

PAPIERCHROMATOGRAPHIE ÄTHERISCHER ÖLE

I. EIN NEUES VERFAHREN ZUR DIREKTEN PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG ÄTHERISCHER ÖLE AUF IMPRÄGNIERTEM PAPIER

G. RICHTER* UND P. MUSCHOLL

München (Deutschland)

(Eingegangen den 25. September 1963)

In einer Kurzmitteilung¹ berichteten wir über ein neues papierchromatographisches Trennverfahren für unbehandelte ätherische Öle und deren Bestandteile, das auch eine direkte photometrische Bestimmung ohne Elution ermöglicht. Die vorliegende Arbeit bringt eine ausführliche Beschreibung dieses Verfahrens**.

BESCHREIBUNG DES VERFAHRENS

Adsorbierendes Chromatogrammpapier

Da die Trennung ätherischer Öle auf unbehandeltem Chromatographierpapier bisher praktisch undurchführbar war, versuchten wir ein geeignetes Papier mit hydrophoben und adsorptiven Eigenschaften herzustellen, das sich für solche Trennungen eignete. Wir wählten zunächst Phenolkunstharze verschiedener Polymerisationsstufen. Mit den gebräuchlichen Fließmitteln war jedoch immer noch eine mehr oder weniger starke Löslichkeit der eingelagerten Phenoplaste zu beobachten. Nach zahlreichen Experimenten bewährte sich dagegen in Fortführung früherer Arbeiten^{2,3} eine direkte Imprägnation des Papiers mit Paraformaldehyd. Als Ausgangsmaterial verwendeten wir nach Testung anderer Papiersorten Ederol 208 der Fa. J. C. Binzer, Hatzfeld/Eder. Durch die Imprägnierung erhielt das Papier ausser einem beachtlichen Adsorptionsvermögen hydrophobe und ionenaustauschende Eigenschaften. Die Reissfestigkeit im nassen Zustand war gegenüber den unbehandelten Papieren erhöht.

Vergleiche ergaben, dass das imprägnierte Papier bei Verwendung geeigneter Fließmittel etwa die gleichen Trennleistungen aufweist wie Kieselgel G-Dünnschichtplatten⁴⁻⁸. Die Trennung der Terpenalkohole Geraniol, Linalool und Citronellol gelingt z.B. jedoch auf unserem Papier*** wesentlich besser (Fig. 1).

Die Entwicklungsdauer reicht an die kurzen Zeiten der Dünnschichtchromatographie heran. Für Routineuntersuchungen lässt sich auch die Rundfilterchromatographie heranziehen (Fig. 2).

* Dr. Günther Richter, 8 München 15, Platenstr. 6, Deutschland.

** Die densitometrischen Bestimmungen werden in einer weiteren Arbeit beschrieben.

*** Das Papier wird nach unseren Angaben von der Fa. J. C. Binzer, Hatzfeld/Eder (Deutschland), unter der Bezeichnung Ederol 208/P hergestellt.

