

Untersuchungen an Kalluskulturen von *Melissa officinalis* L., II

Über wasserdampfflüchtige Diterpenkohlenwasserstoffe in nicht differenzierten Oberflächenkulturen

Investigations on Callus Cultures of *Melissa officinalis* L., II

Volatile Diterpene Hydrocarbons in Not Differentiated Static Cultures

Isabella Koch-Heitzmann, Wulf Schultze und Franz-C. Czygan

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität, D-8700 Würzburg, Mittlerer Dallenbergweg 64

Z. Naturforsch. **40c**, 13–20 (1985); received August 13/October 15, 1984

Plant Tissue Culture, Volatile Diterpene Hydrocarbons, Combined Gas-Chromatography/Mass Spectrometry, *Melissa officinalis* L.

Dehydroabietane and an other diterpene hydrocarbon, being still unidentified, were found in the steam distillates of callus cultures of *Melissa officinalis*. The relative proportions of these two diterpenes changed considerably during the course of a cultivation passage. With advancing age of the cells they shifted gradually towards dehydroabietane. Cultures being exposed to continuous light showed the same composition of their steam distillates as cultures which were raised in the dark.

Einleitung

In einer früheren Arbeit untersuchten wir das Vorkommen flüchtiger Terpene in den Wasserdampfdestillaten von *Melissa officinalis*-Kalluskulturen [1]. Unter diesen befanden sich auch zwei Diterpenkohlenwasserstoffe (DTKW). Dies ist aus zwei Gründen besonders bemerkenswert:

- Zum einen sind bisher weder im ätherischen Öl, noch sonst in der Melissenpflanze Diterpene nachgewiesen worden, während über das Vorkommen von Mono- und Sesquiterpenen [2–4] sowie von Triterpenen [5–8] verschiedentlich berichtet wurde.
- Zum anderen existieren überhaupt nur wenige Arbeiten über Diterpene in Kallus- und Suspensionskulturen [vgl. 9, 10].

Es erschien uns deshalb von Interesse, diese DTKW des Melissenkallus näher zu untersuchen und den

Einfluß verschiedener Parameter, wie z. B. Phytohormone und Licht, sowie Kultur- und Passagendauer auf ihre Bildung zu studieren.

Die Anlage einer entdifferenzierten Kallusoberflächenkultur aus Blättern der oberen Wirtel einer *Melissa officinalis*-Pflanze haben wir kürzlich beschrieben [1]. Kalli dieser Kultur benutzten wir als Ausgangsmaterial für die folgenden Untersuchungen. Die bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen und mit verschiedenen Konzentrationen an Wuchsstoffen aufgezogenen Kulturen wurden jeweils der Wasserdampfdestillation unterworfen und die Destillate kapillargaschromatographisch und mittels GC/MS-Kopplung (MS in Nieder- und Hochauflösung) analysiert.

Ergebnisse

Zur massenspektrometrischen Identifizierung der Diterpene

In den Wasserdampfdestillaten aller Kulturen ließen sich zwei DTKW nachweisen. Ihre durch Hochauflösungsmassenspektrometrie (in der GC/MS-Kopplung) bestimmten Summenformeln betrug (mit einer Abweichung der Präzisionsmasse von 1,4 bzw. 2,4 mmu) $C_{20}H_{32}$ (MW 272) für Diterpen Nr. 1 und $C_{20}H_{30}$ (MW 270) für Diterpen Nr. 2 (be-

Abkürzungen: 2,4-D, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure; DTKW, Diterpenkohlenwasserstoff(e); EI, Elektronenstoßionisation; GC/MS, Gaschromatographie/Massenspektrometrie; *m/e*, Masse/Ladung; mmu, Millimasseneinheit; MW, Molekulargewicht.

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. Schultze.

0341-0382/85/0100-0013 \$ 01.30/0

züglich der Problematik und Anwendung der hochauflösenden MS in der GC/MS-Kopplung speziell bei der Analyse pflanzlicher Zellkulturen vgl. [11]). Die beiden Verbindungen besitzen demnach 5 bzw. 6 Doppelbindungsäquivalente.

Das Vorliegen von Kohlenwasserstoffen wird auch durch gc Daten untermauert; so kann schon auf Grund der Größe der Kovatsindexdifferenz (ΔI) auf den beiden Phasen WG 11 und SE 30 die Existenz einer polaren Funktion in beiden Diterpenmolekülen weitgehend ausgeschlossen werden. Diese Differenz beträgt für Diterpen Nr. 1 115,3 und für Diterpen Nr. 2 240,6 Indexeinheiten, das sind Werte in einer Größenordnung, wie sie bei derartigen Verbindungen etwa zu erwarten sind, wenn 2 oder 3 Doppelbindungen (evtl. als aromatisches System) im Molekül vorliegen.

