

Zur Identifizierung flüchtiger Substanzen aus biologischem Material mit Hilfe der CLSA (Closed Loop Stripping Apparatus)

**Eberhard Lorbeer, Michael Mayr, Bernadette Hausmann
und Karl Kratzl***

Institut für Organische Chemie, Universität Wien,
A-1090 Wien, Österreich

(Eingegangen 9. Februar 1984. Angenommen 5. März 1984)

Identification of Volatile Constituents from Biological Material by the Stripping Method (CLSA)

In contrast to previous investigations the closed loop stripping apparatus is used to determine the components of the volatile leaf oil of *Picea sp.* The samples, obtained by this extraction, were separated on glass capillary columns and identified by GC/MS. Finally, the advantages of this method, compared with the conventional steam-distillation, and the composition of some problematic constituents are discussed.

(*Keywords: Volatile leaf oil composition; Terpenoids; Glass capillary-GLC, GC/MS*)

Einleitung

Zur Untersuchung von möglichst unverändertem biologischem Material (in diesem Fall Pflanzenmaterial) hat sich als rasche und schonende Extraktionsmethode eine von *K. Grob*¹, ursprünglich für die Spurenanalytik von Verunreinigungen im Trinkwasser entwickelte Apparatur „Closed Loop Stripping Apparatus“ (CLSA), bestens bewährt. Bisher hatte man zur Gewinnung der etherischen Öle aus Pflanzenmaterial meistens die Wasserdampfdestillation verwendet²: Für eine vollständige Abtrennung wird etwa eine Dauer von 3 bis 24

* Herrn Prof. Dr. *K. Schlögl* zum 60. Geburtstag gewidmet.

Stunden benötigt. Die Destillationsdauer für pulverisiertes Pflanzenmaterial der Kiefer beträgt 3 Stunden³, für unzerkleinerte Coniferennadeln 24 Stunden⁴. Die Nachteile dieser Methode sind die Temperaturbelastung des Extraktionsgutes, relativ hoher Material- und Zeitaufwand sowie die fehlende Aussage über die relative Flüchtigkeit der im Extrakt gefundenen Substanzen.

Mit Hilfe der oben erwähnten neuen Methode kann einerseits das gesamte Spektrum flüchtiger Substanzen des etherischen Öls erfaßt werden, andererseits auch die tatsächliche Emission eines unverletzten Pflanzenorgans⁵. Diese spielt vor allem für die Insektenabwehr bzw. -anlockung⁶, Krankheitsresistenz⁷, menschliche Allergien sowie Wechselwirkungen mit antropogenen Schadstoffen in der Atmosphäre⁸ eine signifikante Rolle. Darüber hinaus könnte auch die akute Problematik des Waldsterbens untersucht werden.

Bei dieser Methode wird frisches Pflanzenmaterial in das Probengefäß eingebracht und die von der Pflanze emittierten organischen Substanzen werden solange an Aktivkohle angereichert, bis auch Spurenkomponenten für eine massenspektrometrische Analyse zugänglich sind bzw. ein quantifizierbares Gaschromatogramm liefern. Die angereicherten Mengen bewegen sich dabei im Nanogrammereich!

Ergebnisse und Diskussion

Im Vergleich zur bisher verwendeten Wasserdampfdestillation ist für diese Methode signifikant, daß der Anteil an stark flüchtigen Monoterpenen sowie nichtterpenoiden, leichtflüchtigen Verbindungen in den CLSA-Proben höher ist. Der Grund liegt in der schonenden Aufarbeitung bei niedriger Temperatur und kürzerer Extraktionszeit. Eine Ausnahme bildet Santen, welches in der Literatur als terpenoider Conifereninhaltsstoff beschrieben wird⁹⁻¹¹. Trotz seines hohen Dampfdruckes konnte es im CLSA-Extrakt nicht nachgewiesen werden. Biosynthetisch wird Santen laut Angaben von *Banthorpe*¹² vermutlich aus Campher gebildet. Unsere Untersuchungen legen aber die Vermutung nahe, daß Santen erst während der Wasserdampfdestillation durch Umlagerung aus anderen Terpenen entsteht.