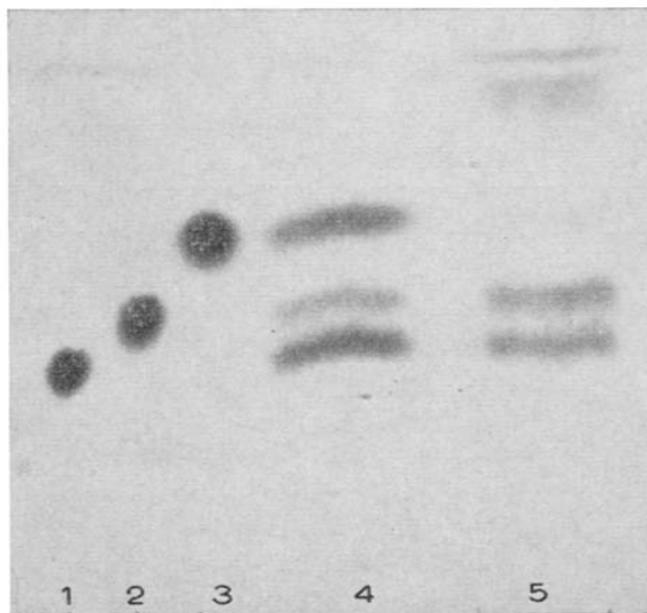


Fig. 1. Papierchromatogramm eines ägyptischen Geraniumöles (Trennung von Geraniol, Citronellol und Linalool). Methode: aufsteigend mit Fließmittel 5 auf mit Paraformaldehyd imprägniertem Papier; Laufzeit: 90 Min.; Anfärbung: Osmiumtetroxid. 1 = Geraniol; 2 = Citronellol; 3 = Linalool; 4 = Gemisch aus Geraniol, Citronellol und Linalool; 5 = ägyptisches Geraniumöl.

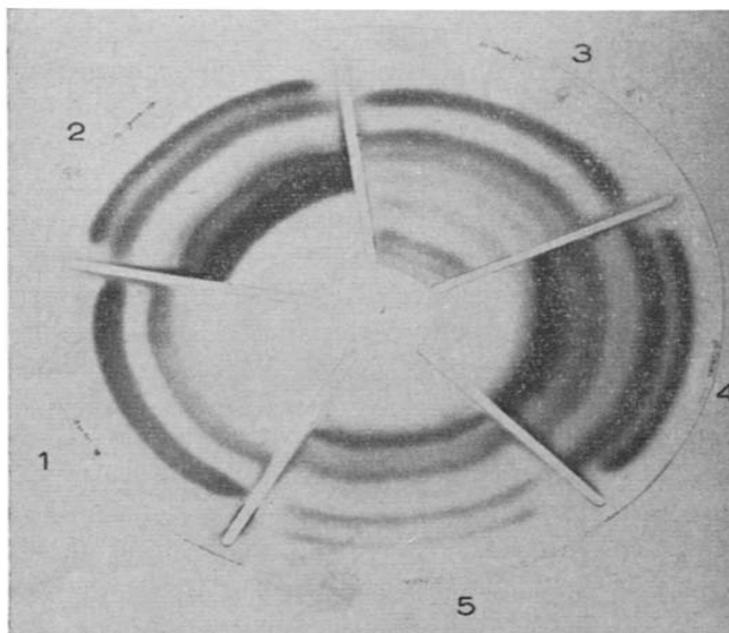


Fig. 2. Rundfilterchromatogramm von diversen ätherischen Ölen. Fließmittel: 1; Laufzeit: 20 Min.; Anfärbung: Osmiumtetroxyd, Antimon(V)-chlorid und 2,4-Dinitrophenylhydrazin nacheinander (Front am Ende der gestanzten Löcher). 1 = Lavendelöl Mt. Blanc; 2 = afrikanisches Geraniumöl; 3 = Neroliöl; 4 = javanisches Citronellöl; 5 = Melissenöl des Handels.

Chromatographiearten

Für die meisten Aufgaben hat sich die aufsteigende Methode bewährt (Fig. 3). Dabei genügt eine Laufstrecke von 15–18 cm. Eine gute Absättigung der Kammer verkürzt die Laufzeiten und verbessert die Trennungen. Sie wird erreicht durch Auskleiden der Kammerwände mit Filtrierpapier, das mit der mobilen Phase getränkt ist.

Für besonders schwierige Trennaufgaben ist die absteigende Chromatographie heranzuziehen, so z.B. zur sauberen Unterscheidung der Substanzpaare Geraniol-Farnesol und Anisaldehyd-Zimtaldehyd (Fig. 4).

