

ÜBER DIE BILDUNG VON LIMONEN UND CARVON IM KÜMMEL, *CARUM CARVI*

M. VON SCHANTZ und A. HUHTIKANGAS

Abteilung für Pharmakognosie, Universität Helsinki, Finland

(Received 20 August 1969, in revised form 23 February 1970)

Zusammenfassung—Durch Applizierung von $^{14}\text{CO}_2$ an Kümmelpflanzen wurde bewiesen, dass die Biosynthese des Carvons (II) nicht von dem in die Sekreträume ausgeschiedenen Limonen (I) ausgeht. Limonen und Carvon müssen aus einer gemeinsamen Vorstufe in der lebenden Zelle unabhängig voneinander gebildet werden. Weiter wurde gefunden, dass in Blüten und jungen Früchten vorwiegend Limonen gebildet wird, während die Carvonbildung mit dem Alter der Früchte gesteigert wird. Anfangs ist die Carvonbildung gering. Sie wird bei der Entwicklung der Früchte immer lebhafter und überholt bei beginnender Bräunung der Früchte die Limonenbildung. Erst in den reifen, trockenen Spaltfrüchten hört die Bildung der Terpene auf.

Abstract—Caraway plants in various stages of fruit ripening were allowed to assimilate $^{14}\text{CO}_2$ and, from radiogaschromatographic analysis of the fruit oils after various periods of metabolism, it became evident that the biosynthesis of carvone (II) does not involve limonene (I) as a precursor. These two terpenes must be independently formed from a common precursor in a living cell. It was further shown that in flowers and young fruits limonene is the main product of terpene biosynthesis in caraway with the formation of carvone increasing during later stages of fruit ripening. When the first signs of browning of the fruits appear there is a marked difference in the rates of formation of the two terpenes in favour of carvone. The biosynthesis of terpenes does not cease until the fruits are ripe and dry.

EINLEITUNG

WÄHREND der Entwicklung der Kümmelfrüchte werden in der Pflanze reichlich Terpene gebildet und in Sekretbehälter ausgeschieden. Anfangs entsteht vorwiegend Limonen (I), später auch Carvon (II).¹ Nach Sanderman und Bruns² verläuft die Biosynthese von Carvon in *Anethum graveolens* L. über Limonen. Bruns³ hat den gleichen Weg bei *Carum carvi* L. gefunden. Es ist aber noch nicht erwiesen, ob das im Sekretbehälter schon ausgeschiedene Limonen wirklich das Ausgangsmaterial der Carvonbiosynthese ist. Die Versuche von Sanderman und Bruns zeigen zwar, dass Limonen zu Carvon umgesetzt wird, damit ist aber nur bewiesen dass in der lebenden Pflanze während gewisser Entwicklungsstadien der Frucht Fermente vorhanden sind die das Vermögen besitzen, Limonen in Carvon überzuführen.

Beim Studium von verschiedenen *Mentha*-Arten hat Reitsema⁴ gefunden, dass hier Limonen nicht unbedingt das Vorstadium des Carvons sein muss. Es steht aber noch die Möglichkeit offen, dass beide auf verschiedenen Wegen aus einem gemeinsamen Carbonium-Ion gebildet werden. Nach Hefendehl⁵ besteht bei C-2-oxygenierten Terpenen wie z.B. Carvon keine Möglichkeit, dass die Sauerstofffunktion des Geranylpyrophosphates direkt ins Molekül eingebaut wird, während dies bei C-3 oxygenierten Terpenen wie z.B.

¹ E. N. LUYENDIJK, *Pharm. Weekbl.* **92**, 349 (1956).

² W. SANDERMAN und K. BRUNS, *Planta Med.* **4**, 364 (1965).

³ K. BRUNS, Diss., Hamburg (1964).

⁴ R. H. REITSEMA, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **XLVII**, 267 (1958).

⁵ F. W. HEFENDEHL, *Planta Med.* **15**, 121 (1967).