Ein weiterer Unterschied zwischen CLSA-Extrakt und Wasserdampfdestillation liegt in der unterschiedlichen Menge an oxidierten Verbindungen: Während der Gehalt an Campher im Wasserdampfdestillat ungefähr gleich dem in der CLSA-Probe ist, ist der prozentuelle Anteil von Terpinen-4-ol und Borneol im WDD immer höher.

Als weiterer Vorteil kann das Fehlen von schwerflüchtigen Verbindungen (Diterpenoide) im CLSA-Extrakt angesehen werden.

Tabelle 1. *Zusammensetzung der flüchtigen hydrophoben Nadelinhaltsstoffe, erhalten durch Wasserdampfdestillation (WDD) und mit Hilfe des „Closed Loop Stripping Apparatus“ (CLSA)*

Peak Nr.	Substanz	WDD	%	CLSA
1	nicht identifiziert	0,95		1,35
2	Hexanal	5,04		2,28
3	Santen	2,37		—
4	Tricyclen	1,21		1,47
5	α -Pinen	10,84		13,20
6	Camphen	13,39		15,70
7	β -Pinen	8,87		8,52
8	Myrcen	3,64		4,79
9	α -Phellandren	0,11		0,08
10	Δ^3 -Caren	0,10		0,05
11	1,8-Cineol, β -Phellandren	6,24		8,53
12	Limonen	19,08		22,23
13	nicht identifiziert	0,71		—
14	γ -Terpinen	0,12		0,25
15	nicht identifiziert	—		0,05
16	Campher	2,55		2,67
17	Terpinen-4-ol	2,36		1,72
18	Borneol	3,47		1,67
19	α -Terpineol	0,98		0,26
20	nicht identifiziert	0,90		0,37
21	Isobornylacetat	8,37		7,99
22	Monoterpenalkohol	1,13		1,21
23	Longifolen	0,80		0,90
24	Caryophyllen	0,59		0,82
25	Humulen	0,37		0,54
26	Sesquiterpen	0,18		0,19
27	Sesquiterpen	0,28		0,10
28	Cadinen	1,91		0,43
29	Sesquiterpen	0,21		—
30	Sesquiterpenalkohol	0,36		—
31	Sesquiterpenalkohol	0,30		—

Gaschromatographische Messungen

In Tab. 1 sind die prozentuellen Verteilungen der flüchtigen hydrophoben Nadelinhaltsstoffe der Fichte (*Picea species*) angeführt. Die angegebenen Mengen sind Mittelwerte aus zwei Stichproben eines willkürlich gewählten Baumes, die durch Integration der FID-Gaschromatogramme erhalten wurden.

Abb. 1 zeigt das Gaschromatogramm eines CLSA-Extrakttes, Abb. 2 das Gaschromatogramm einer Anreicherung der flüchtigen Komponenten durch Wasserdampfdestillation.