Bei Serienanalysen ist die Rundfilterchromatographie die Methode der Wahl. Als Kammern können dabei Exsikkatoren oder Petrischalen⁹ dienen. Da die Petrischalen nicht abdichtbar sind, muss ein möglichst grosses Uhrglas als Behälter für das Fließmittel verwendet werden, damit die Kammeratmosphäre weitgehend gesättigt wird. Der Docht soll nicht dicker als etwa 2 mm sein, um gleichmässig schmale Zonen zu erhalten. Packschnur von der Dicke einer Präpariernadel ist für kleine Rundfilter (14.5 cm Durchmesser) gut geeignet. Die Laufzeit beträgt 20–45 Min. je nach Durchmesser des Rundchromatogramms, mit Fließmittel 1. (Siehe Tabelle II.)

Fließmittel

Die ausgearbeiteten Gemische sind einphasig. Für die Chromatographie der meisten ätherischen Öle eignet sich eine Mischung von *n*-Hexan–*n*-Heptan–Eisessig. Dieses System lässt sich durch Zusatz von Toluol (a) oder mehr *n*-Heptan (b) so verändern, dass die R_F -Werte beliebig erhöht (a) oder gesenkt (b) werden können. Speziell für Lavendel-, Lavandin- und Spiköle hat sich Cyclohexan–Äthylacetat oder auch Trichloräthylen bewährt. Die Trennung der Alkohole Geraniol, Linalool und Citronellol gelingt mit *n*-Heptan–Methylisopropylketon-Gemisch (siehe Tabelle II).

Anfärbeverfahren

Versuche, die bei der Dünnschichtchromatographie von ätherischen Ölen gebräuchlichen aggressiven Reagenzien auch hier zu verwenden, verliefen positiv. Weder Antimon-(III)- und Antimon-(V)-chlorid⁵, noch Anisaldehyd–Schwefelsäurereagens führten zu einer Beschädigung des Papiers. Die dabei nötigen Temperaturen bis 90° wurden von dem Papier vertragen. Wegen seiner Empfindlichkeit besonders hervorgehoben sei die Anfärbung ungesättigter Bestandteile mit Osmiumtetroxid¹⁰.

Gegenüber den Dünnschichtplatten bietet das Papier den Vorteil, dass empfindliche Reagenzien, die ein nachträgliches Auswaschen erfordern, Verwendung finden können. So reagierten die geradkettigen Aldehyde wesentlich empfindlicher mit Feulgens Reagens¹⁰ als mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Auch liess sich die sehr empfindliche alkalische Kaliumpermanganatlösung zur Detektion heranziehen. Bewährt hat sich die aufeinanderfolgende Anwendung von drei Reagenzien. Zuerst werden die Chromatogramme mit Osmiumtetroxiddampf behandelt, wodurch ungesättigte Verbindungen grau bis schwarz gefärbt werden. Dasselbe Chromatogramm wird anschliessend mit einer Antimon-(V)-chloridlösung besprüht, womit sich die Phenole wie Thymol, Carvacrol und andere Stoffe als rotviolette bis braune Flecke anfärben. Durch Aufsprühen einer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung¹² werden schliesslich Aldehyde und Ketone als gelbe bis rotorange Flecke sichtbar gemacht. Auf diese Weise ist eine schnelle chemische Differenzierung möglich.