Menthol der Fall sein könnte. Hefendehl hält es weiter für möglich, dass Limonen in *Mentha piperita* L. auch die Vorstufe der C-3-oxygenierten Verbindungen sein könnte, hat aber nicht bewiesen, dass all diese Verbindungen nur aus Limonen gebildet werden. Ebensovwenig wie frühere Autoren hat er Beweise dafür, dass schon ausgeschiedenes Limonen weiter umgesetzt wird.

von Schantz⁶ sowie von Schantz und Norri⁷ postulieren, dass die Biosynthese der Terpene als fermentativer Prozess in der lebenden Zelle bis zur Ausscheidung in die Sekretbehälter verläuft, wobei sich die Terpenkohlenwasserstoffe über Carboniumionen durch Elektronenverschiebungen und Abspaltung eines Protons stabilisieren. Die Stabilisierung der Sauerstofffunktionen kann auch aus demselben Carbonium-Ion angenommen werden, wobei neben den Elektronenverschiebungen auch eine Wasseranlagerung stattfindet. Nach dieser Theorie werden Terpenkohlenwasserstoffe und Sauerstoffverbindungen aus demselben Carbonium-Ion nebeneinander gebildet. Es ist nicht schwierig, sich die Bildung von C-2 bzw. C-3 oxygenierten Monoterpenen nebeneinander zu denken.

In der vorliegenden Arbeit wird die Bildung von Limonen und Carvon im Kümmel (*Carum carvi*) in verschiedenen Entwicklungsstadien der Früchte durch Applikationsversuche mit $^{14}\text{CO}_2$ untersucht.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

$^{14}\text{CO}_2$ wurde an Pflanzen von 4 verschiedenen Entwicklungsstadien verfüttert. Zu jedem Versuch wurden 2 mal 5 Pflanzen benutzt.

1. *Entwicklungsstadium.* $^{14}\text{CO}_2$ wurde an Pflanzen gegeben, in denen die Früchte beim Beginn der Versuche in Entwicklungsstadien II–III waren (junge Pflanzen). In 2–5 Wochen hatten sich die Früchte so entwickelt, dass bei der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Terpenkomponenten der Früchte diese die Entwicklungsstadien IV–VII aufwiesen.

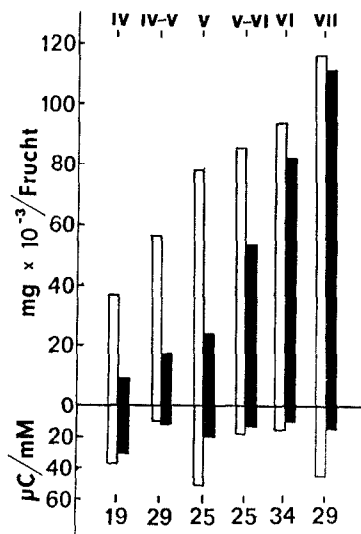


ABB. 1. SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN UND ABSOLUTE LIMONEN BZW. CARVONMENGEN IN JUNGEN PFLANZEN NACH VERSCHIEDEN LANGEN ^{14}C -STOFFWECHSEL-PERIODEN (IN TAGEN AUSGEDRUCKT).

Weiss = Limonen, Schwarz = Carvon.

⁶ M. VON SCHANTZ, *Farm. Aikak.* **76**, 265 (1967).

⁷ M. VON SCHANTZ und R. NORRI, *Sci. Pharm.* **36**, 187 (1968).

Tabelle 1 zeigt die gefundenen spezifischen Aktivitäten von Limonen und Carvon in Früchten von jungen Pflanzen als Funktion der Entwicklungsstadien der Früchte, sowie die absoluten Limonen- und Carvonmengen in den Früchten jedes Entwicklungsstadiums.

Man sieht (Abb. 1) dass die spezifische Aktivität des Limonens praktisch in jedem Entwicklungsstadium grösser als die des Carvons ist, was auch beweist, dass während der Entwicklung aus den Blüten und jungen Früchten (II–III) bis in die Stadien IV–VII hauptsächlich Limonen synthetisiert wird. Der Metabolismus ist verhältnismässig langsam. In den jüngsten Entwicklungsstadien (IV) erreicht die Aktivität des Limonens nach einer ^{14}C -Stoffwechselperiode von 19 Tagen nur den Wert $38 \mu\text{C}/\text{mM}$, also weniger als in den Entwicklungsstadien V und VII. Während der weiter verlaufenden Metabolisierung wird das in die Sekretbehälter ausgeschiedene aktive Limonen bzw. Carvon durch inaktives Material verdünnt, da die gebildeten aktiven Vorstufen schon verbraucht sind. ^{14}C wird nur zu einem verhältnismässig kleinen Anteil in die sich langsam entwickelnden Früchte eingebaut (Tabelle 1, IV, IV–V). Die Aktivitäten sind also nach 29 Tagen kleiner als nach 19 Tagen.