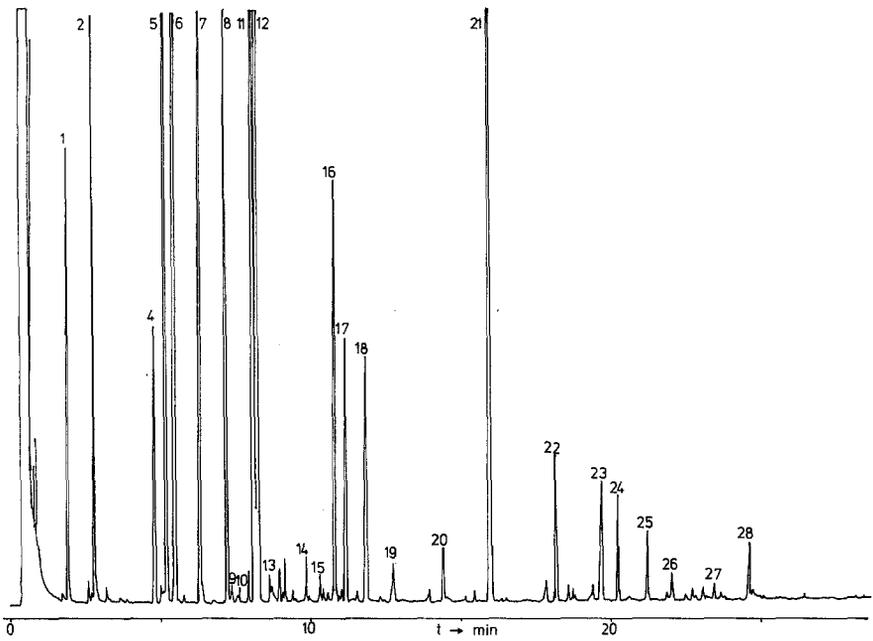


Abb. 1. FID-GC des CLSA-Extraktes, 20 m SE 30, 30° (2' iso)/4°/200°, 0,5 bar H₂, Peak-Numerierung wie in Tab. 1

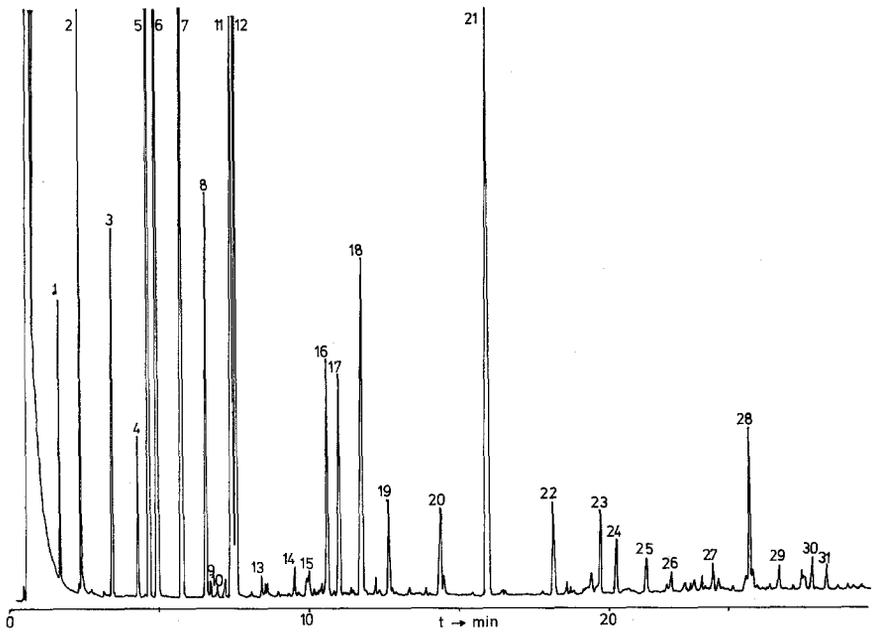


Abb. 2. FID-GC des WDD-Extraktes, 20 m SE 30, 30° (2' iso)/4°/200°, 0,5 bar H₂, Peak-Numerierung wie in Tab. 1

Dank

Wir danken Herrn Prof. E. Führer, Universität für Bodenkultur, und Herrn Prof. H. Kinzel, Universität Wien, für die Diskussion und Frl. N. Zelman für ihre Mitarbeit. Weiters danken wir Herrn Dr. A. Nikiforov für die Aufnahme der GC/MS-Kopplungsspektren.

Experimenteller Teil

Prinzip des CLSA (Closed Loop Stripping Apparatus)

Die Probe befindet sich in einem thermostatisierbaren Glasgefäß. Mit Hilfe einer Membranpumpe wird nun kontinuierlich Gas (Luft oder Inertgas) durch ein Aktivkohlefilter im Kreis gepumpt. Substanzen mit genügend hohem Dampfdruck gehen in die Gasphase über und werden an der Aktivkohle adsorbiert. Durch Variation der Temperatur und der Laufzeit der Gasphasenextraktion („Stripping Time“) können verschieden flüchtige Komponenten angereichert werden.

Die adsorbierten Substanzen werden mit wenig Lösungsmittel eluiert. Die erhaltene Lösung kann dann ohne weitere Behandlung einer gaschromatographischen Analyse unterworfen werden.