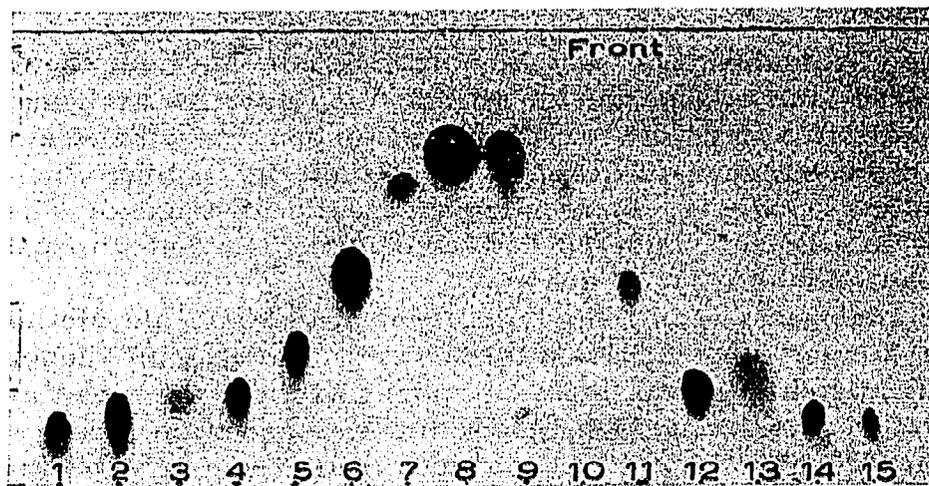


Fig. 3. Aufsteigendes Papierchromatogramm von einzelnen Testsubstanzen. Fließmittel: 1; Laufzeit: 45 Min.; Anfärbung: Osmiumtetroxid, Antimon(V)-chlorid und 2,4-Dinitrophenylhydrazin nacheinander. 1 = Carvacrol; 2 = Farnesol; 3 = Anisaldehyd; 4 = Caryophyllen + viel Eugenol; 5 = Linalool; 6 = Carvon; 7 = Safrol; 8 = Anethol; 9 = Linalylacetat; 10 = Citronellal; 11 = Citral; 12 = Eugenol; 13 = Zimtaldehyd; 14 = Geraniol; 15 = Thymol.

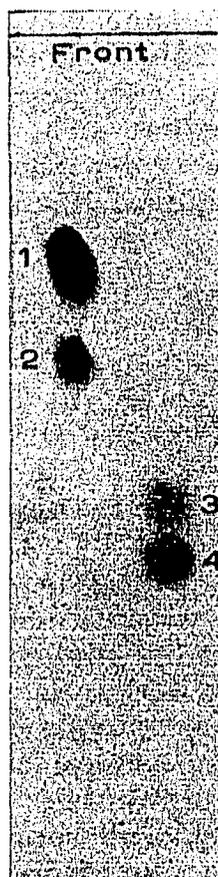


Fig. 4. Absteigend auf mit Paraformaldehyd imprägniertem Papier angefertigtes Chromatogramm zur Trennung von Farnesol(1)-Geraniol(2) und Anisaldehyd(3)-Zimtaldehyd(4). Fließmittel: 1; Laufzeit: 4 Std. (23°); Anfärbung: Osmiumtetroxid und 2,4-Dinitrophenylhydrazin nacheinander.

Die unterste Nachweisgrenze im sichtbaren Licht liegt im Mittel bei 1 μg . Sie ist z.B. für Thymol und Carvacrol 0.5 μg , für Zimtaldehyd 0.1 μg , für Carvon 0.2 μg und für Linalylacetat 2 μg .

R_F-Werte

Die in Tabelle I angegebenen *R_F*-Werte stellen Mittelwerte aus je 10 Bestimmungen dar und wurden ohne "Kammerübersättigung" bei 23° ermittelt.

TABELLE I
R_F-WERTE

Verbindung	Fließmittel				
	Aufsteigend				Absteigend
	1	2	3	4	4
Anethol	0.84	0.85	0.80	0.87	—
Anisaldehyd	0.33	0.30	0.25	0.45	0.43
Carvacrol	0.34	0.30	0.22	0.27	—
Carvon	0.62	0.63	0.55	0.70	—
Citral	0.58	0.56	0.54	0.63	—
Citronellal	0.77	0.75	0.74	0.82	—
Eugenol	0.39	0.38	0.31	0.41	—
Farnesol	0.43	0.53	0.20	0.31	0.73
Geraniol	0.37	0.52	0.24	0.28	0.61
Linalool	0.50	0.50	0.39	0.47	—
Linalylacetat	0.82	0.94	0.78	0.83	—
Safrol	0.79	0.82	0.74	0.78	—
Thymol	0.35	0.33	0.19	0.28	—
Zimtaldehyd	0.37	0.36	0.28	0.49	0.37

EXPERIMENTELLER TEIL

Fließmittel (Tabelle II)

Als Standardgemisch, geeignet für die meisten ätherischen Öle, kann System 1 bezeichnet werden. Die Systeme 2, 3 und 4 besitzen ebenfalls universelle Anwendbarkeit. Die Gemische 5, 6 und 7 sind für spezielle Trennaufgaben heranzuziehen.

