

Vergleichende Untersuchungen zur Bildung und Akkumulation von ätherischem Öl in der intakten Pflanze und in Zellkulturen von *Pimpinella anisum* L.

Comparative Studies on the Production and Accumulation of Essential Oil in the Whole Plant and in the Cell Culture of *Pimpinella anisum* L.

J. Reichling, H. Becker, R. Martin und G. Burkhardt

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, 6900 Heidelberg 1

Z. Naturforsch. **40c**, 465–468 (1985); received March 22/April 30, 1985

Pimpinella anisum, Plant Cell Culture, Essential Oil, Phenylpropanoids

Comparative studies on the essential oil of the whole plant and callus- and suspension cultures of *Pimpinella anisum* L. were carried out. Both the whole organism and the cell cultures were shown for the first time to be similar in their constituents e.g. anethole, pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrate), epoxy-pseudoisoeugenol-(2-methyl-butyrat) and β-bisabolene. In difference to the plant, the callus-culture contained myristicin.

Einleitung

Nur wenige pflanzliche Zellkulturen sind in der Lage, wasser dampfflüchtige ätherische Öle in nennenswerter Menge und in einem der ganzen Pflanze vergleichbaren Spektrum zu bilden [1–4]. In Kalluskulturen von *Pimpinella anisum* konnte bisher kein ätherisches Öl nachgewiesen werden, das in seinem Komponentenspektrum dem aus der ganzen Pflanze vergleichbar gewesen wäre. Erst nach eingeleiteter Organogenese wurde im Wasserdampfdestillat der Kalluskultur ein nicht näher charakterisierter Sesquiterpenkohlenwasserstoff gefunden, der auch im ätherischen Öl der Frucht, des Sprosses und der Wurzel vorlag. Der Hauptbestandteil des Fruchtoils, das Anethol, wurde auch dann nur in Spuren gebildet [5]. Bei Anwendung eines Zweiphasensystems [6] auf undifferenzierte Suspensionskulturen von *Pimpinella anisum* konnten wir erstmals Anethol nachweisen [7]. Dieses überraschende Ergebnis hat uns veranlaßt, eine neuerliche vergleichende Studie über die Bildung von flüchtigen Sekundärstoffen in Pflanzen und Zellkulturen von *Pimpinella anisum* durchzuführen.

Ergebnisse und Diskussion

Ätherisches Öl in Frucht, Sproß und Wurzel

Im ätherischen Öl der Anisfrüchte kommen neben Phenylpropanoiden auch Sesquiterpene und Monoterpane vor [8–10]. Im ätherischen Öl von Sproß und Wurzel konnte Becker [11] Anethol, Anisaldehyd und einen nicht näher bezeichneten Sesquiterpenkohlenwasserstoff identifizieren. Wir konnten zusätzlich durch GC- und MS-Vergleich mit authentischen Substanzen die bekannten Phenylpropanoide Methylchavicol und Pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat)* nachweisen (vgl. Tab. I).

Das von Harbone *et al.* [12] im Fruchtoil identifizierte Myristicin konnten wir bisher nicht auffinden. Dagegen gelang erstmals der Nachweis von Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methyl-butyrat) im ätherischen Öl von Wurzel, Sproß und Frucht des Anis; diese Verbindung entdeckten wir erst kürzlich im ätherischen Öl von Radix Pimpinellae und konnten dessen Struktur aufklären [13, 14]. Die spektroskopischen Daten (MS, ¹H-NMR) des aus Herba Anisi und aus Radix Pimpinellae isolierten epoxidierten Phenylpropanoids waren identisch. Diese Verbindung stellt die Hauptsubstanz im ätherischen Öl der Wurzel (64%) dar; im ätherischen Öl des Sprosses ist sie zu ca. 25% enthalten und in der Frucht findet man sie nur in Spuren (0,5%). Im ätherischen Öl von Frucht,

Sonderdruckanforderungen an Dr. Jürgen Reichling.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/85/0700-0465 \$ 01.30/0

* Wir danken Herrn Prof. Dr. K. H. Kubeczka, Univ. Würzburg, für die Überlassung der Originalsubstanz.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I: Verteilung der Phenylpropanoide und des β -Bisabolen in Pflanzen und Zellkulturen von *Pimpinella anisum*.

1: Anethol; 2: Methylchavicol; 3: Pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat); 4: Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat); 5: Myristicin; 6: β -Bisabolen.

Die Zahlenangaben bedeuten: Peakflächenprozent (%) gaschromatographisch ermittelt nach der 100%-Methode.