Das EI-Massenspektrum des DTKW Nr. 2 ($C_{20}H_{30}$) ist identisch mit dem Literaturspektrum des Dehydroabietans [12].

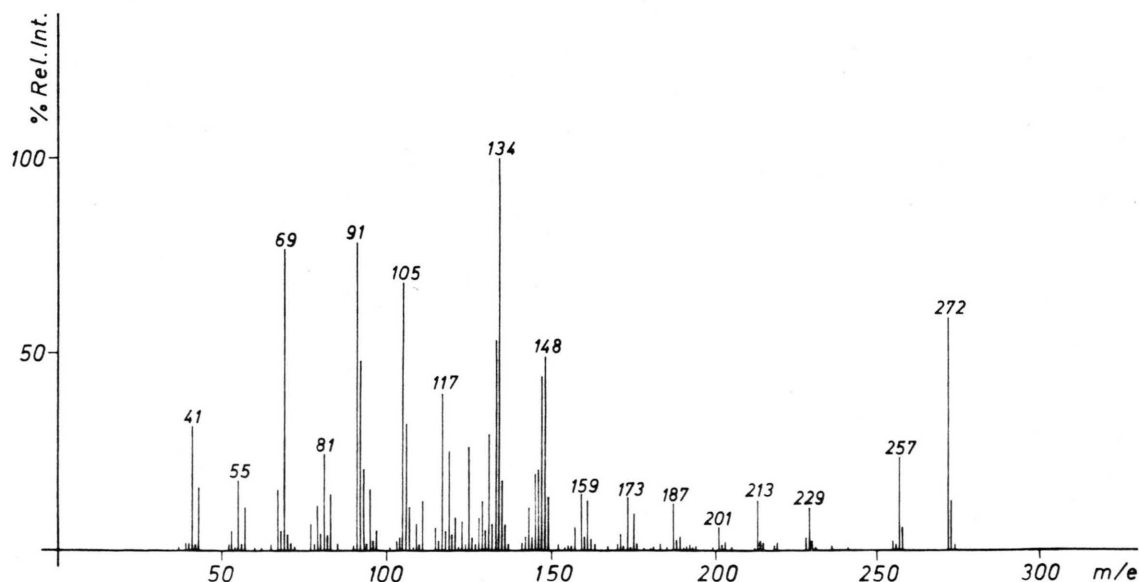
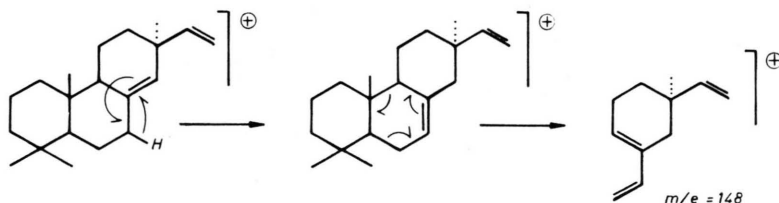
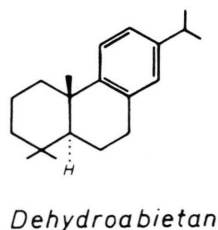


Abb. 1. EI-Massenspektrum des Diterpenkohlenwasserstoffs Nr. 1.

Nach unserer Erfahrung ist Massenspektren bei Diterpenen eine hohe Substanzspezifität zuzuordnen; es sind sogar zahlreiche Beispiele bekannt, bei denen auf diese Weise zwischen Stereoisomeren differenziert werden kann (Lit. zitiert in [13]). Die Identität des von uns gefundenen DTKW Nr. 2 mit Dehydroabietan kann deshalb als hinreichend gesichert angesehen werden.

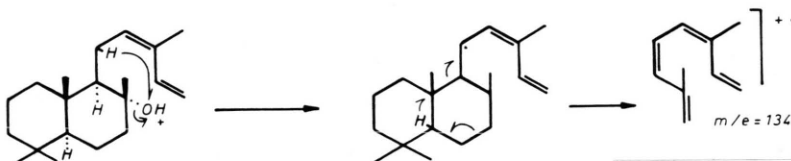
Dagegen war die Struktur des anderen Diterpens (Nr. 1) nicht zu ermitteln. Auch Partialstrukturen sind aus dem entsprechenden Massenspektrum (Abb. 1) nicht sicher ableitbar, da die offenbar als Schlüsselionen fungierenden Fragmente m/e 148 und 134 nicht spezifisch nur einem Strukturelement zuzuordnen sind (m/e 148) bzw. über deren Genese bei DTKW noch keine Information vorliegt (m/e 134).