In die schneller entwickelten Früchte der jungen Pflanzen (beim Beginn Stadium III, nach Metabolismus V–VII) wird mehr ^{14}C eingebaut und die Limonenbildung ist lebhafter. Dieselbe Tendenz, dass die spezifischen Aktivitäten durch Verbrauch der aktiven Vorstufen während der weiter verlaufenden Metabolisierung kleiner werden, erscheint auch bei den sich weiter entwickelten Früchten.

2. *Entwicklungsstadium.* $^{14}\text{CO}_2$ wurde an Pflanzen gegeben, an denen sich die Früchte beim Beginn des Versuches in den Entwicklungsstadien III–V befanden. In 5–11 Tagen

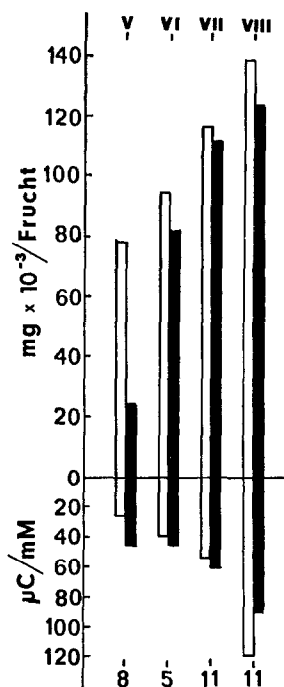
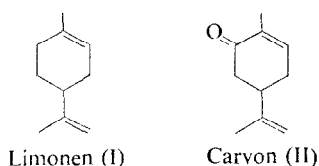


ABB. 2. SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN UND ABSOLUTEN LIMONEN BZW. CARVONMENGEN IN ÄLTEREN PFLANZEN NACH VERSCHIEDEN LANGEN ^{14}C -STOFFWECHSELPERIODEN (IN TAGEN AUSGEDRUCKT).

Weiss = Limonen, Schwarz = Carvon.

hatten sich die Pflanzen so entwickelt, dass bei der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Terpenkomponenten der Früchte diese die Entwicklungsstadien V–VIII (Tabelle 1) aufwiesen. Der ^{14}C -Stoffwechsel verläuft also hier viel rascher als bei den jungen Pflanzen.

Bei der Fütterung sind die Pflanzen so weit entwickelt, dass viel mehr Limonen als Carvon in den Früchten vorhanden ist (Abb. 2). Wenn also Carvon aus $^{14}\text{CO}_2$ synthetisiert wird steigt die spezifische Aktivität des Carvons schnell an (V–VII). Die schon vorhandene kleine Carvonmenge verhindert nur wenig die Steigerung der spezifischen Aktivität.



Die am wenigsten entwickelten Früchte weisen grossen Limonengehalt auf. Während der Stoffwechselperiode wird also noch viel Limonen synthetisiert, aber auch wenn die Vorstufen stark markiert sind, steigt die spezifische Aktivität des Limonens nur langsam an, da schon viel inaktives Limonen vorliegt. Darum sind die spezifischen Aktivitäten in V–VII beim Carvon grösser als beim Limonen.

Die am weitesten entwickelten Früchte sind bei der Fütterung und Höchstkonzentration der aktiven Präkursoren im Stadium V gewesen, bei der Messung der Aktivitäten aber vorwiegend im Stadium VIII. Eine rege Carvonbildung hat also erst nach dem Verbrauch der aktiven Präkursoren angefangen, was auch dadurch zu sehen ist, dass VIII das umgekehrte Aktivitätsverhältnis von Limonen und Carvon aufweist.