Verbindungen	Frucht	Sproß	Wurzel	Kalluskultur	Submerskultur
1 	92	50	4.9	60	— **
2 	3.2	1.5	0.05	—	—
3 	2.7	16.2	4.8	0.4	0.5
4 	0.5	25	63.5	17	0.2
5 	— *	—	—	4	—
6 	Spuren	6.2	15.5	8	1.5

* von Harborne nachgewiesen. Lit. [12].

** in einer früheren Arbeit identifiziert. Lit. [7].

Sproß und Wurzel konnten zusätzlich an Sesquiterpenkohlenwasserstoffen das schon bekannte γ -Himachalen [10] und erstmals β -Bisabolen nachgewiesen werden.

Kallus- und Suspensionskultur

Wachstum und Habitus: Die Kalluskultur besteht aus relativ weichen, hellgrünen Zellaggregaten und wächst als habituierte Kultur mit einer Generationszeit von ca. 8–10 Tagen während der mittleren Wachstumsphase. Nach 34 Tagen werden Teile der Kultur auf frisches Nährmedium übertragen. Die Suspensionskultur wurde vor ca. 1 Jahr aus dieser Kalluskultur angelegt. Sie hat eine Generationszeit von

ca. 6–7 Tagen; die Passagenzeit beträgt 24 Tage. In beiden Zellkulturen konnten tracheidale Strukturen nachgewiesen werden; dagegen wurden niemals Ölbehälter im Gewebe beobachtet. Die Kalluskultur neigt manchmal zur Differenzierung von kleinen blattähnlichen Strukturen.

Bildung und Zusammensetzung des ätherischen Öls der Zellkulturen

Die Bildung und Zusammensetzung des ätherischen Öls in der Oberflächen- und Suspensionskultur des Anis wurde über drei Passagen verfolgt. In beiden Kulturen wurden in den ersten 15 Tagen einer Passage das meiste ätherische Öl, bezogen auf den Zellzuwachs, akkumuliert. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten sich die Zellen nur geringfügig vermehrt. Erst danach nahm die Zellmasse zu, ohne daß die Bildung an wasserdampfflüchtigen Substanzen in gleichem Maße gefördert wurde. Die Kalluskultur erreichte mit durchschnittlich 3–4 mg ätherischem Öl/100 g Frischgewicht einen wesentlich höheren Ölgehalt als die entsprechende Suspensionskultur (1–2 mg ätherischem Öl/100 g Frischgewicht).

Durch DC-, GC- und MS-Vergleich konnten im ätherischen Öl der Suspensionskultur Pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat), Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat) und β -Bisabolen und in der Kalluskultur zusätzlich noch Anethol und Myristicin eindeutig nachgewiesen werden (vgl. Tab. I). Die Identität von Myristicin wurde durch die Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums und durch ein anschließend ausgeführtes NOE-Experiment abgesichert.

Setzte man der Suspensionskultur zusätzlich das Triglyceridgemisch „Miglyol“ als zweite Phase [7] zu, dann fand man in diesem lipophilen Akkumulationsraum in Spuren Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat) und β -Bisabolen. Anethol konnte im Miglyol nicht wieder nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser und der schon zitierten Arbeit [7] haben zum erstenmal gezeigt, daß in Kallus- und Suspensionskulturen von *Pimpinella anisum* wasserdampfflüchtige Substanzen gebildet werden können, die man auch in der ganzen Pflanze finden kann. Während Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat) und β -Bisabolen zur Grundausrüstung der ätherischen Öle beider Zellkulturtypen gehören, gilt dies für Anethol, Myristicin und Pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat) nicht; man findet diese Substanzen nur in sehr unregelmäßigen Zeitabständen und

in stark wechselnden Mengen im ätherischen Öl dieser Zellkulturen. Eine befriedigende Erklärung für dieses Phänomen kann derzeit noch nicht gegeben werden; ähnliche Phänomene beobachtete man auch bei anderen Zellkulturen mit anderen Substanzklassen [4, 15]. Daß in der Anis-Kalluskultur Myristicin nachgewiesen werden konnte, war überraschend. In der Literatur gibt es nur von Harborne *et al.* [12] einen Hinweis darauf, daß Myristicin im ätherischen Öl der Anisfrucht vorliegen soll. Bisher konnten wir dieses Ergebnis noch nicht bestätigen. Hier könnte nur eine systematische Untersuchung verschiedener Aniskultivars weiterhelfen.