TABELLE II
ENTWICKLUNGSSYSTEME

Nr.	Lösungsmittel	Volumenteile
1	<i>n</i> -Heptan- <i>n</i> -Hexan-Eisessig	15:15:2
2	<i>n</i> -Heptan-Eisessig	15:1
3	<i>n</i> -Heptan-Eisessig	20:0.5
4	Toluol- <i>n</i> -Heptan	1:1
5	<i>n</i> -Heptan-Methylisopropylketon	20:5
6	Cyclohexan-Äthylacetat	97:3
7	Trichloräthylen	

Methodik

Als Chromatographierkammern für die aufsteigende Chromatographie wurden die von HÖRHAMMER UND WAGNER⁹ vorgeschlagenen Rundgläser von 5 l Inhalt ver-

wendet. Zur völligen Sättigung der Atmosphäre werden die Wände jeder Kammer mit einem tropfnass mit dem Fliessmittel getränkten Filtrierpapier (37 × 17 cm) ausgekleidet. Das Fliessmittel — etwa 30 ml — befindet sich in einer Petrischale von 12.5 cm Durchmesser.

Für die absteigende Methode werden Glaskammern von 62 cm Höhe, 52 cm Länge und 21 cm Breite benutzt. Auch hier ist mit getränktem Filtrierpapier für eine völlige Sättigung der Kammeratmosphäre zu sorgen.

Zum Auftragen der Substanzlösungen verwendet man am zweckmässigsten fein ausgezogene Glaskapillaren.

Aufzutragende Mengen

Ätherische Öle werden mit *n*-Heptan, Benzol o.ä. im Volumenverhältnis 1 + 9 verdünnt und von dieser Lösung etwa 0.005–0.01 ml in einem möglichst kleinen Fleck oder Strich mit einem Zwischenraum von je 1.5–2 cm aufgetragen.

Reine Testsubstanzen werden 1 + 29 verdünnt und davon etwa 0.001–0.005 ml aufgebracht. Die Testsubstanzen und die ätherischen Öle müssen wasserfrei sein. Eventuell sind sie nachzutrocknen. Chloroform als Verdünnungsmittel erscheint uns nicht geeignet, da eine rasche Zersetzung zahlreicher Bestandteile in den Verdünnungen zu beobachten ist.

Laufzeiten

Aufsteigende Chromatogramme benötigen mit Fliessmittel 1, bei einer Laufhöhe von 15 cm bei 23°, etwa 45 Min., mit Fliessmittel 5, bei einer für die Trennung von Geraniol, Citronellol und Linalool in Citronell-, Geranium- und Melissenölen ausreichenden Höhe von 20 cm, 90 Min.

Eine für die absteigende Methode genügende Laufstrecke von 37 cm wird mit dem Gemisch 1 in 4 Std. zurückgelegt.

Bei einem Rundfilter von 14.5 cm Durchmesser dauert die Entwicklung des Chromatogramms mit dem System 1 bei Verwendung eines Doctes mittlerer Saugfähigkeit etwa 20 Min.

Nachweisreagenzien

Osmiumtetroxid. Das Chromatogramm wird nach dem Entwickeln und kurzem Abdunstenlassen des Fliessmittels 30–60 Min. lang in eine dicht schliessende Kammer gebracht und darin dem Osmiumtetroxiddampf ausgesetzt, der aus 0.25 g Osmiumtetroxid erzeugt wird.