Das Entwicklungsstadium, bei dem die Carvonbiosynthese die des Limonens überholt, kann für die Früchte der Entwicklungsstadien V–VI festgelegt werden, also wenn die Früchte sich zu bräunen beginnen.

3. *Entwicklungsstadium.* $^{14}\text{CO}_2$ wurde an Pflanzen verfüttert in denen die Früchte in den Entwicklungsstadien V–VI waren.

4. *Entwicklungsstadium.* $^{14}\text{CO}_2$ wurde an Pflanzen verfüttert in denen die Früchte in den Entwicklungsstadien VI–VIII waren.

Weder in Gruppe 3 noch in Gruppe 4 wurde im Öl der Früchte Radioaktivität gefunden. Die Entwicklung der Pflanzen ist also so weit vorgeschritten, dass ^{14}C aus $^{14}\text{CO}_2$ kaum mehr in die Terpene eingebaut wird. Oben wurde nachgewiesen, dass in Früchten der Stadien V–VIII noch eine lebhaft Terpenbildung stattfindet. Es muss dabei aber beachtet werden, dass sich anabolische Stoffwechselvorgänge in den Früchten viel länger fortsetzen können als in den Blättern, wo die Präkursoren schon frühzeitig gebildet werden. Wenn also $^{14}\text{CO}_2$ an Pflanzen gegeben wird, deren Früchte sich noch nicht zu bräunen angefangen haben, wird das $^{14}\text{CO}_2$ in die Terpene solange eingebaut bis die Früchte das Stadium VIII erreicht haben. Zugabe von $^{14}\text{CO}_2$ in späteren Entwicklungsstadien führt nicht mehr zu markierten Vorstufen der Terpenbiosynthese. Auch in diesen späten Entwicklungsstadien waren die Blätter noch grün aber wahrscheinlich war der Assimilationsvorgang schon so abgeschwächt, dass nicht genug $^{14}\text{CO}_2$ aufgenommen wurde, um die Bildung der für die Terpenbildung erforderlichen Vorstufen zu ermöglichen. Auch könnte man an eine CO_2 -Assimilation der grünen chlorophyllhaltigen Früchte unabhängig von dem Assimilations-

TABELLE 1

Entwicklungsstadium		¹⁴ C-Metabolisierungszeit in Tagen	Pro Frucht*			Spez. Aktivität μc/mM	
Beim Beginn der ¹⁴ CO ₂ Assimilation	Bei Aktivitätsmessung		Ölmenge × 10 ⁻³ mg	Limonen × 10 ⁻³ mg	Carvon × 10 ⁻³ mg	Limonen	Carvon
II-III	IV	19	51	37	9	37	31
	IV-V	29	78	56	17	9	11
	V	25	106	78	24	53	19
	V-VI	25	145	86	53	18	13
	VI	34	187	94	82	15	9
	VII	29	234	116	111	45	14
III-V	V	8	106	78	24	26	46
	VI	5	187	94	82	39	45
	VII	11	234	116	111	54	61
	VIII	11	265	138	123	119	90

* Die Ölmengen pro Frucht sind mittels der Stahlschen Methode bestimmt.⁹

vorgang in den Blättern denken, wobei dieser Vorgang mit dem Abbau des Chlorophylls bei der Fruchtreife beendet wird.

Weiter muss die Frage diskutiert werden, ob Carvon aus Limonen gebildet wird, oder ob die Bildungswege verschieden sind.

