

1. Theoretischer Hintergrund	2
1.1 Sekundärmetabolite	2
1.1.1 Alkaloide.....	5
1.1.2 Isoprenoide (Terpenoide)	8
1.1.3 Phenole	13
1.2 Ätherische Öle	17
2. Versuchsdurchführung.....	19
3. Ergebnisse.....	21
4. Diskussion	23
5. Zusammenfassung	24

1. Theoretischer Hintergrund

1.1 Sekundärmetabolite

Pflanzen produzieren im sogenannten Primärmetabolismus die für sie essentiellen **Primärmetabolite** wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Fette und Nukleotide. Zusätzlich produzieren sie aber auch eine große Menge an unterschiedlichsten Stoffen, die keine direkt erkennbare Funktion im Wachstum oder der Entwicklung der Pflanze haben, die **Sekundärmetabolite**. Die Bedeutung dieser Stoffe war lange Zeit unbekannt, erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden die Sekundärmetabolite auf Grund ihrer Wirkungen als Medikamente, Gifte, Aromastoffe und ihrer Anwendungsmöglichkeiten in der Industrie besser untersucht. So wurden auch die ökologischen Funktionen dieser Substanzen für die Pflanze erkannt: sie dienen zum Beispiel als Fraßschutz, zur Immunabwehr, als Farb- und Aromastoffe zum Anlocken von Insekten oder anderen Tieren zur Bestäubung und auch als Hormone. Viele der pflanzlichen Sekundärmetabolite können von Menschen pharmazeutisch genutzt werden.

Allgemein werden organische Verbindungen, die von der Pflanze produziert werden, aber nicht essentiell für die Entwicklung oder das Wachstum der einzelnen Zellen sind, als Sekundärmetabolite bezeichnet, es sind bisher mehr als zwanzigtausend solcher Stoffe bekannt. Chlorophyll gehört beispielsweise zu den Sekundärstoffen, da es nur in den photosynthetisch aktiven Zellen vorkommt.

Im Gegensatz zu den Primärmetaboliten, die im ganzen Pflanzen-, im Tierreich und bei den Mikroorganismen fast ubiquitär vorkommen, sind die Sekundärstoffe teilweise sogar spezifisch für Arten, Gattungen oder einzelne Gewebe. Manche Substanzen werden auch nur in einem bestimmten Entwicklungsabschnitt von der Pflanze produziert.

Jedoch ist eine Unterscheidung der Pflanzenmetabolite nicht immer ganz einfach, da die Biosynthesewege nicht eindeutig vom Primärstoffwechsel getrennt werden können (gemeinsame Reaktionsschritte, Nutzung gleicher Enzymsysteme) und manche Stoffe wie Lignin, Suberin und Cutin für die Pflanze essentiell sind und trotzdem auch Sekundärmetabolit-Aufgaben wie den Fraßschutz übernehmen.

Man kann die Sekundärmetabolite, die meist eine kompliziertere Struktur als die Primärmetabolite aufweisen, auf Grund der Bausteine ihrer Biosynthese in wenige Gruppen einteilen. Die große Vielzahl der Sekundärmetabolite entsteht erst durch spätere chemische Modifikationen wie Hydroxylierung, Methylierung, Einlagerung von Metallionen, etc.

Es gibt drei chemisch unterschiedliche Gruppen, die **Stickstoffhaltigen Sekundärprodukte** (Alkaloide, Amine, Aminosäuren, cyanogene Glucoside, etc.), die **Terpenoide** (z.B. Carotinoide, Saponine) und die **Phenole** (z.B. Flavonoide, Chinone).

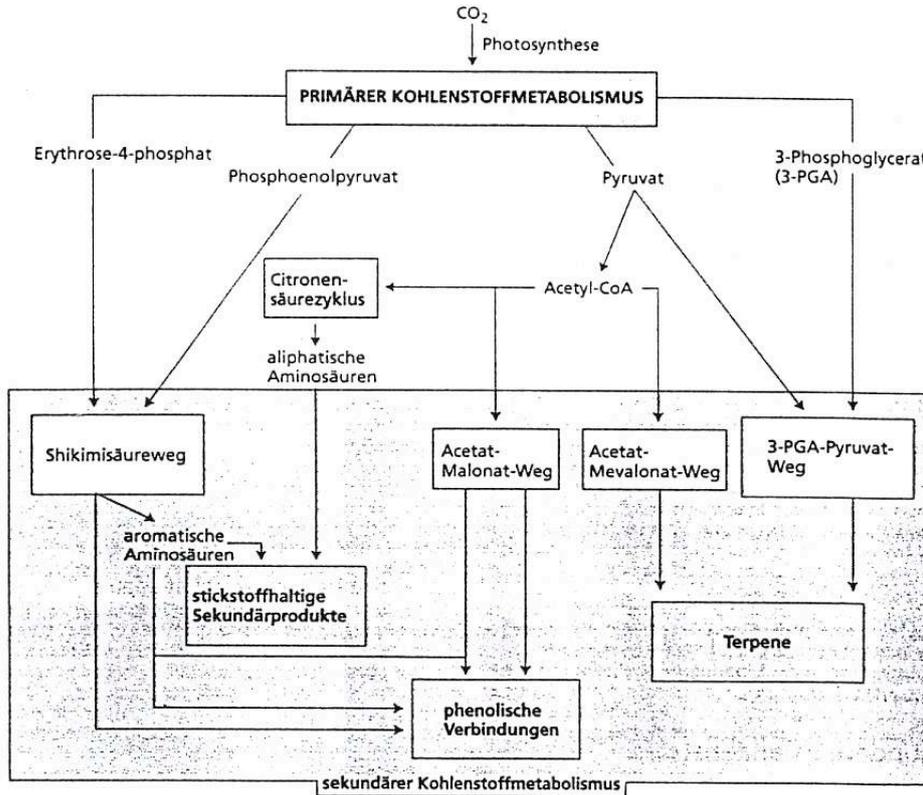


Abb.1: Schematische Darstellung der Biosynthesewege der Sekundärmetabolite
 Aus: Taiz/Zeiger Physiologie der Pflanzen, S.350, Spektrum akad. Verlag 2000

Oft werden die phenolischen Substanzen aber auch nach ihrer physiologischen Bedeutung klassifiziert: es gibt **Blütenfarbstoffe** (z.B. Anthocyanin, Flavon, etc.), **Fruchtfarbstoffe** (Anthocyanin, Isoflavon und Chalcon), **Fraßschutz-Stoffe** (z.B. Chinon, Tannin), **Fungizide** (z.B. Isoflavon, Phenolkarbonsäure, etc.), **Phytoalexine** (Stilben, Isoflavan, Furocumarin, etc.), die als Antwort auf einen Pathogenbefall ausgeschüttet werden, und **allelopathische Agentien** (Chinon, Phenol, etc.), die das Auskeimen der Samen anderer Pflanzen verhindern.

Ein entscheidender Stoffwechselweg der Pflanzen zur Biosynthese der aromatischen Aminosäuren ist der **Shikimatweg**. Er gehört zum Primärstoffwechsel, aber die drei gebildeten Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Thyrosin dienen als Ausgangsstoffe vieler Sekundärmetabolite (Lignin, Flavonoide und Alkaloide).

