

Untersuchungen über die Bildung des ätherischen Öls von *Matricaria chamomilla* L.

1. ^{14}C -Markierung der ätherischen Ölbestandteile

Biosynthesis of the Essential Oil by *Matricaria chamomilla*

1. ^{14}C -Labelling of the Substances of the Essential Oil

J. Hölzl

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre,
Universität München

C. Franz, D. Fritz

Institut für Gemüsebau der TU München-Weihenstephan

und

A. Vömel

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung,
Universität Gießen

(Z. Naturforsch. **30 c**, 853–854 [1975]; eingegangen
am 6. August 1975)

Essential Oil, Sesquiterpens

By injecting $[1-^{14}\text{C}]$ acetate into the flowers of *Matricaria chamomilla* L. up to two percent were incorporated in the essential oil. The highest labelling was analysed in the en-in-dicycloether, a hydrocarbon and in an unknown polar compound after 12 days incorporation time. The hydrocarbon and the polar compound may be precursors for the other compounds in the essential oil.

Das ätherische Öl von *Matricaria chamomilla* enthält zwei Substanzgruppen, die Sesquiterpene und die Polyenverbindungen. Bisher wurde die Struktur von 7 Sesquiterpenen aufgeklärt; wichtige Verbindungen sind das Chamazulen¹, und die Bisaboloide Bisabolol², Bisabololoxid A und B³ und das Bisabolonoxid⁴. Aus der Gruppe der Polyenverbindungen sind zwei Substanzen identifiziert, der *cis*- und *trans*-En-In-Dicycloäther⁵. Die Polyenverbindungen, die vor allem im Blütenboden lokalisiert sind, entstehen aus Fettsäuren, sie sind deshalb biogenetisch nicht mit den Sesquiterpenen verwandt. Der *cis*-En-In-Dicycloäther ist photochemisch in die *trans*-Form umwandelbar, ob diese Reaktion in der Pflanze Bedeutung hat, ist nicht geklärt.

Über die Biogenese der Bisaboloide liegen noch keine Untersuchungen vor; das Bisabololoxid A soll aus dem Bisabolol durch Epoxidierung, Umlagerung und anschließendem Ringschluß gebildet werden⁶. Das Bisabolonoxid kann *in vitro* durch Oxydation von Bisabololoxid A hergestellt werden⁷.

Die Untersuchungen über die Bildung des ätherischen Öls wurden mit der Erprobung optimaler Applikationsmethoden für markierte Precursoren und günstiger Inkubationszeiten begonnen. Die Methoden wurden anschließend durch die Bestimmung der Inkorporationsraten bewertet. Das $[^{14}\text{C}]$ Acetat wurde durch Einstellen von Blütenständen in die Lösung und durch Injektion der Lösung in den Hohlraum des Blütenbodens appliziert. Die applizierte Radioaktivität betrug $10\ \mu\text{Ci}$ $[^{14}\text{C}]$ Acetat pro Blüte. Die Applikation erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten, a. 50% Röhrenblüten ausgeblüht (Entw.-Stad. XI⁸), b. 10% aufgeblüht (IX) und c. Röhrenblüten nicht ausgeblüht (VII). Die Blüten wurden a. 8, b. 12 und c. 16 Tage nach Applikation geerntet, nachdem alle Röhrenblüten entfaltet waren. Die Röhrenblüten wurden von Zungenblüten und dem Blütenboden getrennt und aus beiden Anteilen durch eine Wasserdampfdestillation das ätherische Öl abgetrennt. Das ätherische Öl von 10 Blüten wurde in 0,50 ml einer 0,05-prozentigen Laurinsäuremethylester-Lösung in Benzol gelöst. Die Radioaktivität der verschiedenen Komponenten wurde nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung auf Kieselgel F₂₅₄-Fertigplatten (Merck, Darmstadt) mit dem Fließmittel Benzol-Äthylacetat 95:5 gemessen. Zur Auftrennung der Kohlenwasserstoffe wurde in zweiter Richtung mit dem Fließmittel Heptan-Diäthylamin 98:2 chromatographiert. Bisabololoxid A und B, die nach diesen Verfahren die gleichen R_F -Werte hatten, konnten erstmals auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ silanisiert, (Merck, Darmstadt) mit dem Fließmittel Benzol-Essigsäure 50:0,1 separiert werden (R_F von Bisabololoxid A 0,40, B 0,30). Zur Lokalisation der Radioaktivität wurde von jedem Dünnsschichtchromatogramm mit einem Röntgenfilm Structurix D 10 (Agfa-Gaevert, Belgien) ein Autoradiogramm angefertigt. Die Radioaktivitätsmessung der Einzelkomponenten erfolgte nach Transferierung der Kieselgelzonen in Meßgläser mit der Szintillatorflüssigkeit DIMILUME (Fa. Packard, Illinois, USA). Die quantitative Zusammensetzung der ätherischen Öle wurde gaschromatographisch ermittelt⁹, anstelle der UCCW-Säule wurde als stationäre Phase 3% OV-1 auf Gas-Chrom Q (Serva, Heidelberg) verwendet. Damit war auch Bisabolol von Bisabolonoxid zu trennen.

