©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 18	Fasc. 3–4	137–144	18. 5. 1978

Säuren in Koniferennadeln

Von

Wolfgang LINDNER *) und Dieter GRILL **)

Aus den Instituten für Pharmazeutische Chemie sowie für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 4 Abbildungen

Eingelangt am 17. Dezember 1976

Zusammenfassung

In Extrakten von Koniferennadeln konnten mittels der Gaschromatographie 26 Säuren nachgewiesen werden. Das Muster ist bei sämtlichen einheimischen Koniferen ähnlich. Die Hauptmenge machen China- und Shikimisäure aus, wobei die Nadelentwicklung Einfluß auf das Mengenverhältnis dieser Säuren ausübt. Weiters wurden methodische Probleme behandelt, wie die Eignung zweier verschiedener Trennsysteme bei der GC von Säuren, sowie Fragen schonender Präparation.

Summary

By means of gas-chromatography in extracts of conifer-needles 26 acids could be proved. The pattern is alike on each of the local coniferes. The main quantity consists of quinic- and shicimic-acids, whereby the quantity proportion of these acids is influenced by the development of the needles. Methodic problems were coped with, for instance the qualification of two different partition systems for GC of acids, and questions of a conservating preparation.

1. Einleitung

In Koniferennadeln kann eine Vielfalt verschiedener Säuren vorkommen, die übersichtshalber in Gruppen entsprechend ihrer chemischen

*) Dr. W. LINDNER, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Graz, A-8010 Graz, Universitätsplatz 1.

**) Dr D. GRILL, Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Universität Graz, A-8010 Graz, Schubertstraße 51.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Natur eingereiht werden, wie Aminosäuren, Fettsäuren, Harzsäuren, Phenolsäuren usw. Entsprechend ihrer verschiedenartigen Struktur sind auch die Trenn- und Identifizierungsmethoden verschieden.

Vor allem die Säuren des Krebszyklus und davon abgeleitete Säuren bewirken eine Pufferkapazität an Fichtennadeln um pH 4 (WIND 1976). Diese kann für das Resistenzverhalten von Koniferennadeln gegenüber Pilzbefall (SCHOLZ & STEPHAN 1975) und Luftverunreinigung von Bedeutung sein (GRILL 1971, GRILL & HÄRTEL 1972, SCHOLZ 1974, WIND 1976).

Bisher wurden Ergebnisse über Säuren vor allem papierchromatographisch (OECHSSLER 1968, NIERHAUS 1970, NIERHAUS & KINZEL 1971, WIND 1976) und gaschromatographisch (NIERHAUS & KINZEL 1971) gewonnen. Von DITTRICH 1970, OECHSSLER 1968, OSIPOV 1973, USOVA 1973, WIND 1976 u. a. wird für Koniferennadeln immer auf die dominierende Rolle der China- und Shikimisäure hingewiesen, wogegen andere Säuren, wie Citronensäure, Apfelsäure, phenolische Säuren u. a. in den Hintergrund treten. Vorliegende Arbeit soll weitere Komponenten des Säuremusters von Nadeln einheimischer Koniferen aufzeigen, wofür das gaschromatographische Verfahren herangezogen werden soll.

2. Material und Methodik

2.1. Pflanzenmaterial

Nadeln folgender Bäume wurden in der Zeit Juli—September untersucht: *Picea abies* (L.) KARSTEN, *Abies alba* MILL., *Larix decidua* MILL., *Pinus cembra* L., *P. nigra* ARNOLD, *P. sylvestris* L., *P. mugo* TURRA, *Juniperus communis* L. und *Taxus baccata* L.