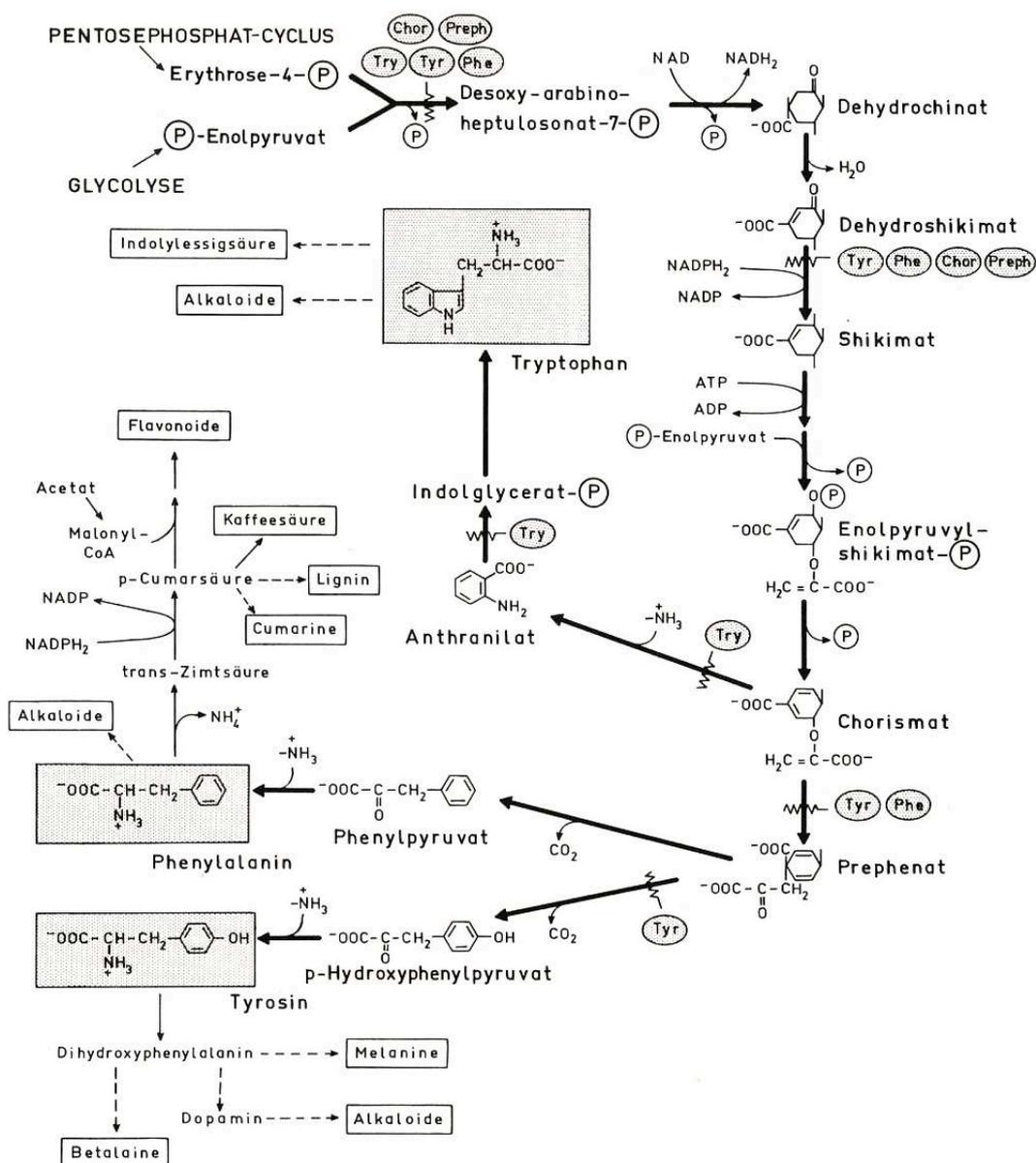


Abb.2: Shikimatweg

(Mohr, Schopfer: Pflanzenphysiologie, Springer-Verlag, 4.,
völlig neubearbeitete und aktualisierte Auflage 1992) S.290

Über verschiedene Zwischenstufen entsteht Shikimisäure (Shikimat), an die PEP (Phosphoenol-Pyruvat) angelagert wird. Ab hier spaltet sich der Weg dann auf in die Synthese der Phenylbrenztraubensäure, der Vorstufe des Phenyylalanins, und die Synthese der P-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, der Vorstufe des Tyrosins. Aus diesen Vorstufen werden durch Einwirkung des Enzyms Ammoniumlyase Cumarsäure und Zimtsäure, von denen sich die Phenylpropane ableiten.

Ë aus Phenylalanin entstehen durch Eliminierung der Aminogruppe die Zimtsäure und ihre Derivate (z.B. phenolische Alkohole des Lignins, Flavonoide), aus Tyrosin werden die dunklen Melaninpigmente, die Alkaloide und andere Sekundärmetabolite gebildet.

Im Folgenden wollen wir einen genaueren Überblick über die wichtigsten Sekundärmetabolite geben:

1.1.1 Alkaloide

Die Alkaloide sind die häufigste Stoffgruppe der Sekundärmetabolite, über 10000 verschiedene Alkaloide sind bekannt. Sie sind in den Angiospermen weit verbreitet, hier kommen sie besonders in den Wurzeln, Blättern und Früchten vor, viele davon sind pharmazeutisch nutzbar. Bekannte Alkaloide sind zum Beispiel Coffein, Nikotin, Kokain, Morphin, Chinin und Atropin.

Es ist nicht einfach, die Alkaloide zu charakterisieren, da es sich bei ihnen um eine sehr große und sehr komplexe Stoffgruppe handelt. Typischerweise reagieren Alkaloide basisch und sind in der Regel heterozyklische Verbindungen, in deren Struktur Stickstoff in einer negativen Oxidationsstufe enthalten ist.

Weitere Merkmale sind die oftmals toxische Wirkung und die Ableitbarkeit vom Aminosäurestoffwechsel. Außerdem sind die Alkaloide kein Bestandteil makromolekularer Zellsubstanzen, haben keine Vitamin- oder Hormonwirkung und werden meistens als leichtlösliche Salze verschiedener Säuren in den Vakuolen der Zellen gespeichert.

Aber natürlich gibt es auch für diese Merkmale wieder viele Ausnahmen.

Deswegen ist eine genauere Zuordnung der Alkaloide nur mit der Kenntnis ihrer Biosynthese möglich, so unterscheidet man zwischen den **echten Alkaloiden**, Derivaten der Aminosäuren Lysin, Ornithin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, und den **Pseudoalkaloiden**, die meist aus isoprenoiden Verbindungen entstehen (z.B. Polyketid- und Peptidalkaloide).

Tab.1: Beispiele für echte Alkaloide

Aminosäure - derivat	Alkaloid	Struktur	Beispiel
Lysin und Ornithin	Chinolizidin- Alkaloide	C-Grundgerüst	Lupanin
	Nicotiana- Alkaloide	Pyridinring +Pyrrolidinring	Nicotin
		Pyridinring +Piperidinring	Anabasin
	Tropan- Alkaloide	Pyrrolidinring +C3/C4-Kette	Atropin/Cocain
Phenylalanin und Tyrosin	Amaryllidaceae- Alkaloide		Colchicin
	Betalaine		Chinin, Strychnin
	Isochinolin- Alkaloide	Isochinolin- Grundgerüst	Morphin, Codein
Tryptophan	Indol- Alkaloide		Chinin
	Purin- Alkaloide	Purinringe	Coffein, Theobromin

Ein Beispiel für ein Pseudoalkaloid ist das Coniin, das Gift des Schierlings (*Conium maculatum*), das die sensiblen und motorischen Nervenendigungen lähmt und im Altertum ein beliebtes Hinrichtungsmittel war.

Ein Beispiel für ein echtes Alkaloid ist das Colchizin, das in der Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*) vorkommt und die Zellen an der Ausbildung eines Spindelapparats hindert, weswegen es auch in der Gentechnologie zur Herstellung polyploider Zellen verwendet wird.

Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über einige Alkaloide, ihre Struktur und die Aminosäuren, aus denen sie gebildet werden:

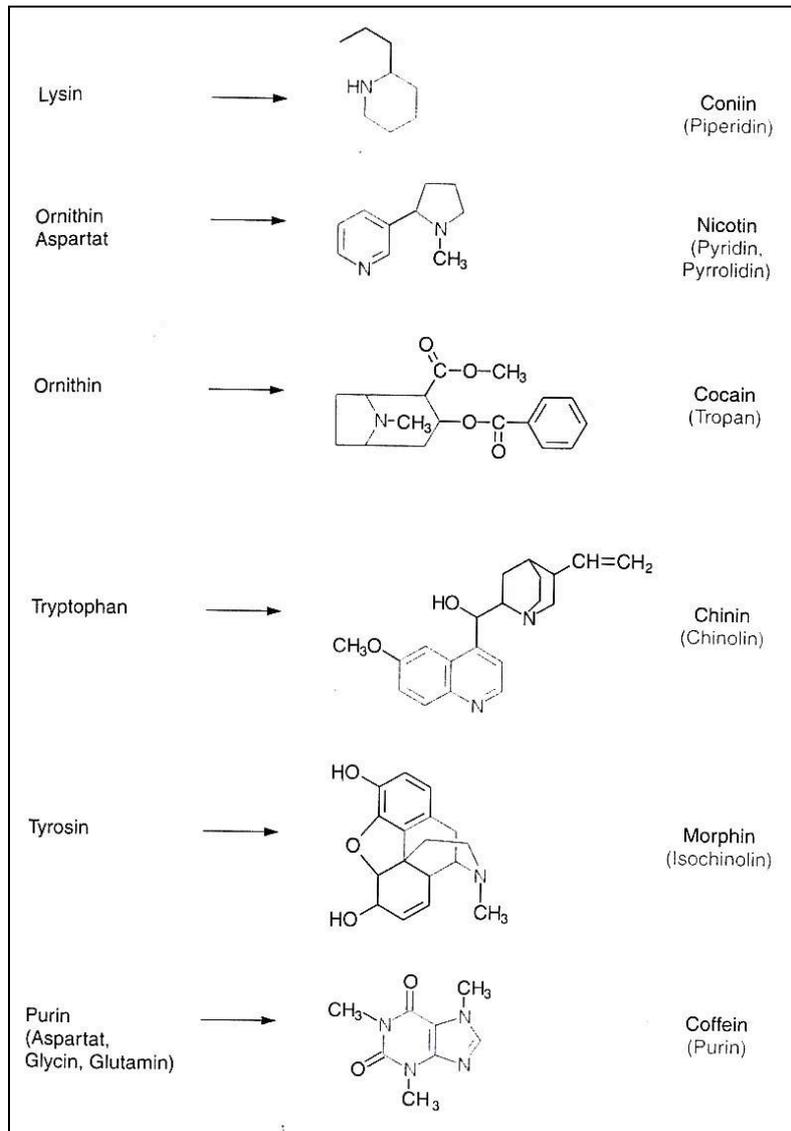


Abb.3: Überblick über einige Alkaloide und die Aminosäuren, aus denen sie gebildet werden (Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996, S.403)
(in den Klammern die Bezeichnungen der Grundgerüste)

Oft dienen die Alkaloide der Pflanze als Wehrsubstanzen zum Schutz vor Fraßschädlingen. Viele der Alkaloide können vom Menschen pharmazeutisch genutzt werden, so wurden im Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus*) Alkaloide gefunden, die das Wachstum von Krebszellen hemmen; Atropin, ein Stoff aus der Tollkirsche *Atropa belladonna*, wird schon seit Jahrhunderten in der Medizin und bei der Schönheitspflege genutzt.

In die Gruppe der Stickstoffhaltigen Verbindungen, zu denen auch die Alkaloide gehören, zählen zum Beispiel auch die cyanogenen Glucoside. Ein Beispiel hierfür ist das in den Wurzeln und Kernen des Pfirsichs vorkommende Amygdalin. Die cyanogenen Glucoside werden als stabile Verbindungen in Kompartimenten der Zellen gelagert. Kommt es, z.B.

durch Tierfraß, zu Verletzungen der Zelle und die cyanogenen Glucoside kommen mit dem Enzym Glucosidase, das in anderen Kompartimenten gelagert ist, in Berührung, entstehen Blausäure (HCN). Sie ist ein extrem starkes Atemgift, da sie die Cytochrom-Oxidase hemmt, weswegen der Verzehr von Pfirsichkernen oder bitteren Mandeln für Menschen tödlich sein kann.

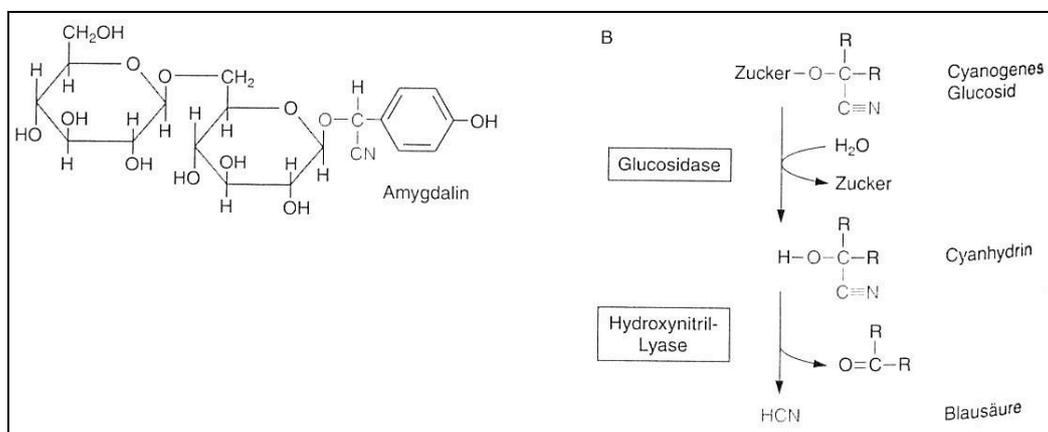


Abb.4: Amygdalin, Entstehung von Blausäure
(Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996)

Es gibt aber auch Tiere, in deren Körper Alkaloide vorkommen. Dabei muss man aber zwischen den Tieren, die die Substanzen selbst herstellen, und jenen, die sie nur mit ihrer Nahrung aufnehmen, unterscheiden. So kann die Erdkröte (*Bufo bufo*) das Bufotenin selbst produzieren und die Raupen des Kleinen Bären nehmen gezielt Blätter des Greiskrauts (*Senecio*) zu sich, die Pyrrolizidalkaloide enthalten und die die Raupen vor dem Gefressen-Werden schützen.

1.1.2 Isoprenoide (Terpenoide)

Obwohl die Isoprenoide in allen Organismen vorkommen, sind sie in den Pflanzen besonders häufig, es sind über 23000 verschiedene Verbindungen bekannt.

Viele Isoprenoide gehören zum Primärstoffwechsel, da sie zum Beispiel Bestandteile der Zellmembranen oder der Elektronentransportketten und damit essentiell sind. Dennoch ist der größere Teil der isoprenoiden Verbindungen dem Sekundärmetabolismus zuzurechnen, da sie Bestandteile von ätherischen Ölen, Harzen und Milchsäften sind, die zur Abwehr von Fraßschädlingen dienen. Viele dienen auch als Antibiotika und werden erst bei einer

Bakterien- oder Pilzinfektion gebildet, sind Bestandteile von Blüten- und Duftfarbstoffen oder haben allelopathische Funktionen.

Wir Menschen können Isoprenoide aus Pflanzen zum Beispiel als Nahrungsmittel-Aromastoffe, als Vitamine (A, E, D), als natürliche Insektizide (z.B. Pyrethrin) oder als Lösungsmittel (z.B. Terpentin) nutzen.

Der Grundbaustein der Isoprenoide, das Isopren (siehe Abb.6), ist ein C5-Molekül. Je nachdem, wie viele Isoprene aneinandergereiht sind, unterscheidet man Hemi-, Mono-, Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra- und Polyterpene.