Durch die Applikation des $[^{14}\text{C}]$ Acetats in den Blütenbodenhohlraum wurde eine Einbaurrate in die Bestandteile des ätherischen Öls von *Chamomilla* bis nahezu 2% erzielt. Bei Zuführung des Acetats über den Stengel wurden vergleichsweise nur 0,015% der Radioaktivität eingebaut. Nach der Injektion in den Blütenbodenhohlraum muß der Precursor nicht über

Sonderdruckanforderung an Dr. J. Hölzl, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, D-8000 München 2, Karlstraße 29.

Tabelle. Zusammensetzung, Gesamtkorporationsrate und Radioaktivitätsverteilung bei *Chamomilla*-Öl.

Einbauzeit [d]	8 a	12 b Röhrenblüten	16 c	8 a	12 b Blütenboden und Zungenblüten	16 c
Gesamteinbaurate [%]	0,42	0,50	0,47	0,68	1,36	0,77
	% * Rad.-Verteilung			% Rad.-Verteilung		
Farnesen	2	—	—	0	—	—
Substan X **	1	16,6	26,6	3,2	15,6	11,2
Chamazulen	9	6,7	3,5	0	0	0
Bisabololoxid A	23	8,9	5,8	9	—	—
Bisabololoxid B	26	8,9	16,2	6	3,5	2,2
Bisabolonoxid	18	9,6	8,8	2	—	—
cis-EID	10	3,5	5,6	64	67,4	64,4
trans-EID	0	0	0	16	9,1	9,5
Substan Y ***	2	45,7	33,3	2	16,3	12,6

Pro Blüte wurden 10 μCi [$1-^{14}\text{C}$] Acetat in 5 μl Wasser appliziert.

* Die prozentuale Zusammensetzung entspricht etwa dem Typ B¹⁰.

** Substanz X Kohlenwasserstoff $R_f = 0,95$ auf Kieselgel in Benzol–Äthylacetat 95 : 5; rel. Retentionszeit 0,2 (Bisabolol = 1).

*** Substanz Y $R_f = 0,28$ silan. Kieselgel in Benzol–Essigsäure 50 : 0,1; rel. Retentionszeit 1,93 (Bisabolol = 1).

Gefäße transportiert werden, sondern kann unmittelbar zum Biosyntheseort penetrieren. Die hohe Einbaurate basiert weiterhin auf dem Zeitpunkt der Injektion; zwischen Applikation und Erntezeitpunkt nimmt die absolute Konzentration des ätherischen Öls pro Blüte zwischen 25 und 100% zu; dabei kann ein markierter Precursor optimal metabolisiert werden.