Antimon(III)-chlorid. Das Chromatogramm wird auf Vorder- und Rückseite mit einer 10 %igen Lösung von Antimon(III)-chlorid in Chloroform besprüht bis es feucht erscheint und anschliessend 15 Min. auf 85° im Trockenschrank erhitzt. Ein nachträgliches kurzes Wässern zum Entfernen der freigewordenen Salzsäure ist für die Haltbarkeit des Chromatogramms über längere Zeiträume vorteilhaft.

Antimon(V)-chlorid. 10 %ige Lösung von Antimon(V)-chlorid in reinem Tetrachlorkohlenstoff. Es wird wie bei der SbCl₃-Lösung besprüht. Die volle Farbtintensität der Flecken wird bei Zimmertemperatur innerhalb von 15 Min. erreicht.

2,4-Dinitrophenylhydrazin. 0.1 %ige Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthanol, die 1 Vol. % konz. Salzsäure enthält.

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. 1.5 Volumenteile Anisaldehyd und 1.5

Volumenteil konz. Schwefelsäure, die in 97 Volumenteil Methanol gelöst sind. Damit wird das Chromatogramm besprüht und anschliessend bei 50° im Trockenschrank bis zum Erscheinen der Flecken getrocknet.

Kaliumpermanganat. Das Chromatogramm wird in eine Mischung aus gleichen Volumenteil 5%iger wässriger Kaliumpermanganat- und 2%iger Sodalösung getaucht. Anschliessend wird in fließendem Wasser der Reagenzüberschuss ausgewaschen und das Chromatogramm bei 100° im Trockenschrank getrocknet.

Feulgen-Reagenz. Das Chromatogramm taucht man 15 Min. in eine Fuchsin-schweflige Säurelösung, die 0.25 g Fuchsin/l enthält und durch Zusatz von schwefliger Säure gerade entfärbt ist. Der Überschuss an Fuchsin wird mit einer 0.05 M wässrigen SO₂-Lösung dreimal je 15 Min. ausgewaschen.

DISKUSSION

Wenn man von der in den letzten Jahren möglich gewordenen Mikroanalyse ätherischer Öle durch die Gaschromatographie absieht, stellt die vorliegende Methode das erste brauchbare Verfahren dar, um ätherische Öle und deren Bestandteile *direkt* auf Papier aufzutrennen und anschliessend durch Densitometrie quantitativ auszuwerten. Ausser der densitometrischen Bestimmung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen verschiedener Aldehyde und Ketone auf Papier durch SCHULTE UND STORP¹¹⁻¹³, machte HEFENDEHL¹⁴ auf der Grundlage der qualitativen Arbeiten von STAHL⁴⁻⁸ einen ersten Versuch in dieser Richtung auf Dünnschichtplatten. Er bestimmte dabei den Menthofurangehalt in Pfefferminzölen. Es wurde hierbei jedoch die photographische Reproduktion der Chromatogramme herangezogen. Wie schon KAUFMANN UND HENNIG¹⁵ fanden jedoch auch wir, dass dieses auch von MIRAM UND PFEIFER¹⁶ für die Bestimmung von Alkaloiden benutzte Verfahren wegen der Empfindlichkeitsschwankungen des Photomaterials nicht die gewünschte Reproduzierbarkeit aufweist.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von YORK¹⁷ wird wohl die Möglichkeit einer densitometrischen Auswertung von Harzen und Balsamen auf Dünnschichtplatten mittels eines Reflexionsdensitometers berichtet, doch werden keine verfahrenstechnischen Einzelheiten genannt. Gegenüber der Densitometrie auf Papier dürften die Fehlergrenzen wohl höher liegen.

Mit dem von uns entwickelten Papier haben wir dagegen die Möglichkeit, eine densitometrische Bestimmung mit dem bereits in jeder grösseren Klinik bei der Serum-Eiweiss-Analyse bewährten, von GRASSMANN UND HANNIG¹⁸ entwickelten Durchstrahl-Densitometer* auszuführen. Der Chromatographie braucht dabei nicht erst die zeitraubende Herstellung des Trägermaterials und seine Aktivierung voranzugehen. Weitere Vorteile des Papiers gegenüber der Dünnschichtplatte sind die einfachere Dokumentation, die reproduzierbaren R_F -Werte, die einfache Rundfilterchromatographie und die besseren Ergebnisse bei der Trennung der oben genannten Terpenalkohole, sowie die Möglichkeit der absteigenden Chromatographie. Mit der Dünnschichtplatte hat unser Papier die kurze Laufzeit und die gute Trennfähigkeit gemeinsam.