Tab.2: Isoprenoide (Terpenoide)

Terpenoid	Struktur	Form	Beispiel
Hemiterpene	C5-Körper		Isopren, Cumarin
Monoterpene	2 C5-Körper	offen	Geraniol
		monocyclisch	Menthol, Limonen
		bicyclisch	□-, □-Pinen
Sesquiterpene	3 C5-Körper	offen	Farnesol
		cyclisch (mono-, bi-, tri-, tetra-)	Abscisinsäure
Biterpene	4 C5-Körper	offen	Phytol
		cyclisch	Gibberelin
Triterpene	6 C5-Körper	offen	Squalen
		cyclisch	Steroide
Tetraterpene	8 C5-Körper		Carotinoide
Polyterpene	n C5-Körper		Kautschuk

Sekundärmetabolite - Ätherische Öle

Vorstufe	Klasse	Beispiele	Funktion
C₅ : Dimethylallyl-PP Isopentenyl-PP	Hemiterpen	Isopren Seitenkette des Cytokinins	Schutz des Photosyntheseapparats vor Hitze Wachstumsregulator
C₁₀ : Geranyl-PP	Monoterpen	Pinen Linalool	Abwehrstoff Lockstoff
C₁₅ : Farnesyl-PP	Sesquiterpen	Capsidiol	Phytoalexin
C₂₀ : Geranylgeranyl-PP	Diterpen	Gibberelline Phorbol Casben	Pflanzenhormone Abwehrstoff Phytoalexin
C₃₀ : 2 Farnesyl-PP	Triterpen	Cholesterin Sitosterin	Membranbausteine
C₄₀ : 2 Geranylgeranyl-PP Geranylgeranyl-PP oder Farnesyl-PP	Tetraterpene Polyprenoide	Carotinoide prenylierte Proteine Prenylierung von Plastochinon, Ubichinon, Chlorophyll, Cyt-a Dolichole Kautschuk	Photosynthesepigmente Regulation des Zellwachstums Membranlöslichkeit von Photosynthese- pigmenten und Elektronentransport- überträgern Glycosylüberträger

Abb.5: Isoprenoide höherer Pflanzen (Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996)

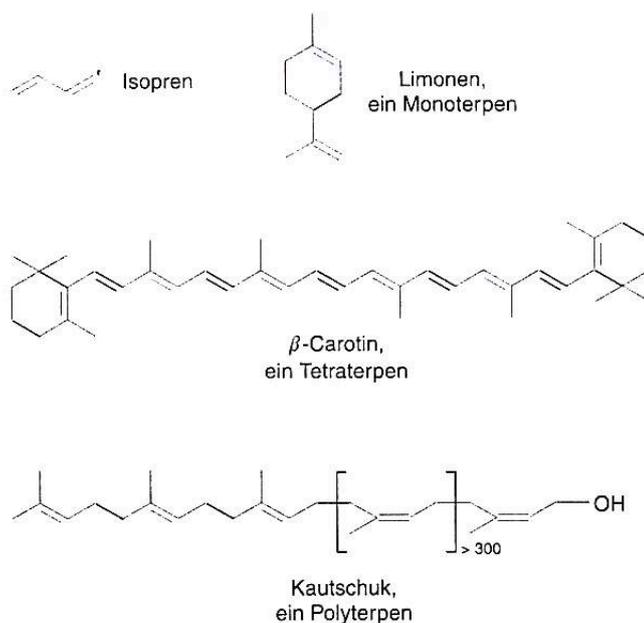


Abb.6: Strukturen verschiedener Isoprenoide
(Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996)

In den höheren Pflanzen (und bei einigen Algen) werden die Isoprenoide sowohl in den Plastiden als auch im Cytosol aus der Vorstufe Isopentenylpyrophosphat gebildet. Für diese Synthese gibt es im Cytosol und in den Plastiden jeweils unterschiedliche Wege:

Im Cytosol ist der Ausgangsstoff für die Isopentenylpyrophosphat-Synthese das Acetyl-CoA, der Weg heißt nach einem Zwischenprodukt **Acetat-Mevalonat-Weg**.

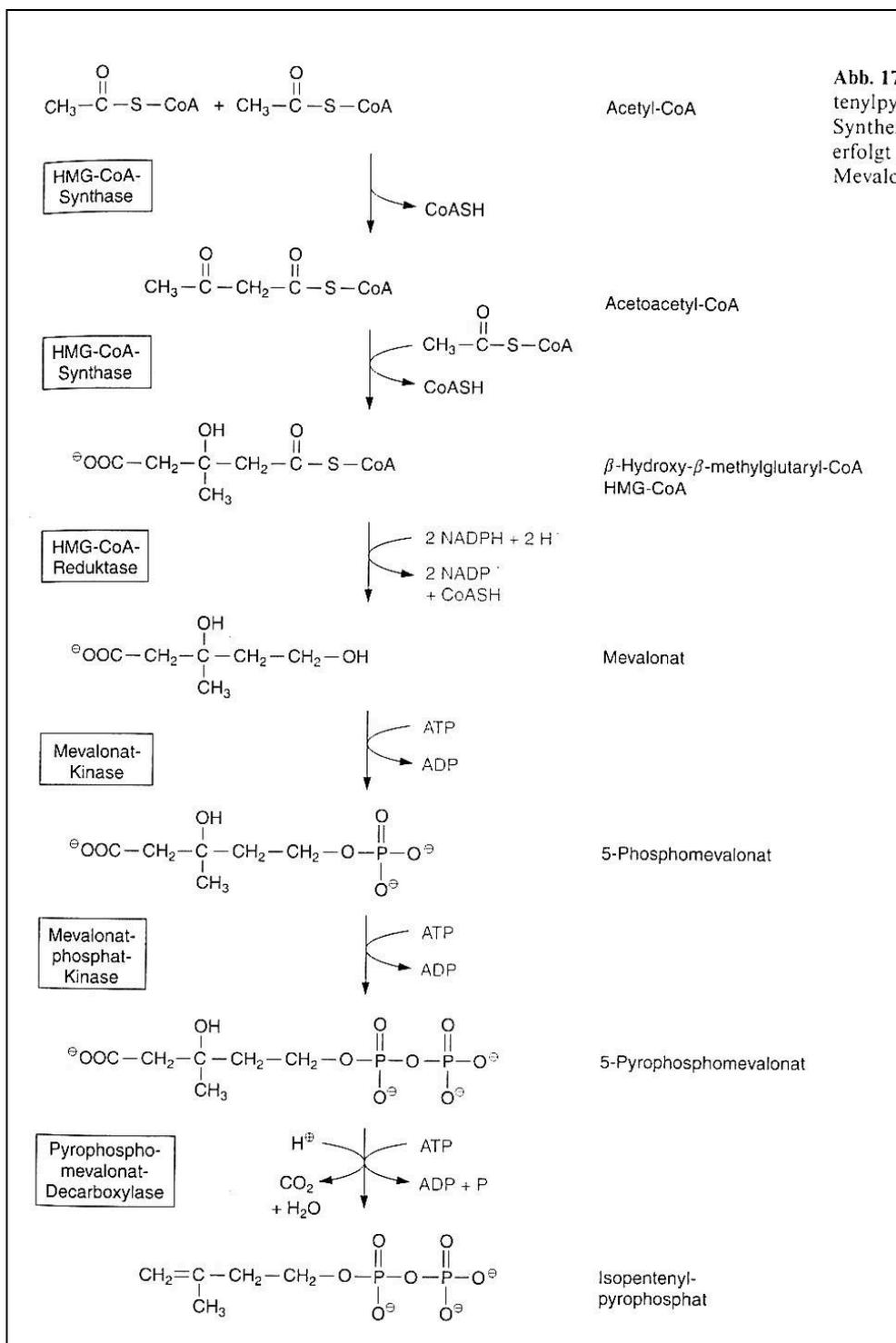


Abb.7: Acetat-Mevalonat-Weg (Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996, S.413)

Bei diesem Weg lagern sich 3 Acetyl-CoA-Moleküle (E C6-Körper) zusammen und werden mit $\text{NADPH}+\text{H}^+$ und unter CoA.-Abspaltung zum Intermediat **Mevalonsäure** hydriert. Aus dieser wird dann über mehrere Zwischenstufen und unter ATP-Verbrauch Isopentenylpyrophosphat (IPP), von dem dann das Pyrophosphat abgespalten wird. So entsteht Geranyl-Pyrophosphat, ein offenkettiges Monoterpen, aus dem viele andere Monoterpene gebildet werden können.

In den Plastiden sind die Ausgangssubstanzen Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat, die im **1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-(DOXP)-Weg** zu Isopentenylpyrophosphat verarbeitet werden.

In der Klasse der Monoterpene gibt es viele Verbindungen, die zu den ätherischen Ölen (siehe 1.2) gezählt werden, sie haben normalerweise einen charakteristischen und oft angenehmen Geruch. So sind die Düfte von Maiglöckchen, Lavendel, Rosen, Thymian oder Fichtennadeln auf die Monoterpene zurückzuführen.