Von Audier *et al.* [14] wird beim Sandaracopimaradien, einem anderen DTKW der gleichen Summenformel $C_{20}H_{32}$, die Genese des Ions m/e 148 als Retro-Diels-Alder-Spaltung (nach vorheriger Doppelbindungsisomerisierung) formuliert:

In entsprechender Weise soll sich dieses Fragment auch beim Isopimaradien durch Retro-Diels-Alder-Spaltung bilden [14].

Die Massenspektren dieser beiden Verbindungen zeigen jedoch keine Übereinstimmung mit dem DTKW unseres Kallusdestillats. Dagegen können für den Entstehungsmechanismus des Ions m/e 134 keine Literaturangaben angeführt werden, zumal unseres Wissens bisher kein Diterpenkohlenwasserstoffspektrum publiziert wurde, in dem dieses Fragment wie in unserem Fall (vgl. Abb. 1) den Basispeak verkörpert.

Dies ist jedoch z. B. der Fall bei einem oxigenierten Diterpen, dem (12Z)-Abienol ($C_{20}H_{32}O$) und wird dort durch folgenden Fragmentierungsweg erklärt [15]:



Dieser Sachverhalt ist insofern interessant, als denkbar wäre – allerdings auf rein spekulativer Basis –, daß dieses Fragment m/e 134 als Basispeak auch entstehen könnte aus einer entsprechenden Diterpenkohlenwasserstoffstruktur, bei der der Ring C als derartige offene Kette vorliegt und im Molekül noch eine weitere Doppelbindung vorhanden ist.

Untersuchungen zur biogenetischen Homogenität des Kallusmaterials

Es galt zunächst zu klären, wie heterogen sich die entdifferenzierten Kalli innerhalb einer unter gleichen Bedingungen wachsenden Passage bezüglich der Produktion flüchtiger Sekundärstoffe verhalten.

Zu diesem Zweck wurde in mehreren Parallelversuchen Kallusmaterial einer Passage (0,2 mg Kinetin und 1 mg 2,4-D/I, Dauerlicht 500 Lux, 24 °C) zur gleichen Zeit geerntet und wasserdampfdestilliert. Die gc und gc/ms Analysen dieser einzelnen Wasserdampfdestillate zeigten, daß bezüglich der qualitativen und prozentualen Zusammensetzung dieser komplexen Gemische keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben einer Passage auftraten.

Um festzustellen, inwieweit die Länge der Kulturdauer (Anzahl der Passagen) die Bildung flüchtiger Komponenten des Melissenkallus beeinflusst, überprüften wir vergleichend die Zusammensetzung der Wasserdampfdestillate einer etablierten, 5 Monate alten (2 Passagen) und einer unter gleichen Bedingungen (0,2 mg Kinetin und 3 mg 2,4-D/I, Dauerlicht 500 Lux, 24 °C) gewachsenen 2½-jährigen (30 Passagen) Kalluskultur. Die Auswertung der gc und gc/ms Messungen ließ keine Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung dieser beiden Proben erkennen; die geringen Differenzen in den prozentualen Anteilen einzelner gc Peaks waren nicht relevant. Auch die Gesamtausbeute an wasserdampfgefährlichen Komponenten war

bei beiden Kulturen mit 0,001% (g/g) des Frischgewichts identisch.

Die Bildung von Diterpenkohlenwasserstoffen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Es sollte bei dieser Untersuchung geprüft werden, ob und gegebenenfalls inwieweit es im Verlaufe einer Passage zu Veränderungen in der Zusammensetzung des komplexen Gemisches flüchtiger Kallusinhaltsstoffe – und darunter speziell der Diterpene – kommt.

Dazu wurde von einer 2½ Jahre alten Kultur (0,2 mg Kinetin und 3 mg 2,4-D/I; Dauerlicht, 500 Lux, 24 °C) innerhalb einer Passage nach 4, 6, 8 und 12 Wochen Kallusmaterial entnommen und wasserdampfdestilliert, nachdem zuvor anhaftendes Nährmedium sehr sorgfältig entfernt worden war. Da es notwendig schien, für diese Versuchsreihe möglichst einheitliches Zellmaterial zu verwenden, setzten wir zur Anzucht der untersuchten Passage nur Kalluszellen aus einem einzigen Ausgangskolben ein.

Anlage, Wachstumsverhalten und Habitus einer derartigen Kultur wurden von uns bereits beschrieben [1], im folgenden soll deshalb nur auf wenige Punkte hingewiesen werden:

In der 6. Woche setzte in den oberen Kallusteilen eine langsame Verbräunung und Verfestigung des Gewebes ein (Abb. 2), die im Laufe der Zeit immer größere Areale erfaßte, bis gegen Ende der 7. Woche nur noch die Zellbezirke am oder nahe des Nährmediums hell gefärbt waren. Zu Beginn der 9. Woche besaßen alle Kallusteile eine schwarzbraune Färbung; die mikroskopische Analyse ergab, daß es sich bei dieser Verbräunung offenbar um einen Absterbeprozess der Zellen handelt, der mit der Bildung brauner, nicht spezifisch strukturierter Produkte einhergeht.