2.2. Aufarbeitung

Das Pflanzenmaterial wurde nach der Methode von KINZEL 1962 und OECHSSLER 1968 vorbereitet (getrocknet, gemahlen und wässrig ausgezogen). Dieser Auszug wurde dann über einen Kationenaustauscher geschickt, um die freien Säuren zu erhalten. In dem Eluat sind neben den Säuren alle jene Pflanzeninhaltsstoffe, die wasserlöslich sind und vom Kationenaustauscher nicht retardiert werden (Phenole, Kohlehydrate, Glycoside etc.). Um die freien Säuren von möglichst vielen dieser Begleitstoffe zu befreien, ist der Einsatz eines Anionenaustauschers angezeigt, wobei die sauren Substanzen nun retardiert werden und die neutralen bzw. basischen durchlaufen. Durch Elution mit Ameisensäure (12 n) sollen sämtliche Säuren auswaschbar sein. Dieses stark ameisensaure Eluat wird nun am Wasserbad im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand ist bei den Koniferen z. T. braun gefärbt, was wohl durch die in Koniferennadeln reichlich vorhandenen Phenole (ESTERBAUER, GRILL & BECK 1975, NIEMANN 1975, TYUKAVKINA, MEDVEDEVA & IVANOVA 1975, u. a.) verursacht wird.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Der Aufarbeitungsschritt über den Anionenaustauscher läßt dann Schwierigkeiten erwarten, wenn das Säuremuster der niederen Karbonsäuren und der instabilen Hydroxy- iund Ketokarbonsäuren erfaßt werden soll; es ist mit erheblicher Zersetzung und größeren Verlusten durch Abdampfen zu rechnen. Weiters zeigt sich, daß nach beschriebener Aufarbeitungsmethode für Koniferennadeln keine phenolfreien Eluate erhaltbar sind.

In dieser Arbeit soll auch die Frage geklärt werden, ob Phenole die gaschromatographische Indentifizierung des Säuremusters stören, und ob nicht überhaupt auf den Aufarbeitungsschritt mit der Anionenaustauschersäule verzichtet werden kann. In diesem Fall muß das Eluat nach Passieren der Kationenaustauschersäule durch Lyophilisieren bis zur Trockene eingeengt werden.

2.3. Chromatographie

Die trockenen Säureextrakte (eingedampft bzw. lyophilisiert) wurden mit BSTFA (bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid) in Pyridin zu den entsprechenden Silylestern bzw. Silyläthern derivatisiert. Die Reaktionen verlaufen zumeist rasch, quantitativ wurden die Umsetzungen nicht verfolgt.

Als Gaschromatograph stand ein Perkin Elmer-Modell 900 mit FID als Detektor zur Verfügung. Zwei Trennsysteme wurden ausgewählt:

Säule A: Glas, ID: 3 mm, Länge 1,8 m, gefüllt mit 15% SE 52 auf Chromosorb W AW — Dmcs 100—120 mesh

Säule B: Glas, ID: 3 mm, Länge 1,8 m, gefüllt mit 15% XE 60 auf Gaschrom Q 80—100 mesh.

Die halb-quantitativen Analysen stützen sich auf Peakflächenintegration ohne Korrektur mit entsprechenden FID-Responsfaktoren.

3. Ergebnisse und Besprechung

26 Pflanzensäuren (Tab. 1) konnten identifiziert werden, wie aus dem Chromatogramm (Abb. 1) zu entnehmen ist. Abb. 1 zeigt ein typisches Säuremuster von Koniferennadeln. Die qualitative Zusammensetzung an Pflanzensäuren ist für die genannten Koniferen sehr ähnlich, wobei die relative Konzentration der einzelnen Säurekomponenten, mit Ausnahme der Shikimi- und Chinasäure, relativ gering ist (meist unter 1%). China- und Shikimisäure besitzen einen Anteil von mindestens 80% der Gesamtsäure, wobei das Verhältnis beider Säuren zueinander mit dem physiologischen Entwicklungszustand der Koniferen bzw. mit der Jahreszeit variieren kann. So ist die Chinasäurekonzentration schon knapp nach dem Austrieb in den verschiedenen Koniferen sehr hoch (Goldschmid & Quimby 1964, Oechssler 1968, Dittrich 1970, Kretz 1973, Osipov 1973, Wind 1976) und überwiegt weit den Shikimisäureanteil. Bei *Larix*

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

ist dies besonders ausgeprägt; es wurde in Nadeln des Kurztriebes 10 mal mehr Chinasäure als Shikimisäure gefunden. Die Chinasäure wird mit der Lignifizierung der Pflanzen in Zusammenhang gebracht und FRANZ &

Tabelle 1

Identifizierte Säuren eines Zirbennadelextraktes und ihre Peakbezeichnung in den Gaschromatogrammen Abb. 1—4