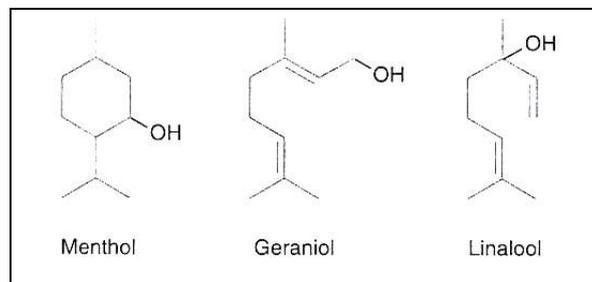


Abb.8: Menthol (Bestandteil von Pfefferminzöl), Geraniol (Bestandteil des Rosenöls, Geranienduftstoff) und Linalool (Korbblütler-Duftstoff) (Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996)

Die Isoprenoide sind außerordentlich lange haltbar, es werden sogar fossile Isoprenoide in Sedimenten und Erdöl gefunden. Die Archaeobakterien haben in ihren Plasmamembranen statt Fettsäureglycrinestern Glycerinether mit Isoprenoidketten. Auf Grund dieser Tatsachen kann man annehmen, dass die Isoprenoide schon zu den Bausteinen sehr früher Lebensformen gehörten.

1.1.3 Phenole

In Pflanzen kommen sehr viele phenolische Substanzen mit den unterschiedlichsten Funktionen vor. Hier lassen sich die **Phenole**, die **Flavonoide**, **Stilbene**, **Tannine**, **Lignane** und **Lignin** aufzählen. Auch in den Substanzen **Suberin** und **Cutin** sind Phenole (zusammen mit langkettigen Carbonsäuren) enthalten.

Tab.3: Phenole

Phenol	Struktur	Beispiel
einfache Phenole	aromatische C6-Ring mit einer/mehreren OH-Gruppen	Hydrochinon
Phenolcarbon- säuren	Hydroxybenzoe- säure, Hydroxy- zimtsäure	Benzoe-, Vanillinsäure
Phenylpropane	aromatischer Ring + C3-Kette (Propan)	Zimtsäure, Cumarine
Flavonoide	2 aromatische Ringe mit C3-Brücke	Flavon

Die Aufgaben dieser Stoffe sind sehr vielfältig, einige Funktionen sind zum Beispiel: antibiotische Wirkung, Pestizide, Anlockung von bestäubenden Tieren, Isolierung und Schutz vor UV-Strahlung, Signalstoffe für die Symbiosebildung mit Pilzen, Stabilität (Zellgerüst) oder Abdichtung der Zellwände.

Cumarine	Antibiotika, Fraßgifte
Lignane	"
Lignin	Zellwandbestandteile
Suberin und Cutin	Bildung von Isolierschichten
Stilbene	Antibiotika, insbesondere Fungizide
Flavonoide	Antibiotika, Signale für Wechselbeziehung mit Symbionten, Blütenfarbstoffe, Lichtschutzsubstanzen
Tannin	Gerbstoffe, Fungizid, Fraßschutz

Abb.9: Einige Funktionen von Phenolen (Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996.)

Für den Aufbau phenolischer Substanzen verwenden die höheren Pflanzen Phenylalanin (auch Tyrosin) aus dem Shikimatweg (Primärstoffwechsel) (siehe Absatz 1.1). Besonders geeignet ist hier das Phenylalanin, da es schon einen Benzolring enthält.

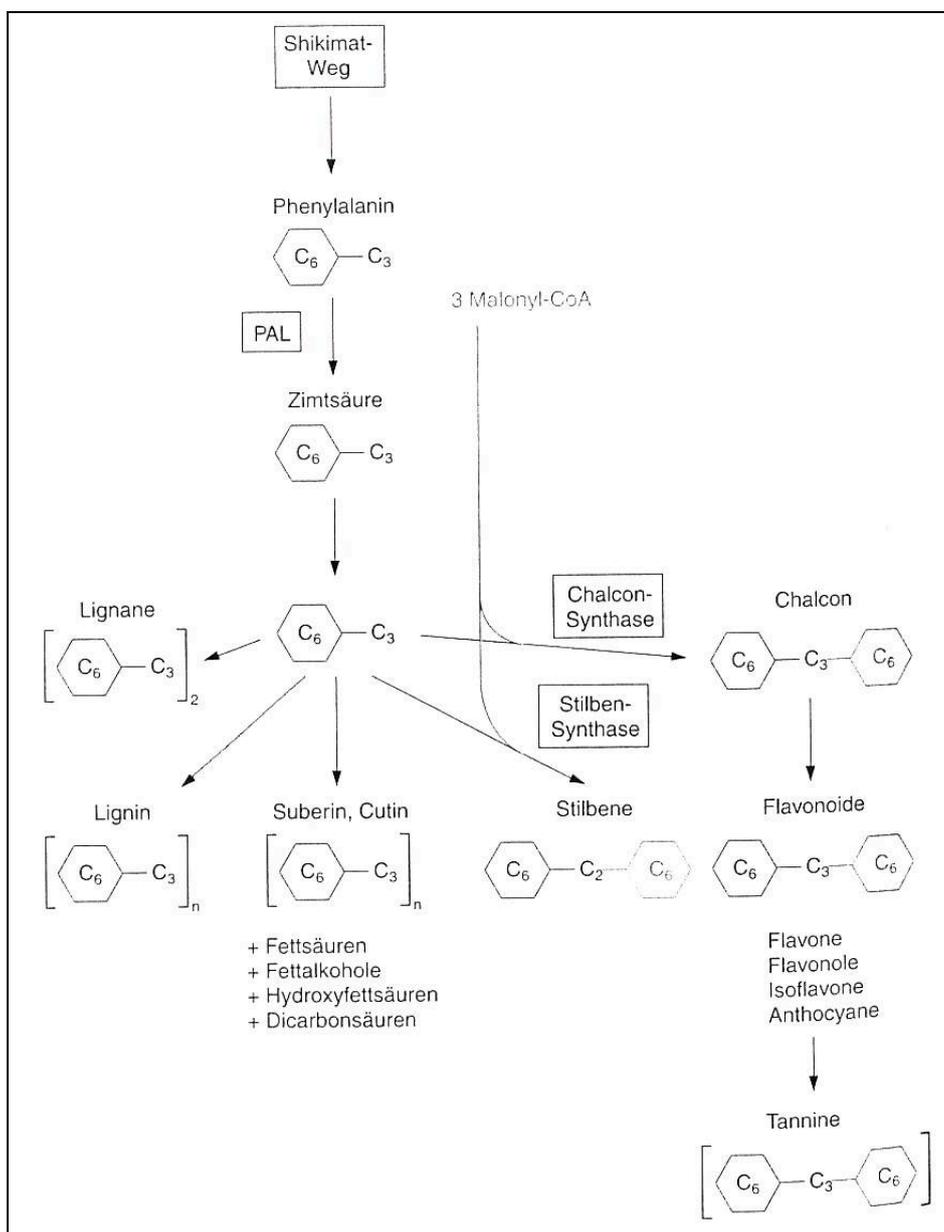


Abb.10: Übersicht über die Produkte des Phenylpropanoidstoffwechsels
(Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996)

Niedere Pflanzen, z.B. Flechten, haben einen alternativen Weg zur Herstellung der Phenole, den Polyketid- oder Malonatweg, bei dem der Ringschluss durch eine lineare Kondensation des Malonyl-CoA und eine Decarboxylierung entsteht.