Die im Anis und in der Bibernellwurzel in relativ großen Mengen vorliegenden Pseudoisoeugenolderivate passen aufgrund ihres Substitutionsmuster am Phenylring derzeit noch nicht in die üblichen Vorstellungen, die man sich von der Biosynthese dieser Stoffklasse macht. Da dieser Substanztyp sowohl in der Anis-Suspensionskultur (0,01–0,1 mg/100 g Frischgewicht) als auch in der Anis-Kalluskultur (0,1–0,8 mg/100 g Frischgewicht) regelmäßig gebildet wird, könnte man die Zellkulturen bei der Aufklärung des möglicherweise neuen Biosyntheseweges dieser Substanzen einsetzen.

Material und Methoden

Herkunft und Aufzucht der Anispflanzen

Die Früchte von *Pimpinella anisum* wurden von der Fa. Müggenburg, Hamburg, bezogen (Type: 06913). Ein Teil der Früchte wurde Anfang Juni (1984) im Botanischen Garten Heidelberg ausgesät und die noch nicht blühenden Pflanzen im Juli/August geerntet. Die Pflanzen (ca. 10 cm groß) wurden dann in Sproß und Wurzel getrennt und separat aufgearbeitet.

Anlage der Kallus- und Suspensionskulturen

Die Kalluskultur wurde vor 18 Jahren von Becker [5] aus steril angezogenen Keimpflanzen von *Pimpinella anisum* angelegt. Die Suspensionskultur wurde von uns vor ca. 1 Jahr aus dieser Kalluskultur etabliert.

Kultivierungsbedingungen

Beide Zellkulturen sind habituiert, d. h. sie wachsen ohne Phytohormone auf einem veränderten Nährmedium (pH 5) nach Murashige und Skoog [16]

mit 30 g/l Saccharose. Kultiviert wurde in 200 ml Erlenmeyerkolben, mit 50 ml Nährmedium bei Dauerlicht (1500 Lux) und bei 26 °C; die Suspensionskultur wurde auf einem Schüttler (Pilot Shake, System Kühner) mit einer Drehzahl von 110 U/min bewegt.

Wachstum der Kulturen

Bei der Erstellung der Wachstumskurven wurden in fünftägigen Abständen jeweils fünf Kolben abgeerntet, das Gewebe ausgewogen und dann einer Wasserdampfdestillation unterzogen; der Zuwachs wurde als Wachstumsquotient „Q“ (= Gewicht zum Erntezeitpunkt/Ausgangsgewicht der Zellen) ausgedrückt.

Bestimmung des ätherischen Öls

Frische, grob zerkleinerte Kallusstückchen (40 g) bzw. Pflanzenteile (50 g) wurden mit 250 ml Wasser (pH 6,5) in einem 1000 ml Rundkolben 3 Std. lang in einer Karlsruher Apparatur der Wasserdampfdestillation unterzogen [17]: Heizquelle: PILZ-Heizhaube 300 Watt, Schalterstellung II; Vorlage 2 ml *n*-Hexan; das ätherische Öl wurde gravimetrisch bestimmt, indem bis zur Gewichtskonstanz vorsichtig im Stickstoffstrom eingeengt wurde.

Gaschromatographie

Gaschromatograph 433 von Packard Instrument; Säule: OV 101 fused silica Kapillarsäule, 25 m Länge; N₂-Druck: 1,5 bar (ca. 3 ml N₂/min); Temperaturprogramm: 140 °C, 2 min isotherm nach Injektion, dann 5 °C/min; Injektor: 210 °C; Detektor: 250 °C; Vorschub: 0,5 cm/min. Die Einzelsubstanzen wurden nach der 100%-Methode quantitativ erfaßt.

Isolierung der Phenylpropanoide aus dem ätherischen Öl

Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat): Aus Sprossen von *P. anisum* (1 kg Frischgewicht) 90 mg, aus der Kalluskultur (0,5 kg Frischgewicht) 2 mg. Zur Isolierung vgl. Lit. [14].

Myristicin: 5 mg aus drei Muskatnüssen, 3 mg aus der Kalluskultur. Säule LiChrospher RP-18, 5 µm, 10 × 250 mm (Merck); Fließmittel: 76% MeOH; Durchfluß: 1,2 ml/min; Detektor: 278 nm; Empfindlichkeit: 0,04.

Als weitere authentische Substanzen standen zur Verfügung: Anethol und Methylchavicol (Fa. Roth,

KA); Pseudoisoeugenol-(2-methyl-butyrat); Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat) (durch Synthese, vgl. Lit. [14].

