

Gerd v. Unruh, Gerd Remberg und Gerhard Spiteller

Über die „Inhaltsstoffe“ von Filterpapieren, Teil 1

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 18. März 1971)

Rund- und Faltenfilter sowie Extraktionshülsen enthalten beträchtliche Mengen von Kohlenwasserstoffen, Alkoholen, Fettsäuren, Harzsäureestern, Sterinen und Phthalestern. Die Konzentration dieser Verbindungen in einem einzigen Faltenfilter überschreitet manchmal jene Menge, die für einen Nachweis mit einer Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer erforderlich ist, um das Zehn- bis Hundertfache, so daß Filter ohne Vorbehandlung beim Spurennachweis von Naturstoffen mittels GC-MS-Kombination nicht verwendbar sind.

Substances Contained in Filter Papers, Part 1

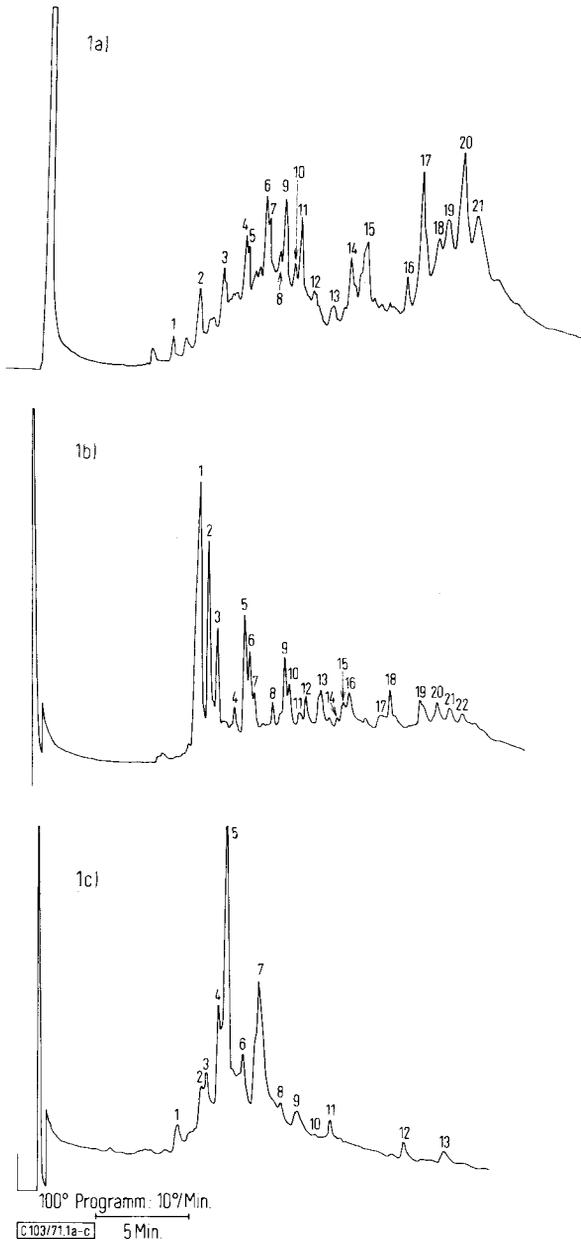
Folded and unfolded filters as well as extraction thimbles contain considerable amounts of hydrocarbons, alcohols, fatty acids, esters of resin acids, sterols, and plasticizers. The concentration of these compounds in a single folded filter sometimes exceeds the amount necessary for a detection with a combination of gaschromatograph-mass spectrometer ten to hundred times. Consequently filter without pretreatment cannot be used in the trace analysis of natural products with a combination GC-MS.

