließend wurde 10 min. in Eiswasser abgekühlt und nach Zusatz von 5 ml Phosphorsäure per 70 min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach erneutem Abkühlen in Eiswasser wurden die Proben in Zentrifugengläser überführt, klar zentrifugiert und nach 30 min die Extinktion bei 540 nm bestimmt.

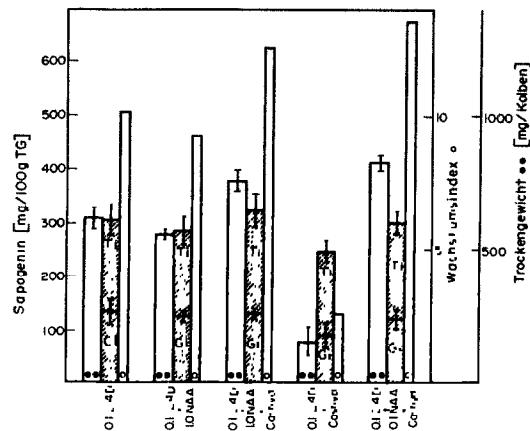


Abb. 3. Der Einfluß von 2,4-D und in Kombination mit NAA und/oder vitaminfreiem Caseinhydrolysat (Difco) auf Wachstumsindex, Trockengewicht und Sapogeninakkumulation.

#### LITERATUR

1. Tschesche, R. und Wulff, G. (1961) *Chem. Ber.* **94**, 2019.
2. Kawasaki, T., Nishioka, T., Yamauchi, T., Miyahara, K. and Eubutsu, M. (1965) *Chem. Pharm. Bull.* **13**, 435.
3. Tschesche, R., Wulff, G. und Balle, G. (1962) *Tetrahedron* **18**, 959.
4. Pilgrim, H. (1972) *Pharmazie* **27**, 121.
5. Stohs, S. J., Sabatka, J. J., Obrist, J. J. and Rosenberg, H. (1974) *Lloydia* **37**, 504.
6. Khanna, P. and Jain, S. C. (1973) *Lloydia* **36**, 96.
7. Khanna, P., Jain, S. C. and Bansal, R. (1975) *Indian J. Exp. Biol.* **13**, 211.
8. Kaul, B., Stohs, S. J. and Staba, E. J. (1969) *Lloydia* **32**, 347.
9. Sarkisowa, M. A. (1973) *Dissertation Moskau*.
10. Heble, M. R., Narayanaswami, S. and Chadha, M. S. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2393.
11. Marshall, J. G. and Staba, E. J. (1976) *Phytochemistry* **15**, 53.
12. Okanishi, T. and Togami, M. (1969) *Chem. Pharm. Bull.* **17**, 315.