Entsprechend dieser Beobachtungen legten wir den Erntetermin für die erste Destillation auf einen

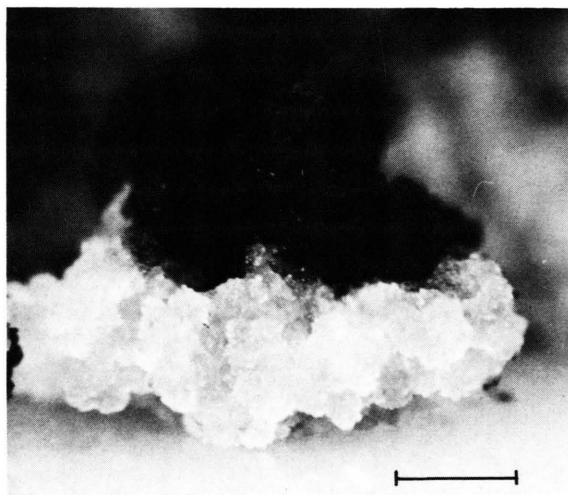


Abb. 2. Kallusaggregat einer 6 Wochen alten Kultur von *Melissa officinalis*. Die jungen Zellen sind weißlich, während die älteren durch Einlagerung unbekannter Verbindungen schwarz-braun aussehen. —: 0,5 cm.

Zeitpunkt, an dem die Kalli noch keine braunen Areale aufwiesen (28. Tag). Die zweite Destillation wurde mit Zellmaterial aus dem Anfangsstadium der Verbräunung (42. Tag) durchgeführt, während die dritte und vierte Entnahme nach 56 bzw. 84 Tagen erfolgten als der gesamte Kallus schwarz-braun verfärbt war.

Die gc und ms Analyse dieser Kallusdestillate ergab folgende Ergebnisse (vgl. dazu Tab. 1):

- In der qualitativen Zusammensetzung stimmen alle Destillate in hohem Maße überein.
- Verschiebungen sind dagegen z. T. in den prozentualen Anteilen einzelner Komponenten zu beobachten. Dies trifft in besonderer Weise für die beiden DTKW zu, deren prozentualer Gehalt in den Destillaten sich mit zunehmendem Alter der Kulturen ändert.
- Dabei verhalten sich diese beiden Verbindungen gegenläufig: der Prozentgehalt von DTKW Nr. 1 sinkt von 11,4% (Destillation nach 4 Wochen) auf 1,0% (Destillation nach 12 Wochen), während beim Dehydroabietan eine Steigerung von 9,9% auf 32,3% zu registrieren ist. Die genauen Zahlenwerte dieser Veränderungen auf den einzelnen Stufen sind in Tab. I (2. und 3. Spalte) wiedergegeben.
- Vergleicht man diese Werte innerhalb der einzelnen Entwicklungsstufen miteinander, so ist festzustellen, daß das Verhältnis der prozentualen Anteile von DTKW Nr. 1 und Dehydroabietan mit zunehmendem Kallusalter deutlich abnimmt (von 1,2 bis auf 0,03), d. h. sich zugunsten von Dehydroabietan verschiebt.

Tab. I. Prozentuale Anteile der Diterpene Nr. 1 und 2 (= Dehydroabietan) in den Gaschromatogrammen der Kallusdestillate verschieden alter Gewebekulturen.

Erntezeitpunkt	DTKW Nr. 1 [%]	Dehydroabietan [%]	$\frac{\text{DTKW Nr. 1} [\%]}{\text{Dehydroab.} [\%]}$	Quotient ^a
nach 4 Wochen (= Stufe 1)	11,4	9,9	1,2	3,1
nach 6 Wochen (= Stufe 2)	11,0	29,4	0,4	3,3
nach 8 Wochen (= Stufe 3)	3,5	30,7	0,1	3,7
nach 12 Wochen (= Stufe 4)	1,0	32,3	0,03	

^a In dieser Spalte sind jeweils die Verhältnisse DTKW Nr. 1/Dehydroabietan in den aufeinanderfolgenden Kallusdestillationen zueinander in Relation gesetzt.

Die Stärke dieser Verschiebung zwischen den Kallusdestillaten der ersten 3 Altersstufen (2 Wochen-Intervalle) liegt mit einem Quotienten von 3,1 bzw. 3,3 etwa in der gleichen Größenordnung. Zwischen der 8. und 12. Woche wird diese sukzessive Verschiebung des Verhältnisses dieser beiden Diterpene zugunsten des Dehydroabietans jedoch geringer, denn der Quotient für dieses 4 Wochen-Intervall beträgt nur 3,7.

- Wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, verdoppelt sich in dem untersuchten Zeitraum der prozentuale Gesamtanteil beider Diterpene etwa (von 21 auf 40%), um dann bis zur 8. Woche auf einen Wert von ca. 34% abzusinken, der bis zur 12. Woche annähernd konstant bleibt.
- In dem untersuchten Zeitintervall (4.–12. Woche) ändert sich auch die Destillatausbeute. Man beobachtet zwischen der 4. und 6. Woche eine deutliche Steigerung von 0,001% (bezogen auf g Frischgewicht) auf etwa den doppelten Wert (0,002%). Da dieser Wert bei den älteren Kulturen nicht weiter ansteigt, andererseits aber in den Destillaten der 6 Wochen alten Kalli der prozentuale Gesamtanteil an DTKW mit 40,4% am höchsten liegt, erreicht die absolute Menge dieser Sekundärstoffgruppe in den Zellkulturen folglich etwa zu dieser Zeit ein Maximum. Dies ist hauptsächlich auf die deutlich gesteigerte Biosynthese von Dehydroabietan zurückzuführen.

Einfluß von Licht und der 2,4-D-Konzentration auf die Zusammensetzung der Kallusdestillate

Die Wasserdampfdestillate von 3 entdifferenzierten Kalluskulturen, die bei verschiedener Beleuchtungsstärke (Dauerlicht: 500 Lux und 3000 Lux sowie Dauerdunkel) aufgezogen wurden, zeigten in der Zusammensetzung keine Unterschiede. Auch die produzierte Menge an flüchtigen Verbindungen war bei allen drei Kulturen gleich groß.

Licht übt demnach – zumindest während einer Untersuchungsperiode von 12 Wochen – bei Melissenkalluskulturen keinen Einfluß auf die Bildung flüchtiger Sekundärstoffe aus.

Auch ein unterschiedlicher Gehalt des Phytohormons 2,4-D (1 bzw. 3mg/l) im Nährmedium führte nicht zu qualitativen Veränderungen im Spektrum der flüchtigen Inhaltsstoffe von entsprechenden Kalluskulturen. Allerdings konnten partiell deutliche Unterschiede hinsichtlich der prozentu-

alen Anteile einzelner Komponenten in den Wasserdampfdestillaten der beiden Kulturen registriert werden. So betrug z. B. der Gehalt an DTKW Nr. 1 und Dehydroabietan im Destillat der bei niedrigerer 2,4-D-Konzentration gewachsenen Kalli nur 3,1 bzw. 2,5%, während in den Kulturen mit 3 mg 2,4-D/l Nährmedium entsprechende prozentuale Anteile von 11,4 bzw. 10,0% registriert wurden. Auch bei einigen anderen Komponenten – deren Identifizierung zum Teil noch nicht abgeschlossen ist und über die deshalb an anderer Stelle berichtet wird [16] – zeigten sich beim Vergleich der beiden Kulturdestillate partiell beträchtliche Unterschiede im prozentualen Gehalt.

Diskussion

Der Nachweis wasserdampf-flüchtiger DTKW in entdifferenzierten Blattkalluskulturen der Melisse verdient aus mehreren Gründen besonderes Interesse. In der Literatur existieren bisher nur sehr wenige Hinweise über das Vorkommen von Diterpenen in pflanzlichen Zellkulturen (z. B. [17–21]). DTKW sind unseres Wissens bisher nur noch in Kulturen von *Thuja occidentalis* [20] und *Cryptomeria japonica* [21], zweier Gymnospermen aus der Klasse der Pinatae, beschrieben worden. Dagegen konnten bei *Melissa officinalis* derartige Verbindungen erstmalig in Gewebekulturen einer angiospermen Pflanze nachgewiesen werden. Zudem wird hier zum ersten Mal über das Auftreten von DTKW in Oberflächenkulturen berichtet, während es sich bei den beiden oben genannten Fällen um Suspensionskulturen handelte.

Es ist bemerkenswert, daß auch in den *Thuja*- und *Cryptomeria*-Kulturen Dehydroabietan (als einziger DTKW neben oxigenierten Vertretern dieser Stoffklasse) gefunden wurde, eine Substanz, die auch wir im Destillat des Melissenkallus identifizieren konnten. Der andere in unseren Kalli auftretende – aber nicht identifizierte – DTKW ist bisher in Zellkulturen nicht beschrieben worden. Beide DTKW des Blattkallusdestillats konnten wir im ätherischen Blattöl der Melisse nicht auffinden, während hingegen die von Suspensionskulturen der japanischen Zeder produzierten Diterpene auch in der intakten Pflanze nachweisbar waren [21, 22]. Ein anderer Sachverhalt wiederum liegt bei *Andrographis*-Zellkulturen vor, bei denen keines der in der intakten

Pflanze auftretenden Diterpene in den entsprechenden Kulturen auffindbar war [23].