Bei der Untersuchung biologischen Materials auf den Gehalt an Steroiden, die wir in Mengen von etwa 0.1—10 µg erwarteten, stellten wir mit Hilfe einer Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer fest, daß alle Fraktionen eines auf Dünnschichtplatten getrennten Gemisches nahezu gleiche Komponenten enthielten, ein typisches Zeichen dafür, daß bei der Aufarbeitung Verunreinigungen eingeschleppt worden waren. Eine Überprüfung der verwendeten Materialien zeigte, daß die Verunreinigungen nicht aus Lösungsmitteln sowie aus dem Plattenmaterial stammten, sondern aus den Faltenfiltern, die wir zum Abfiltrieren des Kieselgels benutzt hatten. Wir entdeckten in allen untersuchten Filtern erschreckend hohe Mengen organischer Verunreinigungen. Hier wird über die Papiersorte Selecta Nr. 595 der Firma Schleicher & Schüll berichtet. Die Untersuchung anderer Papiersorten soll in einer weiteren Arbeit mitgeteilt werden.

Über eine störende Verunreinigung im Filterpapier wurde unseres Wissens erstmals von Lam¹⁾ berichtet. Er fand erhebliche Mengen von Phthalestern, die vielfach als Weichmacher verwendet werden. Phthalester können beispielsweise durch Lüftungsanlagen, deren Filter Phthalester enthalten, in Labors gelangen und innerhalb kürzester Zeit alle Gegenstände verseuchen²⁾.

¹⁾ J. Lam, Chem. and Ind. 1967, 1837.

²⁾ M. Blumer, Contamination Control 4, Supl., 13, (1965).



Abbild. 1a) Gaschromatogramm eines Ätherextraktes von Rundfiltern 595 (\varnothing 9 cm) (vgl. Tab. 1), 1b) von Faltenfiltern 595 $\frac{1}{2}$ (\varnothing 9 cm) (vgl. Tab. 2) und 1c) von Faltenfiltern 595 $\frac{1}{2}$ (\varnothing 12.5 cm) (vgl. Tab. 3)

Häufig werden sie allerdings nicht als solche erkannt. So wurden wiederholt Massenspektren publiziert, die im wesentlichen das Spektrum eines Phthalesters dar-

stellen. Z. B. ist das angebliche Spektrum des 17 β -Acetoxy-3.3-äthylendioxy-androsten-(4)-ons-(11) das Spektrum des Dioctylphthalats, verunreinigt mit wenig Steroid³⁾. Mit großer Wahrscheinlichkeit beruht die wiederholt berichtete Auffindung von Phthalestern in Naturstoffen^{4, 5)}, wie bereits *Hunnemann*⁶⁾ deutlich machte, auf einem Irrtum.

Während Verunreinigungen mit Phthalestern oft vorkommen, aber (z. B. massenspektrometrisch) leicht erkennbar sind, wirken sich die Verunreinigungen, die neben Phthalestern in Filterpapieren vorhanden sind, viel störender aus; denn Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren und insbesondere Sterine sind häufig auch Bestandteile von komplexen Naturstoffen, so daß die Gefahr besteht, völlig falsche Resultate zu erhalten.

Die unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen (Versuchsteil) erhaltenen Ätherextrakte der Filterpapiersorte 595 lieferten organische Rückstände von ca. 0.1 mg pro Filter. Diese wurden mit einer Kombination Gaschromatograph-Massenspektrometer analysiert. Die meisten Peaks in den Gaschromatogrammen (Abbild. 1) konnten dabei identifiziert werden.

Die Massenspektren der kleinen nicht bezifferten Peaks zeigen nur Kohlenwasserstoffbruchstück-Ionen im unteren Massenbereich.

Da mit steigenden Retentionszeiten steigende Probemengen von Säule und Separator adsorbiert werden, entsprechen sich gleiche Peakflächen zu Anfang und Ende des Chromatogramms nicht: Der Peak 1 in Abbild. 1c) zeigt in etwa eine Menge von 2 μ g Probe an, während der Peak 12 von etwa 5 μ g hervorgerufen wird.

Die Qualität der Massenspektren war in den meisten Fällen für eine Identifizierung ausreichend, doch ergaben sich erhebliche Abweichungen von Standardspektren:

1. Der Dampfdruck der Probe ändert sich bei der Aufnahme des Spektrums. Je nachdem ob man bei steigender oder fallender Flanke des GC-Peaks mit der Registrierung des Massenspektrums beginnt, sind entweder die Ionen im oberen oder unteren Massenbereich zu intensiv ausgeprägt⁷⁾.