1) Oxalsäure	14) Vanillinsäure
2) Malonsäure	15) Shikimisäure
3) Benzoesäure	16) Protocatechussäure
4) Phosphorsäure	17) Citronensäure
5) Bernsteinsäure	18) Chinasäure
6) Fumarsäure	19) Syrugasäure
7) Phenylbrenztraubensäure	20) Syringasäure.
8) DL-Äpfelsäure	21) p-Cumarsäure
9) Zimtsäure	22) Gallussäure
10) L-Weinsäure	23) Ascorbinsäure
11) α-Ketoglutarsäure	24) Ferulasäure
12) cis-Aconitsäure	25) Kaffeesäure
13) trans-Aconitsäure	26) Chlorogensäure

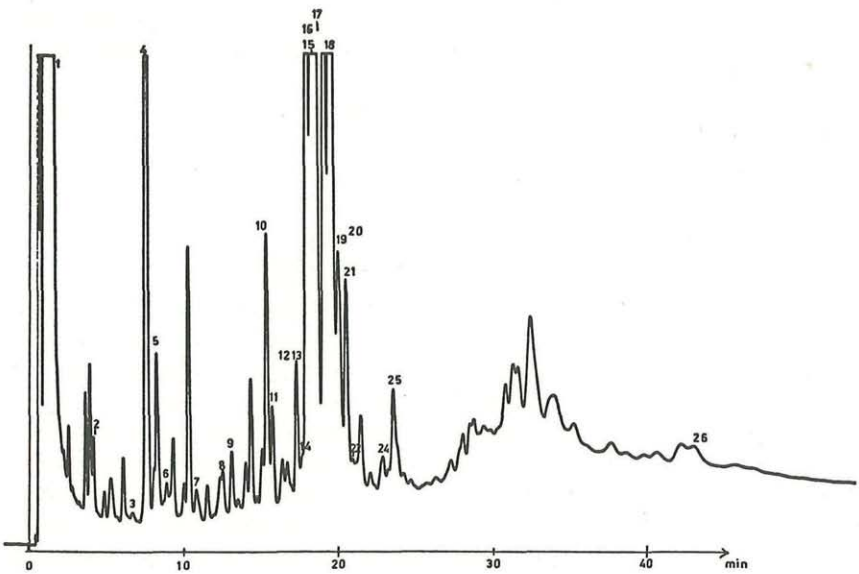

Abb. 1. Gas-Chromatogramm der Säuren eines wässrigen Zirbennadelauszuges (Aufbereitung über Kationen- und Anionenaustauscher). Säule: Glas 1,8 m ID 3 mm gefüllt mit 15% SE 52 auf Chromosorb W AW-Dmcs 100—120 mesh. Temperatur-Programm: 110°—270° C, 6°/min. Peakbezeichnung: wie in Tab. 1.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Meier 1969 nehmen an, daß Chinasäure in den Nadeln akkumuliert wird und u. a. mit der basipetalen Phloemströmung in die Kambialzone abtransportiert wird. Im Spätsommer dürfte der Lignifizierungsprozeß weitgehend beendet sein und es wird in der Nadel nur mehr wenig Chinasäure gefunden. Der Shikimisäureanteil überwiegt (vgl. auch Oechssler 1968) und kann, wie unsere Untersuchungen zeigten, das 8-fache betragen. Dittrich & Kandler 1971 weisen auf die Möglichkeit einer Umwandlung von China- zu Shikimisäure hin. Ein ähnliches Säuremuster wie bei Koniferen kann auch bei Ginkgo, ebenfalls ein Vertreter der Gymnospermen, gefunden werden (Nierhaus & Kinzel 1971).