Früher haben von Schantz und Ek⁸ durch Studien von Veränderungen der absoluten Mengenverhältnisse von Carvon und Limonen während der Entwicklung der Kümmelpflanze gefunden, dass schon in die Sekreträume ausgeschiedenes Limonen nicht Ausgangsmaterial für die Carvonbiosynthese werden kann. Diese Befunde werden weiter durch unsere Untersuchungen gestützt (Tabelle 1). Betrachtet man, das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von Carvon und Limonen, findet man, dass die jungen Pflanzen den Höchstwert dieses Verhältnisses (1,2) in den Früchten der Entwicklungsstadien IV–V aufweisen und bei höheren Entwicklungsstadien dieser Quotient wieder absinkt. In älteren Pflanzen haben schon die jüngsten Früchte dasselbe Stadium V erreicht und so auch den Höchstwert (1,8) dieses Verhältnisses. Der Quotient sinkt wieder mit dem Altern der Früchte. Wenn Carvon aus Limonen synthetisiert würde, könnte der Quotient $\mu\text{C}/\text{mM}$ Carvon/ $\mu\text{C}/\text{mM}$ Limonen den Wert 1 erst dann überschreiten, wenn die aktiven Vorstufen verbraucht sind und inaktives Limonen wieder reichlich synthetisiert wird. Unsere Versuche zeigen aber, dass dieser Quotient seinen Höchstwert schon in den jungen Früchten erreicht, wenn $^{14}\text{CO}_2$ an jüngere und ältere Pflanzen gegeben wird. Carvon kann also nicht aus schon ausgeschiedenem Limonen gebildet werden, sondern muss direkt von einer gemeinsamen Vorstufe in der lebenden Zelle ausgehen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Kümmelpflanzen wurden für die Fütterungsversuche mit $^{14}\text{CO}_2$ am Nachmittag eingesammelt, wobei darauf geachtet wurde, dass möglichst gleichwertige Pflanzen aus einer Anzucht genommen wurden. Sie wurden 6 Stunden im Dunkelraum aufbewahrt und dann im Dunklen zu je 5 Stück in 50 Liter fassende Glasbehälter mit dicht schliessenden und mit Scheidetrichter versehenen Glasdeckeln gebracht. Durch den Scheidetrichter wurde 10 Prozentige H_2SO_4 in ein im Behälter befindliches Reagenzglas mit einer wässrigen $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ Lösung (The Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, Spezifische Aktivität 20 mc/mM) eingetropft, wobei je 500 μC $^{14}\text{CO}_2$ für 5 Pflanzen verwendet wurden. Die Behälter wurden noch einige Stunden bis zum frühen Morgen im Schatten gehalten, wurden dann für 5 Stunden dem Sonnenschein

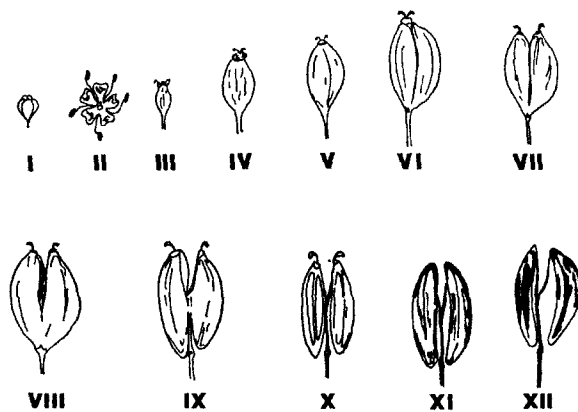


ABB. 3. UNTERSUCHTE ENTWICKLUNGSSTADIEN DER FRÜCHTE.

⁸ M. VON SCHANTZ und B. EK, *Sci. Pharm.* im Druck (1971).

ausgesetzt und danach wieder in Halbschatten gebracht und dort belassen. Da durch Dissimilation ein Teil des $^{14}\text{CO}_2$ während der Nacht verschwinden könnte, wurden die Behälter erst am folgenden Morgen nach nochmals 5 stündiger Bestrahlung im Sonnenschein geöffnet. Danach wurden die Pflanzen in grossen Plastiktöpfen mit Humus eingepflanzt und dem Tageslicht, unter Vermeiden von direktem Sonnenschein, ausgesetzt. Abbildung 3 zeigt die untersuchten Entwicklungsstadien der Früchte.