2. Durch die gegenüber der Aufnahme von Standardspektren höhere thermische Energie der Probenmoleküle. Sie ist notwendig, um die Substanzen durch den Separator in die Ionenquelle zu bringen und gleichzeitig ihre rasche Entfernung aus der Ionenquelle zu gewährleisten⁷⁾.

3. Durch nicht quantitative Eliminierung von Vorfraktionen aus der Quelle. Dieses zu langsame Abpumpen von Proben ist besonders störend bei polaren Verbindungen, z. B. Fettsäuren.

4. Durch die Temperaturprogrammierung kommt es zu einer Elution von Zeretzungsprodukten aus Säule und Separator, was zu einem Anstieg der Ionen im niederen Massenbereich führt.

³⁾ P. Toft und A. J. Liston, *Steroids* **12**, 447 (1968).

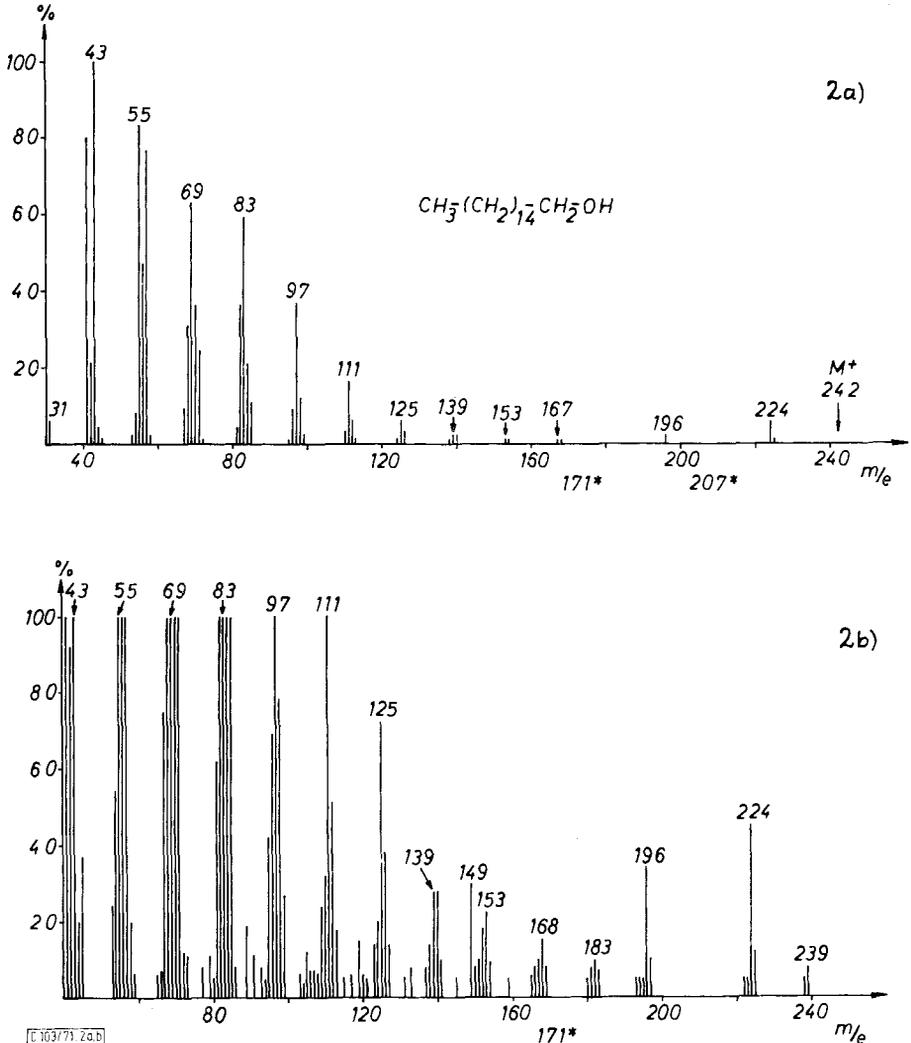
⁴⁾ S. Hayashi, Y. Asakawa, T. Ishida und T. Matsuura, *Tetrahedron Letters* [London] **1967**, 5061.