Abb. 2 zeigt ein Gaschromatogramm, wie es mit der Säule XE 60 gewonnen wurde. Im Gegensatz zur Säule SE 52 sieht man hier eine wesent-

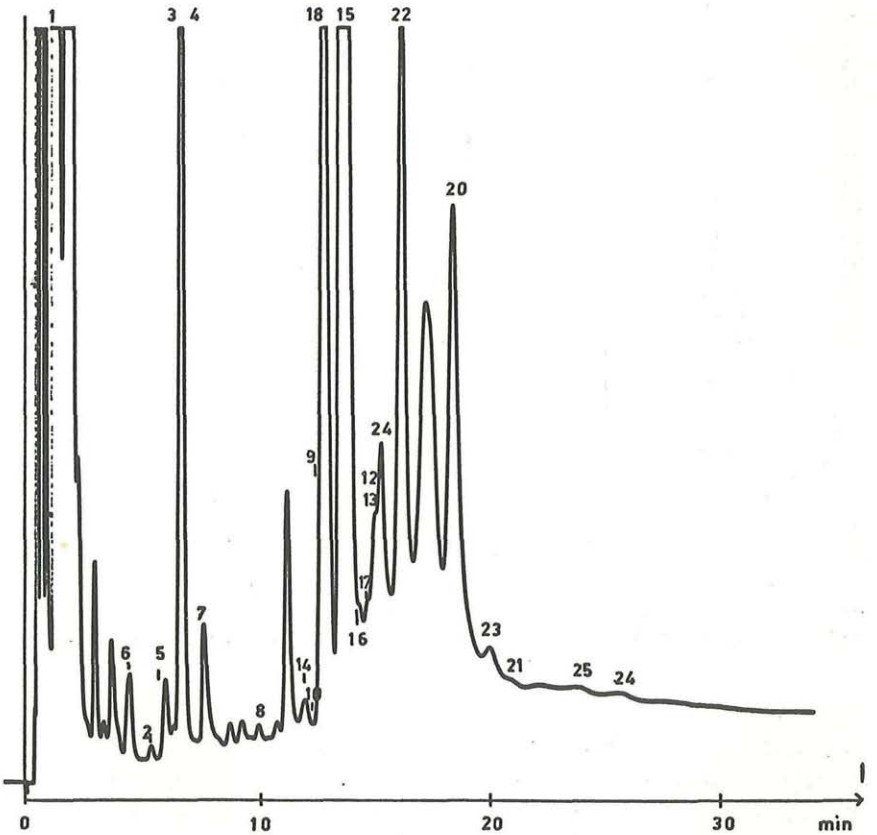

Abb. 2. Gas-Chromatogramm der Säuren eines wässrigen Zirbennadel-Auszuges (Aufbereitung über Kationen- und Anionenaustauscher). Säule: Glas 1,8 m ID 3 mm gefüllt mit 15% XE 60 auf Gaschrom Q 80—100 mesh. Temperaturprogramm: 100°—190° C, 6°/min. Peakbezeichnung: wie in Tab. 1.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

lich klarere Auftrennung von China-, Shikimi- und Citronensäure; die Trennleistung bei anderen Säuren ist jedoch geringer.

Von den zahlreichen Peaks, die auf den Chromatogrammen, Abb. 1 und 2, aufscheinen, konnten zwar 26 identifiziert werden (Tab. 1), daneben erscheinen noch unidentifizierte Peaks. Es muß bei der Identifizierung von unbekannten Peaks im Säuremuster der Koniferennadeln neben unbe-