Gasstripping von frischem Coniferenmaterial

3 g Coniferenmaterial (von *Picea abies*) werden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Reibschale pulverisiert. Nach Einbringen in das Probengefäß der CLSA wird bei einer Badtemperatur von 30 °C 60 min lang extrahiert. Wichtig ist, daß bei Verwendung einer inneren Thermostatisierungsflüssigkeit kein Lösungsmittel verwendet wird, in dem die anzureichernden Verbindungen gut löslich sind. In diesem Fall werden zwar die zu untersuchenden Substanzen leichter aus dem Coniferenmaterial herausgelöst, aber ein Überführen in die Gasphase ist umso schwieriger.

Nach Ablauf der „Stripping Time“ wird das Aktivkohlefilter mit insgesamt 30 µl *n*-Hexan mehrmals eluiert. Die Verwendung eines polarerer Lösungsmittels (Methylenchlorid, Methanol) erwies sich in unserem Fall als nicht notwendig.

Wasserdampfdestillation

Parallel zu der CLSA-Methode wurde mit gleichem Probematerial eine Wasserdampfdestillation durchgeführt (Destillationsaufsatz nach Europäischem Arzneibuch¹³). Die benötigte Probenmenge ist hier jedoch mindestens zehnmal so groß (30 g), und die minimalste Destillationsdauer beträgt 4 h. Das auf diese Weise gewonnene ölhaltige Destillat wird viermal mit je 1 ml *n*-Hexan ausgeschüttelt, die vereinigten Extrakte über Natriumsulfat getrocknet und ebenfalls gaschromatographisch analysiert.

Gaschromatographische Analysen

Gaschromatograph: Fractovap 4160 (Carlo Erba).

Säule: selbst hergestellte Glaskapillarsäule, Länge 20 m (I.D. 0,32 mm), deaktiviert mit Hexamethyldisilazan, belegt mit SE 30 (Filmdicke 0,3 µm)¹⁴.

Trägergas: Wasserstoff (Fluß 3 ml/min).

Injektor: 220 °C, 1 ml Verdampfungsraum, Split 1 : 30.

Detektor: FID mit „make up“-Gas (N₂), 330 °C.

Temperaturprogramm: 2 min isotherm bei 30 °C, dann mit 4°/min bis 200 °C.
Integration: Integrator LDC 301 mit externem Speicher (Floppy Disc, 2 Megabyte) der Fa. Commodore.

Identifizierung der Substanzen

Die Identifizierung der einzelnen Komponenten gelang mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung.

Gaschromatographischer Teil: wie oben, nur mit Helium als Trägergas (Fluß 6 ml/min).

Massenspektrometer: Varian MAT 311 A mit EI-Ionenquelle (70 eV).

Die aufgenommenen Massenspektren wurden dann mit Hilfe von Vergleichsspektren den einzelnen Verbindungen zugeordnet.

Literatur

- ¹ *Grob K., Zürcher F.*, J. Chromatogr. **117**, 285 (1976).
- ² *v. Rudloff E.*, Can. J. Bot. **45**, 891 (1967).
- ³ *Ekundayo O.*, J. Chrom. Sci. **16**, 294 (1978).
- ⁴ *Pauly G., v. Rudloff E.*, Can. J. Bot. **49**, 1201 (1971).
- ⁵ Unveröffentlichte Ergebnisse.
- ⁶ *Vité J. P.*, Biologie in u. Zeit **8**, 112 (1978).
- ⁷ *Hanover J. W.*, Ann. Rev. Entomol. **20**, 75 (1975).
- ⁸ *Kohlmaier G. H., Bröhl H., Siré E. O.*, Allg. Forst u. J.-Ztg. **154**, 170 (1983).
- ⁹ *v. Rudloff E.*, Phytochem. **14**, 1695 (1975).
- ¹⁰ *Adams R. P., Granat M., Hogge L. R., v. Rudloff E.*, J. Chrom. Sci. **17**, 75 (1979).
- ¹¹ *v. Rudloff E.*, Can. J. Bot. **50**, 1595 (1972).
- ¹² *Banthorpe D. V., Charlwood B. V., Francis M. J. O.*, Chem. Rev. **72**, 115 (1972).
- ¹³ Ph. Eur., Band III, 62.
- ¹⁴ *Grob K., Grob G., Grob K., Jr.*, J. HRC & CC. **2**, 31 (1979); **2**, 677 (1979); **3**, 493 (1980).