⁵⁾ Y. Asakawa, S. Hayashi und T. Matsuura, *Experientia* [Basel] **25**, 907 (1969).

⁶⁾ D. H. Hunnemann, *Tetrahedron Letters* [London] **14**, 1743 (1968).

⁷⁾ K. Kaiser, H. Obermann, G. Remberg, M. Spitteller-Friedmann und G. Spitteller, *Mh. Chem.* **101**, 240 (1970).

Um die Möglichkeiten und Schwierigkeiten der Identifizierung zu veranschaulichen, wurden in Abbild. 2 das Standardmassenspektrum des Hexadecanols-(1) dem des Peaks 4 in Abbild. 1c), der nach Spektrum und Retentionszeit als Hexadecanol-(1) identifiziert wurde, gegenübergestellt.



Abbild. 2a) Standardmassenspektrum des Hexadecanols-(1), 2b) Massenspektrum des Peaks 4 des Gaschromatogramms in Abbild. 1c)

Im Spektrum des Peaks 4 fällt die Einschubung des Ions der Masse 149 zwischen die Kohlenwasserstoffbruchstücke 139, 140 und 152, 153 auf. Es stammt noch von der Vorfraktion, die als Phthalester erkannt wurde. Ebenfalls eine Verunreinigung stellt das Ion der Masse 239 dar.

Um auch von Spuren Mengen noch Spektren zu erhalten, wurden alle Spektren mit höchster Empfindlichkeit registriert. Die intensitätsstarken Ionen (hier vor allem im unteren Massenbereich) sind daher nicht voll ausgeschrieben. Aus den Spektren allein läßt sich nicht entscheiden, ob Hexadecanol-(1) oder ein Hexadecen vorliegt, weil Hexadecene nahezu gleiche Spektren zeigen. Berücksichtigt man aber die Retentionszeiten, so ist die Identifizierung eindeutig.

In den Tabellen 1—3 sind die in drei Filtertypen der gleichen Papiersorte enthaltenen Verunreinigungen angegeben. Die Gaschromatogramme zeigen, daß auch bei gleicher Papiersorte die Konzentrationen der Verunreinigungen stark schwanken und daher keine Mengenangaben für einzelne Verunreinigungen sinnvoll sind. Andererseits scheint die qualitative Zusammensetzung der Verunreinigung für die Papiersorte typisch zu sein. In den Tabellen sind in der Spalte „Bruchstücke“ die Massen jener Ionen aufgeführt, die einen Hinweis geben, daß in der Probe Verunreinigungen aus Filterpapier enthalten sind. Die Spalte „Literatur“ gibt an, wo die betreffenden Massenspektren publiziert wurden.

Tab. 1. Ätherextrakt von Rundfiltern 595 (\varnothing 9 cm) (vgl. Abbild. 1a)