Die Einbaurate in das ätherische Öl der Röhrenblüten lag zwischen 0,4 und 0,5%, mit einem Maximum nach 12 Tagen. Die geringen Unterschiede zwischen 12 und 16 Tagen lassen darauf schließen, daß in dieser Periode kein Öl mehr gebildet wird und die Biosynthese abgeschlossen scheint. Der Einbau in das Öl des Blütenbodens war bei den hier gewählten Inkubationszeiten höher als in das der Röhrenblüten mit größtem Unterschied nach 12 Tagen. Der starke Radioaktivitätsabfall zwischen 12 und 16 Tagen läßt auf einen hohen Stoffwechsel im Blütenboden schließen. Der Hauptanteil der ^{14}C -Radioaktivität im Öl des Blütenbodens war mit Werten von ca. 60–75% in den En-In-Dicycloäther enthalten. Bei den übrigen Verbindungen hatte die Substanz Y einen gleichbleibenden und hohen Einbau, dagegen zeigt die Markierung der Substanz X starke Abhängigkeit von der Einbauzeit.

Bei den Bestandteilen in den Röhrenblüten hatte Substanz Y nach 8 Tagen Einbau mit einem Wert von 45% bezogen auf Gesamteinbaurate die höchste

Markierung, nach 16 Tagen betrug die Radioaktivität nur 22%, zu den gleichen Zeitpunkten waren die Werte der Substanz X 16 bzw. 50%. Die Summe der Radioaktivität beider Substanzen ist mit ca. 60% nach 8 und 12 Tagen gleich, nach 16 Tagen stieg dieser Anteil auf 70%. Diese Zunahme steht im Zusammenhang mit der Radioaktivitätsminderung von Bisabololoxid B. Während von den übrigen Bisaboloiden das Bisabolonoxid eine Zunahme zwischen 12 und 16 Tagen zeigt, hat das Chamazulen ab erstem Erntezeitpunkt eine Abnahme.

Aus den vorliegenden ersten Untersuchungsergebnissen kann abgeleitet werden, daß die ätherischen Ölbestandteile im Blütenboden einem Metabolismus unterliegen, wobei die Stoffwechselprodukte offenbar nicht mehr in dieser Fraktion auftreten. In den Röhrenblüten dagegen dürften Sauerstoff-haftige Komponenten in Kohlenwasserstoff transformiert werden. Eine Sequenz bei der Entstehung der Bisaboloidverbindungen ist aus diesen Versuchen vorerst nicht abzulesen. Die Gesamtkorporation von [^{14}C] Acetat in das ätherische Öl ist mit nahezu 2% nach 12 Tagen Inkorporation so hoch, daß mit dieser Methode hoch markierte Sesquiterpene und En-In-Dicycloäther für weitere Untersuchungen präpariert werden können.

Der DFG danken wir für Unterstützung.

¹ E. Stahl, Chem. Ber. **87**, 202, 505, 1626 [1954].

² O. Isaac, H. Schneider u. H. Eggenschwiller, Dtsch. Apoth.-Ztg. **108**, 293 [1968].

³ V. Sampath, G. K. Trivedi, S. K. Paknikar u. S. C. Bhattacharyya, Indian J. Chem. **7**, 100, 1060 [1969].

⁴ J. Hölzl u. G. Demuth, Dtsch. Apoth.-Ztg. **113**, 671 [1973].

⁵ F. Bohlmann, Ch. Herbst, H. Arndt, H. Schönowsky u. H. Gleinig, Chem. Ber. **94**, 3193 [1961].

⁶ O. Isaac, Dtsch. Apoth.-Ztg. **114**, 255 [1974].

⁷ J. Hölzl u. G. Demuth, Planta med. **27**, 37 [1975].

⁸ M. v. Schantz u. R. Salonen, Sci. Pharm. **34**, 177 [1966].

⁹ H. Glasl, Pharm. Ind. **34**, 122 [1972].

¹⁰ H. Schilcher, Planta med. **23**, 132 [1973].