GC-MS-Kopplung

Massenspektrometer: Varian MAT 311; Elektronenquelle 100 eV; Gaschromatograph: Varian 3700; Säule: OV-101, 20 m Glaskapillare; GC-Bedingungen: s.o.

¹H-NMR- und Massen-Spektroskopie

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem Finnigen MAT 711 (Direkteinlaß); Elektronenquelle 100 eV; die ¹H-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker WM 250 in Deuterochloroform mit TMS als internem Standard aufgenommen.

MS-Daten der in den Zellkulturen nachgewiesenen Substanzen in der Form *m/z* (rel. Int.):

Anethol. MS: M⁺ = 148 (100), 133 (24), 117 (28), 105 (20), 91 (16), 77 (25), 65 (8), 51 (12); Lit. [18].

Myristicin. MS: M⁺ = 192 (65), 177 (4), 165 (18), 161 (18), 147 (16), 133 (24), 119 (49), 91 (100); Lit. [18].

¹H-NMR δ (ppm): 3,3 (dq, *J* = 7 Hz, 1 Hz, H-1'), 3,89 (s, OMe), 5,93 (m, H-2'), 5,93 (s, Methylendioxi-Gruppe), 5–5,15 (m, drei Hauptlinien mit Unterstruktur), 6,35 (br s, H-6), 6,39 (br s, H-2). Nach Einstrahlung bei OMe zeigte sich im NOE-Differenzspektrum ausschließlich das Signal von H-6.

Epoxi-pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat); s. Lit. [14].

Pseudoisoeugenol-(2-methylbutyrat). MS: M⁺ = 248 (2), 164 (100), 149 (26), 135 (4), 121 (3), 91 (10), 72 (8), 57 (70). Lit. [19].

β-Bisabolen. MS: M⁺ = 204 (14), 189 (5), 161 (20), 133 (8), 119 (20), 93 (78), 91 (20), 69 (100). Lit. [18].

- [1] M. Nagel und E. Reinhard, *Planta Med.* **27**, 264 (1975).
- [2] E. Reinhard, G. Corduan und O. H. Volk, *Planta Med.* **1**, 8 (1968).
- [3] W. Schultze, G. Koch und F. C. Czygan, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **46**, 2264 (1983).
- [4] J. Reichling, W. Bisson und H. Becker, *Planta Med.* **4**, 285 (1984).
- [5] H. Becker, *Biochem. Physiol. Pflanzen* **161**, 425 (1970).
- [6] W. Bisson, R. Beiderbeck und J. Reichling, *Planta Med.* **47**, 164 (1983).
- [7] H. Becker, J. Reichling, W. Bisson und S. Herold, Tagungsbericht: Third European Congress on Biotechnology (München), Vol. I, S. 209; Verlag Chemie, Weinheim, Basel 1984.
- [8] H. Becker, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **111**, 41 (1971).
- [9] K. H. Kubeczka und J. Ullmann, *Biochemical Systematics and Ecology* **8**, 39 (1980).
- [10] R. Tabacchi, J. Carnero und P. Buil, *Helvet. Chim. Acta* **58**, 849 (1974).
- [11] H. Becker, Dissertation, Karlsruhe (1969).
- [12] J. B. Harborne, V. H. Heywood und Ch. A. Williams, *Phytochemistry* **8**, 1729 (1969).
- [13] J. Reichling, R. Martin und H. Becker, Inhaltsstoffe von Pimpinella-Arten, neuere Untersuchungsergebnisse; Vortrag auf dem VII. Arzneipflanzencolloquium Rauschholzhausen (20.–23.2.1985); s. Tagungsbericht.
- [14] R. Martin, J. Reichling und H. Becker, *Planta Med.* (im Druck).
- [15] B. Deus-Neumann und M. H. Zenk, *Planta Med.* **50**, 427 (1984).
- [16] T. Murashige und F. Skoog, *Physiol. Plant* **15**, 473 (1962).
- [17] E. Stahl, *Pharm. Ind.* **14**, 262 (1952).
- [18] E. Stenhammar, S. Abrahamsson und F. W. McLafferty, *Registry of Mass Spectral Data*, Vol. 1 + 2, John Wiley & Sons, New York (1974).
- [19] K.-H. Kubeczka, F. von Massow, V. Formacek und M. A. R. Smith, *Z. Naturforsch.* **31b**, 283 (1976).