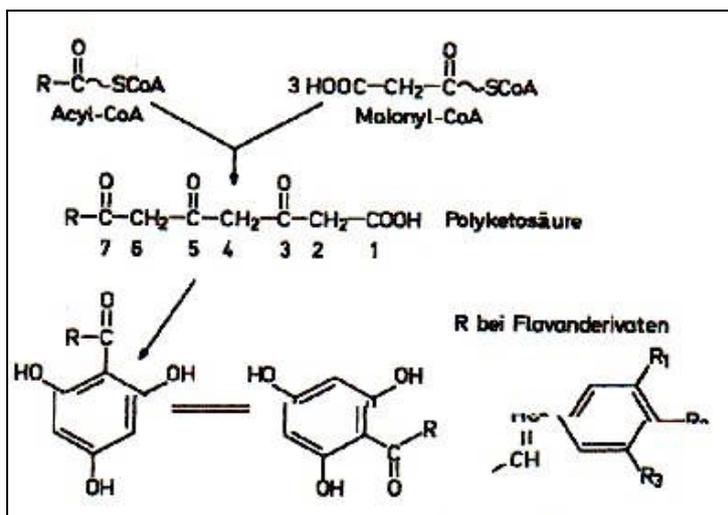


Abb.11 Acetat-Malonat-Weg [aus: altem Protokoll]

In diesem Weg entstehen die phenolischen Verbindungen aus einer Zusammenlagerung mehrerer Acetyl-CoA- bzw. Malonyl-CoA-Moleküle. So entstehen Polyketonsäuren, die durch Zyklisierung Phenol bilden.

Aus Phenylalanin wird unter der Einwirkung des PAL-Enzyms (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) **Zimtsäure** gebildet. Aus dieser entstehen dann die Lignane, Lignin, Suberin und Cutin, die Stilbene, Chalcone und Flavonoide.

Auch die **Cumarine** zählen zu den Phenolen, Moleküle, die zum Beispiel in Waldmeister oder in Heu vorkommen und für den typischen Geruch verantwortlich sind.

Durch die Abspaltung eines C₂-Körpers von Phenylpropan entstehen **Benzoessäure-Derivate**. Ein sehr bekanntes Beispiel hierfür ist die Salicylsäure, die natürlicherweise in der Weide (*Salix sp.*) vorkommt und schmerzlindernde und blutverdünnende Wirkung hat. Sie ist ein wichtiger Bestandteil des Medikaments Acetylsalicylsäure, auch als Aspirin bekannt.

Ein anderes verbreitetes Benzoessäure-Derivat ist der Geschmacks- und Aromastoff Vanillin.

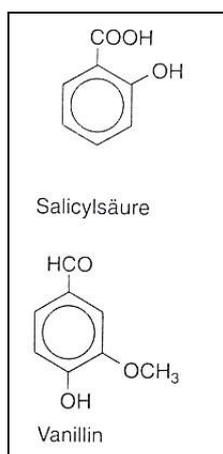


Abb.11: Salicylsäure und Vanillin (Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg 1996)

Unter der Gruppe der **Flavonoide** sind weitere Phenole zusammengefasst. Bei diesen zyklisiert das Grundgerüst Flavanon aus einem Zimtsäurederivat. Viele Flavonoide sind Phytoalexine oder Anthocyane (im Cytosol gelöste Farbstoffe, deren Farbe abhängig vom pH-Wert der Zelle sind und die die Chloroplasten vor Schäden durch zu starke Lichteinstrahlung schützen).

Die **Stilbene**, Diphenylethylen-Derivate, die in Wein, Fichten und Erdnüssen vorkommen, haben stark fungizide Wirkung.

Viele Pflanzen schützen sich auch vor dem Abbau durch Mikroorganismen durch die Einlagerung von **Tanninen**, Gerbstoffen mit Polyphenolstrukturen. Diese binden sich fest an die NH-Gruppen von Proteinen und schädigen diese, wodurch der Mikroorganismus beeinträchtigt wird.

1.2 Ätherische Öle

Die Bezeichnung „ätherische Öle“ ist keine genaue chemische Gruppenbezeichnung; unter dem Begriff „ätherische Öle“ werden, im Gegensatz zu den „fetten Ölen“, flüssige Verbindungen zusammengefasst, die durch Flüchtigkeit („ätherisch“), Lipophilie (Öl) und meistens einen typischen Geruch charakterisiert sind.

Die ätherischen Öle bestehen immer aus einer Mischung mehrerer Substanzen und zwar der Isoprenoide (Mono- und Sesquiterpene) und der Phenole.

Während die Phenole aus den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin gebildet werden, stammen die terpenoiden ätherischen Öle aus dem Acetatstoffwechsel.

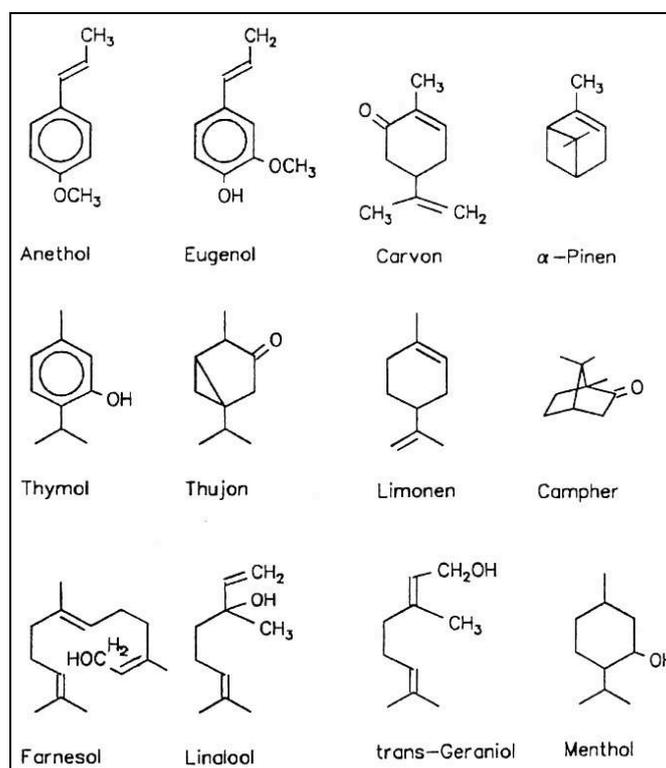


Abb.12: Einige Bestandteile ätherischer Öle (Praktikumsskript, S.14)

Für einige Pflanzenfamilien ist das Vorkommen von ätherischen Ölen charakteristisch, besonders bei den Apiaceae und den Lamiaceae (viele Küchenkräuter!) sind die ätherischen Öle weit verbreitet, ebenso bei den Myrtaceae (z.B. Eugenia, Gewürznelke), Zingiberaceae (Ingwer) und den Asteraceae (Matricaria und Camomilla). In den Pflanzen kommen die ätherischen Öle in allen möglichen Organen wie zum Beispiel den Wurzeln, den Samen,

Früchten und Fruchtschalen oder in den Laub- und Blütenblättern vor. Seltsamerweise kommen ätherische Öle und Alkaloide nicht gemeinsam in einer Pflanze vor.

Die Öle werden meistens in speziellen Drüsenepithelien gebildet und von den Drüsenzellen in schizogene Exkretgänge (durch Fusion von Zellverbänden entstanden), unter die Cuticula oder in lysigene Ölkammern (durch den Zusammenschluss abgestorbener Exkretzellen entstanden) abgegeben. Über Ölvakuolen kann das Öl zwischen Zellwand und Cuticula nach außen abgegeben werden, ist dies nicht möglich, gelangt das Öl über Risse in der Cuticula nach außen. Von einigen Pflanzen wurden zu besseren Sekretabgabe regelrechte Organe ausgebildet, z.B. Drüsenhaare oder –schuppen bei der Pfefferminze.

Die Aufgaben der ätherischen Öle in Pflanzen sind höchst unterschiedlich. So dienen sie der Anlockung von Bestäubern: Geraniol aus Rosen und Geranien ist solch ein Lockstoff, ebenso das Vanillin in der Vanille und anderen Orchideenarten. Auch die Fruchtverbreitung wird durch Gerüche gefördert, in den Bananen ist der Duftstoff Eugenol enthalten.

Manche Pflanzen schütten, wenn sie von einem anderen Organismus angegriffen werden, Stoffe aus, die das Wachstum des Aggressors hemmen. Andere Pflanzen sichern sich ausreichenden Platz und Nährstoffe, indem sie das Wachstum anderer Pflanzen hemmen (Allelopathie). Als Beispiel lassen sich hier Salvia- oder Artemisia-Büsche in der südkalifornischen Steppe nennen, die das Wachstum von Gräsern (Avena, Festuca, Bromus) hemmen. Bei den von den Pflanzen eingesetzten Stoffen handelt es sich um Terpene (Campher, Pinen, Thujon).