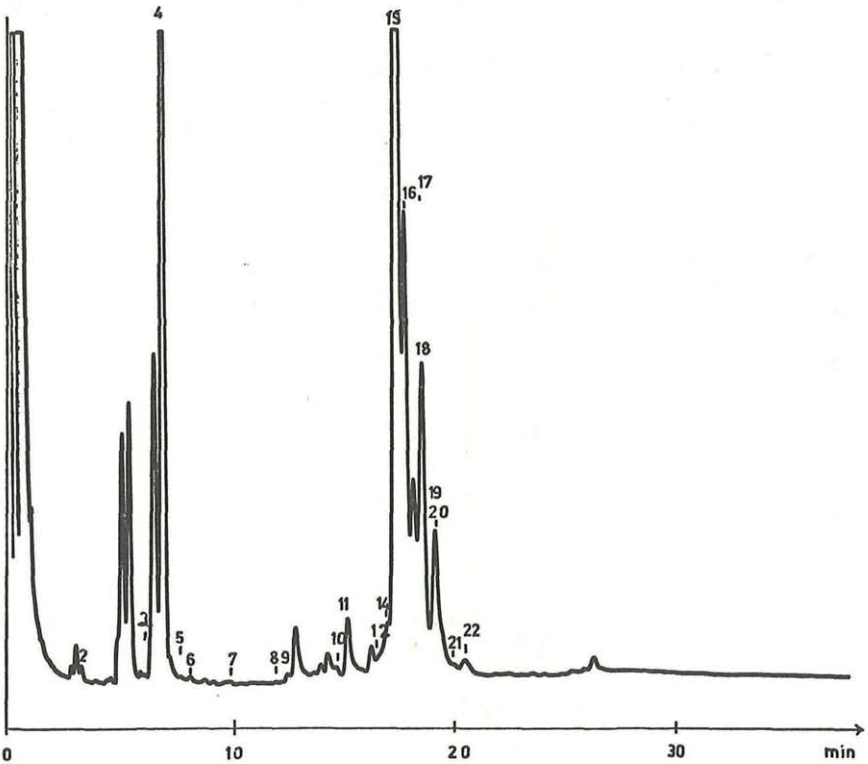

Abb. 3. Gas-Chromatogramm der Säuren eines wässrigen Fichtennadelauszuges. Aufarbeitungsmethode sowie GC-Bedingungen wie in Abb. 1 und Peakbezeichnung wie in Tab. 1.

kannten Säuren auch das Vorhandensein von Zersetzungsprodukten berücksichtigt werden. Solche entstehen bereits bei der Probenvorbereitung (vgl. 2.2.) oder aber durch die Instabilität der silylierten Säuren. Weiters können auch Peaks durch phenolische Substanzen hervorgerufen werden, die trotz sorgfältigster Präparation immer im Säureextrakt bei Koniferennadeln zu finden sind. Diese Phenole scheinen allerdings die chromatographische Trennung bzw. die Identifizierung der Säuren nicht wesentlich

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

zu beeinflussen. Deshalb liegt der Schluß nahe, auf den Anionenaustauscher gänzlich zu verzichten und die sicherlich schonendere Aufarbeitung durch Lyophilisieren durchzuführen. Von den bei einer solchen Präparation vorhandenen Kohlehydraten ist kaum eine Störung zu erwarten, die in Koniferennadeln vorkommenden Aminosäuren werden bereits durch den Kationenaustauscher elinimiert. Einen Vergleich der beiden zur Diskussion stehenden Aufarbeitungsmethoden zeigen Abb. 3 und 4.

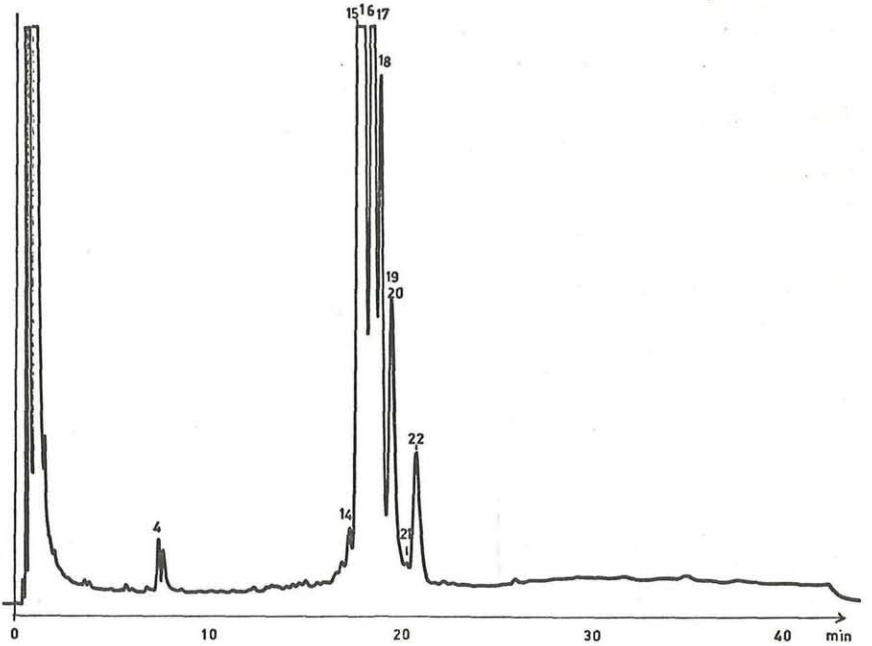

Abb. 4. Gas-Chromatogramm der Säuren eines wässrigen Fichtennadel-Auszuges. Aufarbeitung über Kationenaustauscher und lyophilisiert. GC-Bedingungen wie in Abb. 1, sowie Peakbezeichnung wie in Tab. 1.