Während bei Gewebekulturen, die flüchtige Inhaltsstoffe bildeten, die Zusammensetzung dieser komplexen Gemische z.T. beträchtlich zwischen verschiedenen Passagen variierte [24, 25], zeigte unsere Melissenblattkalluskultur ein sehr einheitliches und stabiles Verhalten hinsichtlich der Produktion wasserdampflicher Verbindungen. Dies galt sowohl innerhalb einer Kulturpassage als auch für einen Zeitraum von 2½ Jahren (Ernte immer bei etwa gleichem Entwicklungszustand und Alter der Kalli). In keinem Fall konnten bei der gc/ms Analyse in der Zusammensetzung der Wasserdampfdestillate relevante Unterschiede registriert werden.

Dagegen änderte sich im Laufe einer Passage die Zusammensetzung dieser komplexen Gemische beträchtlich bezüglich der prozentualen Anteile einzelner Komponenten. Eine Änderung der Ölzusammensetzung in Abhängigkeit von der Wachstumskurve wird auch bei [26] beschrieben; während diese jedoch durch eine unterschiedlich starke Sesquiterpenbildung hervorgerufen wird, verändert sich die Zusammensetzung der Wasserdampfdestillate im Verlaufe einer Passage bei unserer Melissenkultur primär wegen einer starken Verschiebung der relativen Prozentgehalte der beiden DTKW.

Am auffälligsten ist die mit wachsendem Alter der Kalli zu beobachtende – diskontinuierliche – Zunahme des prozentualen Anteils an Dehydroabietan in den Destillaten. Möglicherweise kann der Dehydroabietangehalt – zumindest bis etwa zur 12. Woche – als eine Art „Marker“ für das Alter der Kalli angesehen werden. Analog wäre es denkbar, auch die Abnahme des unbekannten Diterpens Nr. 1 in gleicher Weise zu interpretieren.

Es ist augenfällig, daß etwa bis zur 6. Woche, dem Zeitpunkt der einsetzenden Verbräunung, der prozentuale Gehalt an Dehydroabietan im Destillat stark ansteigt, während in den folgenden Wochen nur noch eine geringfügige relative Zunahme erfolgt (vgl. Tab. 1). Eine Erklärung für dieses Phänomen läßt sich zur Zeit noch nicht geben; sollten jedoch die braungefärbten, wahrscheinlich phenolischen Verbindungen in irgendeiner Weise in den Diterpenstoffwechsel eingreifen, so müßte dieser Einfluß insofern selektiv sein, als die beiden DTKW in unterschiedlicher Weise beeinflußt werden. Während nämlich der prozentuale Anteil an Dehydroabietan bis zur 12. Woche noch leicht ansteigt, fällt

der Prozentgehalt an DTKW Nr. 1 nach der 6. Woche deutlich ab (vgl. Tab. 1).

Trotz dieser – auch schon in der Anfangsphase – bei beiden Diterpenen zu beobachtenden gegenläufigen Tendenz bezüglich der Änderung ihrer prozentualen Anteile im Wasserdampfdestillat, muß ein direkter biogenetischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Verbindungen wohl ausgeschlossen werden, da schon im Destillat der 6. Woche eine wesentlich stärkere Zunahme an Dehydroabietan als Abnahme an Diterpen Nr. 1 zu registrieren ist.

Über einen Effekt von Licht auf die Bildung flüchtiger Verbindungen bei ätherischölproduzierenden Kulturen ist verschiedentlich berichtet worden (z.B. [23, 27, 28]). Dagegen konnten wir bei der Melisse beim Vergleich der Destillate von enddifferenzierten Licht- und Dunkelkulturen praktisch keine Unterschiede feststellen; eine Beobachtung, die wir zuvor auch schon bei Kalluskulturen der Apiacee *Peucedanum cervaria* gemacht hatten [29].

Neben Licht können auch Phytohormone den Sekundärstoffwechsel in pflanzlichen Zellkulturen beeinflussen; dies ist z.B. bei Mono- und Sesquiterpenen [23, 30, 31] nachgewiesen worden. Auch bei unseren Melissenkalluskulturen konnten diesbezügliche hormonelle Effekte registriert werden. So wurde durch eine Erhöhung der 2,4-D-Konzentration im Nährmedium bei einer Reihe von Komponenten des Wasserdampfdestillats eine Änderung in ihrem prozentualen Gehalt bewirkt; der prozentuale Anteil beider DTKW nahm dabei zu. Demgegenüber ergab die Analyse des ätherischen Öls einer Kamillenzellkultur, daß mit steigender 2,4-D-Konzentration der Anteil von Sesquiterpenen im Öl deutlich reduziert war, während bei aliphatischen Kohlenwasserstoffen eine starke Zunahme resultierte [31].