* Das Gerät wird unter dem Namen Elphor-Integrapp von der Fa. Dr. Bender & Dr. Hobein, München, Deutschland, vertrieben.

DANK

Wir danken Herrn Prof. Dr. L. HÖRHAMMER, Direktor des Instituts für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, für gewährte Unterstützung dieser Arbeit. Unser besonderer Dank gilt den Firmen Dragoco und Haarmann und Reimer in Holzminden, der Fa. Frey und Lau in Hamburg-Bahrenfeld, die uns Proben ätherischer Öle und Testsubstanzen zur Verfügung stellten. Ausserdem bedanken wir uns bei der Fa. J. C. Binzer, Hatzfeld/Eder für die freundliche Überlassung von Papiermustern.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Imprägnierung mit Paraformaldehyd wurde ein stark adsorbierendes Chromatographierpapier erhalten, mit dem es möglich ist, in kürzester Zeit ätherische Öle mit üblichen Fließmitteln zu trennen. Dabei sind die auf-, absteigende und erstmals mit nicht vorbehandelten Ölen auch die zirkuläre Methode in gleicher Weise einfach durchzuführen. Es ergeben sich reproduzierbare R_F -Werte. Die Trennfähigkeit und die Einheitlichkeit des Papiers erlauben, es für direkte densitometrische Bestimmungen zu verwenden.

SUMMARY

Chromatography paper with strong adsorbing properties was obtained by impregnation with paraformaldehyde. With this paper essential oils can be separated very rapidly using the common solvents. Ascending or descending development is possible, as well as the circular method, this being the first instance of application of the latter method to untreated oils. The R_F values obtained are reproducible. The separating ability and the homogeneity of the paper make it possible to carry out densitometric determinations directly.

LITERATUR

- ¹ L. HÖRHAMMER, G. RICHTER UND H. WAGNER, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 108.
- ² L. HÖRHAMMER, H. WAGNER UND G. RICHTER, *Biochem. Z.*, 331 (1959) 155.
- ³ L. HÖRHAMMER UND G. RICHTER, *Biochem. Z.*, 332 (1959) 186.
- ⁴ E. STAHL, *Pharmazie*, 11 (1956) 633.
- ⁵ E. STAHL, *Chemiker Ztg.*, 82 (1958) 323.
- ⁶ E. STAHL, *Parfuem. Kosmetik*, 39 (1958) 564.
- ⁷ E. STAHL, *Pharm. Rundschau*, 1 (1959) 1.
- ⁸ E. STAHL, *Angew. Chem.*, 19 (1691) 646.
- ⁹ L. HÖRHAMMER UND H. WAGNER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 101 (1961) 779.
- ¹⁰ M. H. HACK, *Biochem. J.*, 54 (1953) 602.
- ¹¹ K. E. SCHULTE UND C. B. STORP, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 63 (1961) 908.
- ¹² K. E. SCHULTE UND C. B. STORP, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 57 (1955) 600.
- ¹³ K. E. SCHULTE UND C. B. STORP, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 58 (1956) 35.
- ¹⁴ F. W. HEFENDEHL, *Planta Med.*, 8 (1960) 65.
- ¹⁵ H. P. KAUFMANN UND H. J. HENNIG, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 63 (1961) 908.
- ¹⁶ R. MIRAM UND S. PFEIFER, *Pharm. Zentralhalle*, 96 (1957) 457.
- ¹⁷ H. YORK, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 102 (1962) 1163.
- ¹⁸ W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Z. Physiol. Chem.*, 290 (1952) 1.