Eher seltener ist die Funktion als Fraßschutz, aber zum Beispiel werden Blattschneiderameisen durch in den Pflanzen enthaltenes Limonen verjagt.

Andere Eigenschaften von manchen ätherischen Ölen wären auch: entzündungshemmende Wirkung (antiphlogistisch, in der Kamille), diuretische Wirkung (Sellerie), antiparasitäre und antiseptische Wirkung (Knoblauch) und darmdesinfizierende Wirkung (Fenchel, Kümmel, Schafgarbe).

Diese Wirkungen der pflanzlichen Sekundärmetabolite machen sich die Pharmazeuten und Homöopathen zu Nutzen. So werden schon sehr lange Baldrian bei Nervosität, Johanniskraut bei Stimmungstiefs und Nelken wegen ihrer betäubenden Wirkung bei Zahnschmerzen eingesetzt. Mit den Inhaltsstoffen von Fenchel und Kümmel werden Erkältungen oder Magen- und Darmbeschwerden behandelt.

Insgesamt ist dies ein unerschöpfliches Gebiet, so dass wir hier nur einige bekannte Pflanzen aufzählen konnten.

Immer bessere Methoden machen es immer einfacher, die Pflanzenstoffe wirtschaftlich zu gewinnen und zu verarbeiten, außerdem ist ein immer stärkerer Trend hin zur „Naturmedizin“ zu beobachten, viele Menschen interessieren sich wieder für Anwendungsmöglichkeiten von Pflanzen.

2. Versuchsdurchführung

Im ersten Versuchsteil werden die in den Blüten der Kamille (*Matricaria chamomilla*) enthaltenen ätherischen Öle durch **Wasserdampfdestillation** isoliert. Hierzu haben wir ca. 7g (genau 7,0156g) der Kamillenblüten zusammen mit 250ml Wasser in einem Rundkolben erhitzt. Der dabei entstandene Wasserdampf trägt kleine Tropfen der Öle, die sich sonst auf Grund ihres lipophilen Charakters nur schlecht mit Wasser mischen, durch die Destillationsbrücke und sammelt sich nach Abkühlen in einem Auffangbehälter.

In diesem Auffangbehälter befinden sich 2ml Petroläther, der sich durch seine Unpolarität mit den ebenfalls unpolaren ätherischen Ölen gut verbindet. Dadurch verringert sich die Flüchtigkeit des Öles, die Stoffmenge wird erhöht und außerdem sorgt er für eine bessere Phasentrennung zwischen Wasser und Öl.

Nach ca. 2,5 Stunden ist die Destillation beendet und es wird zunächst das Wasser abgelassen. Anschließend wird das Öl abgelassen und dessen Menge mit Hilfe einer Messpipette bestimmt. Das Öl hat sich während der Destillation blau gefärbt. Diese Färbung beruht auf Lactonspaltung von in der Kamille vorkommendem Matricin. Dadurch entsteht die Azulenverbindung Chamazulen, welche kurzwelliges, also blaues Licht reflektiert. Die Extinktion des Azulens wird bei 610nm mit dem Photometer bestimmt und anschließend dessen Absorptionsspektrum von 360nm bis 800nm aufgenommen.

Im zweiten Versuchsteil haben wir mittels **Thermodestillation** ätherische Öle aus *Umbelliferen*-Früchten isoliert. Wir haben hierzu das relativ neue **TAS-Verfahren** (Thermomikroabtrenn-, -transfer- und -auftragsverfahren) verwendet. Dieses erfordert im Vergleich zu anderen Methoden wie z.B. der Wasserdampfdestillation nur geringe Mengen an Ausgangsmaterial und ist relativ einfach in der Durchführung.

Mit einem Mörser haben wir Früchte von Nelke, Koriander, Fenchel, Kümmel und Dill zerkleinert und in eine Pasteurpipette gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass der Mörser und die Schale nach jeder Fruchtart gründlich gereinigt werden, um die anderen Proben nicht zu verunreinigen. Die Pipetten werden am Ende mit etwas Zellstoff verschlossen und

über dem Bunsenbrenner erhitzt. Durch die Hitze verdunsten die ätherischen Öle, wandern zur kühleren Pipettenspitze und kondensieren dort wieder.

Die kondensierten Tropfen werden auf zusammen mit Referenzölen (Geraniol, Limonen, α -Pinen, Eugenol, Carvon, Menthol, Fenchon, Linalool und Azulen) und dem Kamillenblütendestilat einer vorangegangenen Gruppe auf eine DC-Platte (Dünnschichtchromatographie-Platte) getropft. Bei der Chromatographie nutzt man die unterschiedliche Verteilung von Substanzen zwischen zwei Phasen zur Trennung.

Eine dieser Phasen befindet sich in Ruhe (stationäre Phase), die andere ist mobil.

Die **Dünnschichtchromatographie** gehört zu den Flüssigkeitschromatographien. Hier dienen polare Materialien, wie in unserem Fall das Kieselgel als stationäre, und unpolare Lösemittel als mobile Phase. Das Kieselgel befindet sich bereits auf einer Platte (Kieselgel-G-Fertigplatte), auf welche die zu trennenden Substanzen aufgetragen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass der Abstand der Substanzen vom Rand bekannt ist. Deshalb zeichnet man ca. 1cm vom unteren Rand entfernt eine, um die Laufverhältnisse nicht zu beeinflussen, möglichst feine Linie und trägt die Substanzen auf dieser auf.

Die Platten werden dann für 20 bis 30 Minuten in die mobile Phase (Toluol-Essigester (93:7)) gestellt. Durch die Kapillarkräfte steigt das Lösungsmittel nach oben und nimmt dabei die aufgetragenen Stoffe mit. Wenn die Laufmittelfront noch ca. 1cm vom oberen Rand der Platten entfernt ist werden diese aus der mobilen Phase herausgenommen und die Laufmittelfront markiert. Je nachdem wie stark die Wechselwirkungen mit der stationären Phase sind werden die einzelnen Substanzen unterschiedlich weit mitgenommen. Die Laufstrecken bzw. Laufgeschwindigkeiten sind charakteristisch für die einzelnen Substanzen und es ergibt sich aus dem Verhältnis der Laufstrecke der einzelnen Substanzen zu der des Laufmittels ein spezifischer Wert, der als **R_f-Wert** bezeichnet wird. Vergleicht man die R_f-Werte der *Umbelliferen*-Öle und des Kamillenextrakts mit denen der Referenzstoffe, kann man Rückschlüsse auf deren Inhaltstoffe ziehen.

Die Platten kommen zum Trocknen unter den Abzug, werden dann mit Anisaldehyd Schwefelsäure-Reagenz (0,5ml Anisaldehyd, 50ml Eisessig und 1ml konz. Schwefelsäure) besprüht und bei 100°C in den Trockenschrank gestellt (max. 5min). Dadurch werden die einzelnen Flecken angefärbt und sind so gut sichtbar. Die einzelnen Komponenten der *Umbelliferen*-Früchte können jetzt über Farbe und R_f-Werte bestimmt werden.

3. Ergebnisse

Sowohl bei den Frucht-Ölen und dem Kamillenextrakt als auch bei den Referenzstoffen haben sich zum Teil mehrere übereinander liegende Farbflecken gebildet. In folgender Tabelle haben wir die Flecken von oben nach unten durchnummeriert.