Bezüglich einer qualitativen Änderung in der Ölzusammensetzung einer Gewebekultur, hervorgerufen durch unterschiedliche Phytohormongaben, gibt es unseres Wissens in der Literatur keine Angabe. Auch wir konnten bei den Melissenkulturen keine entsprechenden Beobachtungen machen.

Material und Methoden

Anlage der Kalluskulturen

Verwendet wurden *Melissa-officinalis*-Pflanzen aus dem Botanischen Garten der Universität Würz-

burg (Freiland). Die Initiierung und Aufzucht der Kulturen sowie die Erstellung der Wachstumskurve ist bei [1] beschrieben.

Kulturbedingungen

Die Oberflächenkulturen wuchsen auf einem mit 9% Agar verfestigten Linsmaier-und-Skoog-Nährmedium [32], dem 0,2 mg/l Kinetin und 1 bzw. 3 mg/l 2,4-D zugesetzt worden waren. Alle Kulturen wuchsen in 300 ml Erlenmeyerkolben, die mit je 100 ml Nährboden beschickt waren. Die Aufbewahrung der mit 500 Lux (Dauerlicht) belichteten Kalli erfolgte in Klimakammern bei 24 °C; die Dunkelkulturen und die mit 3000 Lux (Dauerlicht) belichteten Kalli standen in Klimaschränken (24 °C).

Wasserdampfdestillation

Die Kalluskulturen wurden direkt nach der Ernte verarbeitet, wobei wir Kallus und Agarmedium immer sehr sorgfältig voneinander trennten. Jeweils etwa 250 g Kallusfrischmaterial wurden der Wasserdampfdestillation unterworfen; deren Durchführung geschah wie bei [1] beschrieben.

Bestimmung des Trockengewichts und der Ölausbeute

Die Trockengewichtsbestimmung der wasserdampfdestillierten Kalli erfolgte durch Wägen (nach Trocknung im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz). Auch die Ölausbeute wurde gravimetrisch ermittelt, nachdem das Pentan (unter Stickstoffatmosphäre, mittleres Wasserstrahlpumpenvakuum) quantitativ abgezogen worden war (gc Kontrolle).

Gaschromatographie

Apparat: Fraktovap 2900 (Carlo Erba Strumentazione). Säule: 50 m WG 11-Dünnschichtglaskapillare. Temp.: 70 °C (7 min isotherm), aufgeheizt auf 200 °C mit einer Heizrate von 3 °C/min. Bei der Funk-

tionsindexbestimmung: 200 °C isotherm. Für die Funktionsindexbestimmung wurde zusätzlich eine 30 m SE 30-Dünnschichtkapillarsäule verwendet. (Analysentemperatur: 190 °C, isotherm.) Injektor: „Grob-Splitter“, Splitverhältnis 1:20, Temp. 200 °C. Injektionsvolumen: 2 µl (nach Einengung der Vorlagemenge auf 1/20 des Volumens). Detektor: FID, Temp. 200 °C. Trägergas: N₂, Durchfluß 1,5 ml/min.

Für die quantitative Auswertung der Kapillarchromatogramme, die nach der 100% Methode ohne Peakflächenkorrektur durchgeführt wurde, stand ein Integrator der Fa. Spectra Physics (Modell Autolab System I) zur Verfügung.

Die Bestimmung der Kovatsindices erfolgte nach isothermer gc Analyse rechnerisch durch Interpolation zwischen den Retentionswerten entsprechender *n*-Alkane (vgl. dazu z. B. [33]).

GC-MS-Kopplung

Gerätetyp: GC/MS-System der Firma Finnigan MAT^a (Modell 8200 mit Datensystem SS 300). Gaschromatograph: Varian Modell 3700. Säule: 50 m Dünnschichtquarzkapillare (FFAP). Interface: Offene Kopplung, Quarztransferline, Temp. 210 °C. Quellentemperatur: 220 °C. Elektronenenergie: 70 eV. MS-Auflösung: Beim Betrieb in Niederauflösung (LR): 1100 (10% Tal), in Hochauflösung (HR): 6500.

Danksagung

Wir danken Frau Almuth Krüger und Frau Christa Schoor für die zuverlässige technische Mitarbeit, Herrn Gartenmeister Ehrhard für die erfolgreiche Anzucht und Pflege der Versuchspflanzen. Der Sebastian-Kneipp-Stiftung sind wir für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchung zu Dank verbunden.

^a Für die im Rahmen einer Gerätedemonstration durchgeführten Messungen danken wir der Firma Finnigan MAT, Bremen.