Peak-Nr.	Substanz	MG	Formel	Bruchstücke (Massenspektrometer)	Literatur
1	n-Hexadecan	226	$C_{16}H_{34}$		8)
2	n-Heptadecan	240	$C_{17}H_{36}$		8)
3	n-Octadecan	254	$C_{18}H_{38}$		8)
4	n-Nonadecan	268	$C_{19}H_{40}$		8)
5	Di-n-butylphthalat	278	$C_{16}H_{22}O_4$	223, 205, 149	9)
6	n-Eicosan	282	$C_{20}H_{42}$		8)
7	Palmitinsäure	256	$C_{16}H_{32}O_2$	129, 73, 60	10)
8	Margarinsäure	270	$C_{17}H_{34}O_2$	129, 73, 60	11)
9	n-Heneicosan	296	$C_{21}H_{44}$		8)
10	nicht identifiziert				
11	n-Docosan	310	$C_{22}H_{46}$		8)
11	Stearinsäure	284	$C_{18}H_{36}O_2$	129, 73, 60	10)
12	n-Tricosan	324	$C_{23}H_{48}$		8)
12	Methyl-dehydroabietat	314	$C_{21}H_{30}O_2$	299, 239	12)
13	n-Tetracosan	338	$C_{24}H_{50}$		8)
14	chloriertes Methyl-dehydroabietat	348	$C_{21}H_{29}ClO_2$	333, 273	
15	Behensäure	340	$C_{22}H_{44}O_2$	129, 73, 60	11)
16	24 ξ -Methyl-cholestatrien	380	$C_{28}H_{44}$		
17	Sitostatrien	394	$C_{29}H_{46}$		
18	Sterin-Gemisch	412	$C_{29}H_{48}O$		
		412	$C_{29}H_{48}O$		
19		400			
20		414	$C_{29}H_{50}O$		
		412			
	410				
21	Sitosten-(4)-on-(3)	412	$C_{29}H_{48}O$		11)

8) American Petroleum Institute (API); Collection of „uncertified“ mass spectra.

9) Uncertified Dow Mass Spectral Data.

10) A. Cornu and R. Massot, Compilation of Mass Spectral Data, Heyden and Son Limited, London 1966.

11) Eigene Spektrensammlung.

12) C. R. Enzell und I. Wahlberg, Acta chem. scand. 23, 871 (1969).

Tab. 2. Ätherextrakt von Faltenfiltern 595 1/2 (ø 9 cm) (vgl. Abbild. 1b)

Peak-Nr.	Substanz	MG	Formel	Bruchstücke (Massenspektrometer)	Literatur
1	Diisobutylphthalat	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	223, 205, 167, 149, 104, 76	11)
2	Hexadecanol-(1)	242	C ₁₆ H ₃₄ O	224, 196	8, 13)
3	Di-n-butylphthalat	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	223, 205, 149, 104	9)
4	n-Eicosan	282	C ₂₀ H ₄₂		8)
5	Octadecenol-(1)	268	C ₁₈ H ₃₆ O	250 (C ₁₈ H ₃₄)	8)
6	Octadecanol-(1)	270	C ₁₈ H ₃₈ O	252, 224	8)
7	n-Heneicosan	296	C ₂₁ H ₄₄		8)
8	n-Docosan	310	C ₂₂ H ₄₆		8)
9	Methyl-dehydroabietat	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	299, 239	12)
10	n-Tricosan	324	C ₂₃ H ₄₈		8)
11	nicht identifiziert	342		271 (C ₁₄ H ₂₀ ClO ₃) 257 (C ₁₃ H ₁₈ ClO ₃) 169 (C ₉ H ₁₀ ClO) 141 (C ₇ H ₆ ClO)	
12	n-Tetracosan	338	C ₂₄ H ₅₀		8)
13	n-Pentacosan	352	C ₂₅ H ₅₂		8)
14	n-Hexacosan	366	C ₂₆ H ₅₄		8)
15	nicht identifiziert	386		301 (C ₁₅ H ₂₂ ClO ₄) 133 (C ₆ H ₁₃ O ₃)	
15	Behensäure	340	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	129, 73, 60	11)
16	Tetracosanol-(1)	354	C ₂₄ H ₅₀ O	336, 308	
17	nicht identifiziert	430			
17	24ξ-Methyl- cholestatrien	380	C ₂₈ H ₄₄		
18	Sitostatrien	394	C ₂₉ H ₄₆		
19	5α-Sitostanol-(3β)	416	C ₂₉ H ₅₂ O		11)
20	Sterin-Gemisch	430			
		412			
		410			
21		430			
		428			
		430			
22		428			
		426			

Da mit der von uns verwendeten Kombination GC-MS ein Nachweis einer Probenmenge von 0.1 µg möglich ist und andererseits ein einziger mittelgroßer (ø 9 cm) Faltenfilter 130 µg an Verunreinigungen enthält (Mittelwert aus 4 Bestimmungen), von denen bereits bei normalem Filtrieren ein beträchtlicher Teil eluiert wird, läßt sich erkennen, wie gravierend diese Verunreinigungen bei der Spurenanalyse sind. Auch bei der Reinigung kleiner Probenmengen durch Umkristallisieren ist es wichtig, diesen Umstand zu berücksichtigen.