Die zu erwartenden Sollfarben sind dem Skript entnommen und die R_f -Werte ergeben sich durch:

$$R_f = \frac{\text{EntfernungStartpunkt} \square \text{Fleckmittelpunkt}}{\text{EntfernungStartpunkt} \square \text{Laufmittelfront}}$$

Tab.1: Farben und R_f -Werte der Referenzsubstanzen

Referenzsubstanz	Sollfarbe	Fleckfarbe	Rf
Geraniol	rotbraun		
1		farblos	0,66
2		ocker	0,293
3		orange	0,04
Limonen	blauviolett		
1		ocker	0,346
2		ocker	0,24
3		ocker	0,186
4		rosa	0,053
Pinen	nur unter UV-Licht sichtbar	kein Fleck	-
Eugenol	pink		
1		farblos	0,6
2		ocker	0,12
Carvon	orange		
1		farblos	0,693
Menthol	blau		
1		farblos	0,44
Fenchon	farblos		
1		lila-braun	0,107
Linalool	farblos		
1		ocker	0,493
2		lila-braun	0,26
3		ocker	0,082
Azulen	rot (Mitte blau)		
1		rot	0,945

Die Sollfarben decken sich größtenteils nicht mit den Farben auf den DC-Platten. Auch bei den eigentlich farblosen Stoffen zeigt sich eine Färbung, während Stoffe, die gefärbt sein sollten, zum Teil farblos sind.

Auch von den *Umbelliferen* und dem Kamillenextrakt konnten Farbe und R_f -Wert bestimmt werden.

Anhand der Referenzsubstanzen können den *Umbelliferen* und dem Kamillenextrakt bestimmte Inhaltsstoffe zugeordnet werden. Bei der Zuordnung wurde in erster Linie auf den R_f -Wert geachtet und erst an zweiter Stelle auf die Farbe, da diese ein weniger eindeutiges Identifizierungsmerkmal darstellt.

Tab.2: Farben und R_f -Werte der *Umbelliferen* und mögliche Zuordnung der Referenzsubstanzen

Pflanzenmaterial	Fleckfarbe	R_f	mögliche Zuordnung	Farbe	RF
Kamillenextrakt					
1	blau	0,986	Azulen	rot (mitte blau)	0,945
2	gelb	0,546	Linalool	ocker	0,493
3	rosa	0,28	Linalool	lilabraun	0,26
4	gelb	0,16	Eugenol	ocker	0,12
Nelke					
1	lila	0,986	Azulen	rot (mitte blau)	0,945
2	ocker	0,096	Eugenol	ocker	0,12
Koriander					
1	farblos	0,849	Azulen	rot (mitte blau)	0,945
2	farblos	0,575	Eugenol	farblos	0,6
3	ocker	0,288	Geraniol	ocker	0,293
4	bräunlich	0,164	Eugenol	ocker	0,12
Fenchel					
1	farblos	0,164	Limonen	ocker	0,186
2	farblos	0,068	Limonen	rosa	0,053
Kümmel					
1	gelb	0,52	Linalool	ocker	0,493
2	farblos	0,247	Limonen	ocker	0,24
3	lila	0,137	Fenchon	lila-braun	0,107
Dill					
1	farblos	0,301	Geraniol	ocker	0,293
2	lila	0,137	Eugenol	ocker	0,12

Die Zuordnung ist bei manchen Stoffen nicht immer ganz eindeutig. Stoffe mit extremeren und damit weniger häufigen R_f -Werten, wie z.B. das Azulen, können leichter zugeordnet werden als solche mit mittlerem R_f -Werten.

Das **Absorptionsspektrum** des von uns isolierten Kamillenextrakts zeigt ein Maximum bei **610nm**, was dem Absorptionsmaximum des Azulens entspricht, und noch ein paar kleinere Maxima, bei 660nm und 740nm, die durch andere Inhaltsstoffe zustande kommen (siehe Anhang 1).

Die **Extinktionsmessung** des Azulens bei 610nm ergab eine Extinktion von **E=0,538**.

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann die Azulen- Konzentration bestimmt werden:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad c = \frac{E}{\epsilon \cdot d}$$

Mit Schichtdicke $d = 1\text{cm}$, Extinktionskoeffizient $\epsilon = 230\text{cm}^2/\text{mmol}$ ergibt sich:

$$c = 0,00234\text{mmol}/\text{cm}^3 = 0,00234\text{mmol}/\text{ml}$$

Bei einem Volumen von $V = 1,5\text{ml}$ ergibt sich mit $n = c \cdot V$ für die Stoffmenge n ein Wert von **$n=0,00351\text{ mmol}$** .

Dies entspricht einem Stoffgewicht m von **$0,449\text{mg}$** (mit $m = n \cdot M$; molare Masse (M) Azulen: 128 g/mol).

Wir haben $7,0156\text{g}$ Kamillenblüten eingewogen, das heißt, dass in 1g Kamillenblüten nur $0,064\text{mg}$ Azulen enthalten sind. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von **$0,0064\%$** .

4. Diskussion

Die Zuordnung der Referenzstoffe zu den *Umbelliferen*-Früchten und dem Kamillenextrakt war nur sehr eingeschränkt möglich, da bei allen dreien teilweise sehr lange Flecken entstanden und der bestimmte R_f -Wert gewissermaßen ein Mittelwert der Strecke von unterem zu oberem Fleckrand darstellt. Ursache für diese schlechte Trennung könnten entweder Verunreinigungen der Substanzen oder der mobilen oder der festen Phase sein. Diese Verunreinigungen führen dazu, dass die Wechselwirkungen zwischen den Substanzen und der stationären Phase gestört werden. Außerdem zeigten auch die Referenzstoffe, bei denen es sich ja um Reinstoffe handelt, mehrere Farbflecken oder Banden. Die Ursache hierfür könnten entweder Verunreinigungen der Substanzen oder des Lösemittels sein. Dass die Gewürze und der Kamillenextrakt mehrere Flecken zeigen ist nicht verwunderlich, da diese oft verschiedene ätherische Öle enthalten.

Auch zeigten die meisten Referenzsubstanzen nicht die zu erwartenden Farben. Dies könnte auf ungleichmäßige oder ungenügende Verteilung des Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz zurückzuführen sein. Es wäre außerdem möglich, dass auch das Reagenz verunreinigt oder schon relativ alt ist und so keine optimale Wirkung mehr zeigt.

Wie zu erwarten zeigte das Kamillenextrakt einen für Azulen charakteristischen R_f -Wert.

Das Absorptionsspektrum des aus den Kamillenblüten gewonnenen Extrakts zeigt wie zu erwarten ein Maximum bei 610nm, was der maximalen Absorption des Azulens entspricht. Die geringe Menge von nur 0,0064% Azulen in den Blüten ist durchaus realistisch, da Sekundärmetabolite von den Pflanzen nur in sehr geringen Mengen hergestellt werden. Auch das in den Nelken enthaltene Eugenol konnte über Farbe und R_f -Wert nachgewiesen werden. Allerdings enthalten Nelken neben Eugenol auch Pinen, was von uns nicht bestimmt werden konnte.

Wir sehen auch eine Fehlerquelle darin, dass beim TAS-Verfahren die Inhaltsstoffe der Proben leicht verbrennen oder auch aus der Pipettenspitze verdampfen können. Aber auch bei der Dampfdestillation gehen durch das Umfüllen in die Messpipette und die Küvette Teile der Probe verloren, ebenso beim Abziehen des Wassers. Insgesamt gesehen ist die Dampfdestillation zwar das langwierigere und aufwändigere Verfahren, aber auch das genauere, da hier die Inhaltsstoffe nicht so stark erhitzt werden, dass sie zersetzt werden könnten. Diese Gefahr besteht beim TAS-Verfahren.

5. Zusammenfassung

In unserem Versuch haben wir aus Kamillenblüten mit einer Dampfdestillation Azulene extrahiert. Aus verschiedenen Umbelliferen-Früchten haben wir mit dem TAS-Verfahren ebenfalls ätherische Öle extrahiert. Diese Extrakte haben wir dann mittels einer DC-Chromatographie aufgetrennt und die Inhaltsstoffe ermittelt.

Literaturverzeichnis

- Campbell: Biologie, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum Verlag
- Heldt, Hans-Walter: Pflanzenbiochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1996
- Mohr, Schopfer: Pflanzenphysiologie, 4., völlig neubearbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 1992
- Nultsch: Allgemeine Botanik, 10. Auflage, 1996, Thieme Verlag
- Schopfer / Brennicke: Pflanzenphysiologie, 5. Auflage, 1999, Springer Verlag)
- Skript zum Grundpraktikum Pflanzenphysiologie und molekulare Botanik SS 2003
- Alte Protokolle