- [1] W. Schultze, I. Koch u. F.-C. Czygan, Dtsch. Apoth. Ztg. **46**, 2264 (1983).
- [2] F. W. Hefendehl, Arch. Pharm. **303**, 345 (1970).
- [3] J. Pelletier, F. Enjalbert, J. M. Bessiere u. G. Privat, Plant Med. Phytother. **15**, 149 (1981).
- [4] G. Tittel, H. Wagner u. R. Bos, Planta med. **46**, 91 (1982).
- [5] F. Schenk u. C. H. Brieskorn, Arch. Pharm. **282**, 1 (1944).
- [6] C. H. Brieskorn, M. Briner, L. Schlumprecht u. K. H. Eberhardt, Arch. Pharm. **285**, 290 (1952).
- [7] C. H. Brieskorn, K. H. Eberhardt u. M. Briner, Arch. Pharm. **286**, 501 (1953).
- [8] C. H. Brieskorn u. W. Krause, Arch. Pharm. **307**, 603 (1974).
- [9] D. N. Butcher, in Plant Cell, Tissue and Organ Culture (J. Reinert and Y. P. S. Bajaj, eds.), p. 685, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977.
- [10] J. E. Staba, in Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals (E. J. Staba, ed.), p. 67, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida 1980.
- [11] G. Lange u. W. Schultze, in: Analysis of Volatiles (P. Schreier, ed.), p. 307, Walter de Gruyter u. Co., Berlin, New York 1984.
- [12] C. R. Enzell u. R. Ryhage, Arkiv Kemi **26**, 425 (1967).
- [13] C. R. Enzell u. I. Wahlberg, in: Biochemical Applications of Mass Spectrometry (G. R. Waller and O. C. Dermer, eds.), p. 311, J. Wiley & Sons, New York 1980.
- [14] H. E. Audier, S. Bory, M. Fétizon u. N.-T. Anh, Bull. Soc. Chim. **12**, 4002 (1966).
- [15] P. F. Vlad, K. S. Khariton, M. N. Koltsa u. O. D. Bordakh, Khim. Prirodn. Soedin., Akad. Nauk SSR, Inst. Khim. Prirodn. Soedin, p. 30, 1974, zitiert nach [13].
- [16] W. Schultze, I. Koch-Heitzmann u. F.-C. Czygan, in Vorbereitung.
- [17] A. K. Stobart, N. Weir u. D. R. Thomas, Phytochemistry **8**, 1089 (1969).
- [18] F. van de Voort u. P. M. Townsley, J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment **8**, 4 (1975).
- [19] M. Misawa, in: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application (W. Barz, E. Reinhard, and M. H. Zenk, eds.), p. 17, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977.
- [20] L. Witte, J. Berlin, V. Wray, M. Schubert, W. Kohl, G. Höfle u. J. Hammer, Planta Med. **49**, 216 (1983).
- [21] H. Sugisawa, C. Chen u. K. Nabeta, in: Analysis of Volatiles (P. Schreier, ed.), p. 357, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York 1984.
- [22] N. Ishikura, K. Nabeta u. H. Sugisawa, in: 8th Plant Tissue Culture Symp. Abstr., p. 65, Toyama, Japan, July 1983.
- [23] D. N. Butcher u. J. D. Connolly, J. Exp. Botany **22**, 314 (1971).
- [24] E. Lang u. H. Hörster, Planta Med. **31**, 112 (1977).
- [25] W. Bisson, R. Beiderbeck u. J. Reichling, Planta Med. **47**, 164 (1983).
- [26] K. Nabeta u. H. Sugisawa, in: Plant Tissue Culture 1982 (A. Fujiwara, ed.), p. 289, The Japanese Association for Plant Tissue Culture (publ.), Abe Photo Printing Co., Ltd., Tokyo 1982.
- [27] M. Nagel u. E. Reinhard, Planta Med. **27**, 264 (1975).
- [28] E. Szöke, G. Verzár-Petri, I. N. Kuzovkina, E. Lemberkovics u. A. Keri, Fiz. Rast. **25**, 178 (1978).
- [29] W. Schultze, Dissertation, Würzburg 1982.
- [30] K. Wickham, E. Rodriguez u. J. Arditti, Bot. Gaz. **141**, 435 (1980).
- [31] E. Szöke, A. L. Shavarda, G. Verzár-Petri u. I. N. Kuzovkina, Herba Hung. Tom **18**, 7 (1979).
- [32] E. M. Linsmaier u. F. Skoog, Physiol. Plant **18**, 100 (1965).
- [33] R. Kaiser, Chromatografie in der Gasphase **Bd. III**, Teil I, S. 148, Bibliografisches Institut, Mannheim 1969.