Nicht nur an Proben aus unserem Labor wurde diese Beobachtung gemacht: Extrakte von Pollen, die wir für Prof. Dr. D. Kolbah in Zagreb untersuchten, und Extrakte aus Gehirn, die Dr. Lesch von der Medizinischen Hochschule Hannover isoliert hatte, zeigten in gleicher Weise wie unsere eigenen typische Verunreinigungen durch Filterpapier.

¹³⁾ L. Dolejš, P. Beran und J. Hradec, *Organic Mass Spectrometry* 1, 563 (1968).

Tab. 3. Ätherextrakt von Faltenfiltern 595 1/2 (∅ 12.5 cm) (vgl. Abbild. 1c)

Peak-Nr.	Substanz	MG	Formel	Bruchstücke (Massenspektrometer)	Literatur
1	n-Heptadecan	240	C ₁₇ H ₃₆		8)
2	n-Octadecan	254	C ₁₈ H ₃₈		8)
3	Diisobutylphthalat	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	223, 205, 167, 149	11)
4	Hexadecanol-(1)	242	C ₁₆ H ₃₄ O	224, 196	8, 13)
5	Di-n-butylphthalat	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	223, 205, 149, 104	9)
6	nicht identifiziert				
7	Octadecenol-(1)	268	C ₁₈ H ₃₆ O	250	8)
7	Octadecanol-(1)	270	C ₁₈ H ₃₈ O	252, 224	8)
8	n-Docosan	310	C ₂₂ H ₄₆		8)
9	Methyl-dehydroabietat	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	299, 239	12)
10	n-Tetracosan	338	C ₂₄ H ₅₀		8)
11	nicht identifiziert				
12	Sitostatrien	394	C ₂₉ H ₄₆	275, 253	
13	5α-Sitostanon-(3)	414	C ₂₉ H ₅₀ O	232, 231, 217, 163	11)

Reinigung von Filterpapier: Um zu vermeiden, daß bei der Aufarbeitung von Naturprodukten aus Filtern Verunreinigungen in die Probe gelangen, genügt eine einfache Vorbehandlung: Durch zweieinhalbstündige Ätherextraktion war es möglich, den Gehalt an Verunreinigungen eines Faltenfilters von 130 µg auf ca. 4 µg zu drücken. Nur die Hauptkomponenten der Verunreinigung waren jetzt noch erkennbar. Nach zweimaliger Ätherextraktion oder einer zweiten Extraktion mit Äthanol waren ins Gewicht fallende Verunreinigungen nicht mehr nachweisbar.

Herkunft von weiteren Verunreinigungen: Ausscheidungsprodukte der Haut werden bereits beim Falten eines Rundfilters übertragen. Diese Ausscheidungsprodukte enthalten vorwiegend Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe¹⁴⁾, insbesondere Squalen¹⁴⁾, und Cholesterin. Besonders gefährlich ist es, ein von Lösungsmittel benetztes Faltenfilter mit den Fingern in den Trichter zu drücken und dann weiteres Lösungsmittel nachzugießen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die Unterstützung unserer Arbeiten durch eine Sachbeihilfe, der Firma Carl Schleicher & Schüll für die Überlassung des Filtermaterials und die bereitwilligen Auskünfte bei allen auftretenden Fragen.

Beschreibung der Versuche

Nachweis der Verunreinigungen in Filtern

Um das Einschleppen von Verunreinigungen aus anderen Quellen auszuschließen, wurde bei der Untersuchung der Filterpapiere wie folgt verfahren:

Zur Extraktion der Filter wurde Äther verwendet, der vorher zweimal sorgfältig über KOH abdestilliert wurde. Vor der Extraktion wurde eine Ätherprobe bis auf einen Tropfen eingengt und dann im Kombinationsgerät auf den Gehalt an anderen organischen Verbindungen geprüft.