Die Proben für die gaschromatographische Analyse wurden abends entnommen wobei das Frischgewicht 1–3 g betrug. Jede Probe bestand aus 5–10 Döldchen. Nach Zerkleinerung mit einem Ultra-Turrax Homogenisator und Destillation mit dem Karlsruher-Gerät⁹ wurde das ätherische Öl in Pentan aufgenommen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Destillation des Pentanüberschusses wurde der Rückstand in einen Perkin-Elmer F 11 Gaschromatographen eingespritzt, der mit einem Flammenionisationsdetektor versehen war. Die Peaks wurden mit einem mit Kienzle D 14 E Digitaldrucker versehenen automatischen Peak-Integrator Perkin-Elmer D 24 ausgewertet. Aus dem Gaschromatographen wurden die Terpene in ein Perkin-Elmer RGC 170 Gerät eingeleitet, wo sie über glühendes CuO in CO_2 übergeführt wurden. Die Radioaktivität wurde mit einem Methanzusatz von 17 ml/Min in einem 10 ml Berthold Durchfluss-Proportionalzahlrohr mit angeschlossenem Berthold Strahlenmessplatz LB 2410 gemessen und mit einem zweiten Schreiber Hitachi-Perkin-Elmer 159 registriert.

Es wurden Füllkörperkolonnen von 2 m Länge und $1/8$ " innerem Durchmesser mit 15 Prozent Carbowax 1540 auf Chromosorb W, 60–80 Mesh verwendet. Trägergas war Helium, der Gasfluss 32 ml/Min, die Injektortemperatur 270° . Nach dem Einspritzen der Probe wurde der Kolonnenofen 1 Min lang bei 80° gehalten und danach auf $5^\circ/\text{Min}$ bis 160° programmiert.

Wegen der kurzen Messzeit der Radioaktivität beim radiogaschromatographischen Verfahren werden die statistischen Messfehler relativ gross. Bei 5 oder mehr Analysen einer Probe betrug die mittlere Abweichung des Mittelwertes 1,8 Prozent wenn die per Peak registrierte Impulszahl über 200 war, und 4 Prozent wenn die per Peak registrierte Impulszahl 150–200 war. Deshalb sind die spezifischen Aktivitäten $\mu\text{C}/\text{mM}$ als ganze Zahlen ohne Dezimalen angegeben worden.

Die Abweichungen innerhalb der Parallelversuche sind dadurch grosstenteils kompensiert, dass jede Probe aus Früchten von zwei Pflanzen von zwei parallelen Serien, also insgesamt von 4 Pflanzen besteht.

Folgende Entwicklungsstadien der Früchte wurden untersucht (Abb. 3.):

- (I) Noch nicht entfaltete, weisslich violette Blütenknospen, ϕ etwa 1 mm.
- (II) Entfaltete Blüten, ϕ 1,5–2,5 mm.
- (III) Junge hellgrüne Früchte, Spalte noch nicht wahrnehmbar. Länge 0,5–1,5 mm, ϕ etwa 0,5 mm.
- (IV) Junge hellgrüne Früchte, zeigen schon anfängliche Zeichen der Spaltenbildung. Länge 1,5–3 mm, ϕ 1,0–1,5 mm.
- (V) Hellgrüne Früchte, Spalte deutlich aber noch geschlossen. Länge 1,5–3,5 mm, ϕ 1,0–1,5 mm.
- (VI) Hellgrüne Früchte aber Tälchen schon bräunlich. Spalte öffnet sich. Länge 2,0–4,0 mm, ϕ 1,0–2,5 mm.
- (VII) Hellgrüne Früchte, Tälchen bräunlich. Spalte bis zu $1/3$ offen. Länge 3,0–4,0 mm, ϕ 2,0–2,5 mm.
- (VIII) Tälchen bräunlich, Rippen noch hellgrün. Bis zur Hälfte gespalten. Länge 3,0–5,0 mm, ϕ 2,5–3,0 mm.
- (IX) Tälchen rötlich braun, Rippen noch grün, bis zur Hälfte gespalten. Länge 3,0–5,0 mm, ϕ 2,5–3,0 mm.
- (X) Frucht ganz gespalten, die Spaltfrüchte hängen am Karpophor. Tälchen braun, Rippen blassgelb. Länge 3,5–5,0 mm, ϕ etwa 2,5–3,0 mm.
- (XI) Frucht ganz gespalten, die Spaltfrüchte hängen am Karpophor. Tälchen dunkelbraun, Rippen blassgelbgrünlich. Länge 3,5–5,0 mm, ϕ etwa 2,5–3,0 mm.
- (XII) Wie XI (Reife Früchte).

⁹ E. STAHL, *Mikrochem.* **40**, 367 (1953).