5. Schriftenverzeichnis

DITTRICH P. 1970. Untersuchung über den Umsatz sekundärer Pflanzenstoffe in den Nadeln von *Picea abies*. — Diss. München.

— & KANDLER D. 1971. Einfluß der Jahreszeit auf die Bildung und Umsatz von Phenolkörpern in der Fichte (*Picea abies* (L.) KARST). — Ber. dt. bot. Ges. 84: 465—472.

ESTERBAUER H., GRILL D. & BECK G. 1975. Untersuchungen über Phenole in Nadeln von *Picea abies*. — Phyton 17: 87—99.

FRANZ M. & MEIER H. 1969. Die organischen Säuren im Cambialsaft von *Larix decidua* MILL. — Planta 85: 202—208.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

GOLDSCHMIDT O. & QUIMBY G. R. 1964. Lignin precursors: The role of quinic acid. — Tappi 47: 528—533.

GRILL D. 1971. Pufferkapazität gesunder und rauchgeschädigter Fichtennadeln. — Z. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz 87: 612—622.

— & HÄRTEL O. 1972. Zellphysiologische und biochemische Untersuchungen an SO_2-begasten Fichtennadeln — Resistenz und Pufferkapazität. — Mitt. Forstl. Bundes-Versuchsanst. Wien 97: 367—384.

KINZEL H. 1962. Zur Methodik der Analyse von pflanzlichen Zellsaftstoffen mit besonderer Berücksichtigung der organischen Säuren. — J. Chromatogr. 7: 493—506.

KRETZ A. 1973. Zucker, Cyclite und organische Säuren des Cambialsaftes von *Pinus sylvestris* L., *Picea abies* KARST., und *Abies alba* MILL. — Planta 110: 1—14.

NIEMANN G. J. 1975. Phenolics from *Larix* needles. X. Flavonoids of *L. Gmelinii*. Acta Bot. Neerl. 24: 65—68.

NIERHAUS D. B. 1970. Vergleichende Untersuchungen über die organischen Säuren in Zellsäften von Angiospermen. — Diss. Wien.

— & KINZEL H. 1971. Vergleichende Untersuchungen über die organischen Säuren in Blättern höherer Pflanzen. — Z. Pflanzenphysiol. 64: 107—123.

OECHSSLER G. 1968. Jahreszeitliche Schwankungen des Gehaltes an organischen Säuren in den Nadeln von *Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO, *Picea abies* (L.) H. KARSTEN und *Larix decidua* MILL. — Z. Pflanzenphysiol. 59: 213—225.

OSIPOV V. J. 1973. Organic acids of the tissues of the sibirian larch. — In: Metabolismus der Nadelbäume im Zusammenhang mit der Periodik der Wachstumsrhythmik: 125—133 (russ.). — Academia Nauk SSSR, Institut für Holz und Holzfasern. Krasnokarsj 1973.

SCHOLZ F. 1974. Biochemische Untersuchungen zur Resistenz von Waldbäumen gegen Fluorimmissionen. — IX. Intern. Tagung Luftverunreinigung u. Forstwirtsch., Marianské Lazné.

— & STEPHAN B. R. 1975. Physiologische Untersuchungen über die unterschiedliche Resistenz von *Pinus sylvestris* gegen *Lophodermium pinastri*. — Europ. J. Forest. Pathol. 4: 118—126.

TYUKAVKINA N. A., MEDVEDEVA S. A. & IVANOVA S. Z. 1975. Phenolic compounds of *Larix Dahurica* needles. — Khim. Drev. 145: 93—95.

USOVA N. P. 1973. Chemical composition of coniferous needles and their uses. — Lesn. Khoz. 10: 27—60.

WIND E. 1976. Untersuchungen über die Pufferkapazität und einige organische Säuren in Koniferennadeln. — Diss. Graz.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1978

Band/Volume: 18_3_4

Autor(en)/Author(s): Grill Dieter, Lindner Wolfgang

Artikel/Article: Säuren in Koniferennadeln. 137-144