Die verwendeten Glasgeräte wurden nach Spülen mit konz. Schwefelsäure, Waschen mit dest. Wasser und Nachspülen mit zweimal dest. rückstandsfreiem Methanol 12 Stdn. mit zweimal dest. Äther extrahiert.

¹⁴⁾ U. P. Schlunegger und G. Spittler, unpubliziert.

Die Filter wurden unangebrochenen Packungen mit einer gleichfalls sorgfältig gereinigten Pinzette entnommen. Berührt man die Filter mit den Fingern, so werden hierbei Spuren von Hautausscheidungsprodukten vom Filter absorbiert. Man findet dann neben den Verunreinigungen des Papiers hauptsächlich Squalen und Cholesterin¹⁴⁾.

Die Filter wurden 150 Min. im Soxhlet-Apparat mit bidestilliertem Äther extrahiert. Der Auszug wurde im Rotationsverdampfer eingeeengt und durch ein vorher extrahiertes Faltenfilter in ein sorgfältig gereinigtes Glasröhrchen gebracht. Durch diese Filtrieroperation wurden beim Extrahieren in den Äther gelangte Papierfasern abgetrennt. Da beim Filtrieren ein Teil der extrahierten Stoffe vom Filter absorbiert wird, sind die ermittelten Mengen an Verunreinigungen nur als unterer Grenzwert zu betrachten. Die gefundenen Werte sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Der im Glasröhrchen befindliche Äther wurde unter Stickstoff bei Raumtemperatur abgedampft.

Tab. 4. In verschiedenen Filtern vorhandene, mit Äther extrahierbare Substanzmengen

Filtertyp	Ätherlösliche organische Verbindungen $\mu\text{g/l}$ Filter
Selecta-Rundfilter Nr. 595, \varnothing 9 cm	96
Selecta-Faltenfilter Nr. 595 $\frac{1}{2}$, \varnothing 9 cm	130
Selecta-Faltenfilter Nr. 595 $\frac{1}{2}$, \varnothing 12.5 cm	167

Um verläßliche Werte zu erhalten, wurden die Extrakte von je 100 Filtern gewogen und der Wert für ein Filter daraus berechnet.

Die erhaltenen Rückstände wurden zunächst in einem CH-7-Massenspektrometer, das mit einem Varian Aerograph Modell 1700 über einen Biemann-Watson-Separator gekoppelt war, untersucht. Die Probe wurde direkt auf eine 1.5 m lange Glassäule (Innendurchmesser 1/8") gespritzt. Die Säule war mit 2% SE 30 auf Varaport 100/120 mesh gefüllt.

Als Trägergas diente Helium (20 ccm/Min.). Es wurde von einer Anfangstemp. von 100° um 10° pro Min. bis zu einer Endtemp. von 300° aufgeheizt (Einspritzblocktemp. 220°).

Vor jeder Messung wurde mit reinem Lösungsmittel überprüft, daß das Gerät keine Memory-Effekte zeigte. Nur wenn das Gaschromatogramm der Blindprobe eine saubere Grundlinie aufwies, wurde die äthanolische Lösung des Filterextraktes eingespritzt.

Um die Identifizierung der Substanzen noch besser abzusichern, wurden alle Proben nochmals in einen Gaschromatographen, der mit einem hochauflösenden SM-1 B-Massenspektrometer gekoppelt war, eingespritzt. Von jeder Fraktion wurden mit hoher Auflösung Photoplattenspektren aufgenommen. Aus den niederaufgelösten Spektren wurden die zur Identifizierung wichtigen Schlüsselbruchstücke herausgesucht und ihre Masse auf der Photoplatte mit Hilfe eines Abbe-Komparators Modell B (Jenoptik Jena GmbH) ermittelt⁷⁾.

[103/71]