

# **Anhang A**

## **Arbeitsprotokolle**

# Protokoll

Datum: 24. Oktober 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Extraktion von Wermutöl aus Wermutkraut (*Artemisia absinthium*)

Durchführung:

Die Extraktion haben wir mittels Wasserdampfdestillation durchgeführt.

Allerdings haben wir eine abgewandelte Form der Wasserdampfdestillation angewendet, bei der die verwendete Wassermenge reduziert wird, indem ein organisches Lösungsmittel zum Einsatz kommt.

Wieder aufgefangenes Wasser und Lösungsmittel wird zu den Ursprungskolben zurückgeführt (s. Abb. rechts).

Das extrahierte Öl befand sich dabei im Lösungsmittel gelöst im linken Rundkolben.

Als organisches Lösungsmittel haben wir Dichlormethan (*auch* Methylenchlorid)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verwendet.



Nach dem Aufbau haben wir die Rundkolben mit 350 ml Dichlormethan (linker Kolben) und mit 50 g getrocknetem, zerkleinertem Wermutkraut und Aqua dest. (rechter Kolben) beschickt. Das Wasser bedeckte dabei das Wermutkraut.

Da Dichlormethan bereits bei 38,9 °C siedet haben wir den Kolben so über der Heizung angebracht, dass er diese nicht berührt. Außerdem haben wir Siedesteine zugegeben, um ein gleichmäßiges Erhitzen des Lösungsmittels sicherzustellen.

Der Kolben, der das Wermutkraut beinhaltete, wurde etwas höher gelagert und direkt beheizt, da Wasser erst bei 100°C siedet.

Das Destillat färbte sich schnell durchsichtig hellgelb. Die Destillation dauerte drei Stunden.

# Protokoll

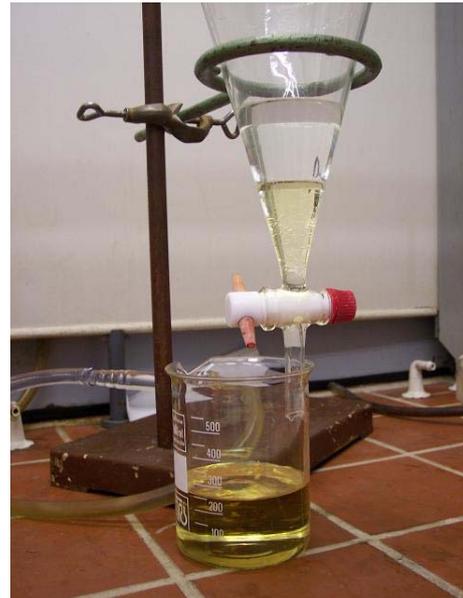
Datum: 25. Oktober 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Extraktion von Wermutöl aus Wermutkraut (*Artemisia absinthium*)

Durchführung:

Heute haben wir die Destillationsapparatur vom Vortag abgebaut und das Destillat aus dem Rundkolben mit dem Lösungsmittel Dichlormethan nach Phasen getrennt, denn während der Destillation war etwas Wasser mit in diesen Kolben gelaufen (s. Abb. rechts). Nur die organische Phase (Dichlormethanphase) war für uns interessant. Diese haben wir nach der Phasentrennung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und dabei gerührt. Das (trockene) Salz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  bildet zusammen mit Wasser Kristalle, das Wasser wurde somit aus dem Stoffgemisch entfernt.



Anschließend wurde das Gemisch filtriert, um das Salz abzutrennen.

Danach wurde das Lösungsmittel Dichlormethan im Rotationsverdampfer entfernt.

Übrig blieb ein grünbrauner Fleck, das Wermutöl. Dieses Öl haben wir im Kühlschrank verwahrt. („Wermutöl 1“)

Wir haben die Destillationsapparatur wieder aufgebaut und analog zum Vortag bestückt. Diesmal verwendeten wir aber 50 g gefrorene Blütenstände des Wermutkrauts aus dem Botanischen Garten der Universität Leipzig.

Diesmal färbte sich das Destillat wieder hellgelb, war am Anfang aber etwas milchig.

Die Destillation lief über 3,5 Stunden.

## Protokoll

Datum: 26. Oktober 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Extraktion von Wermutöl aus Wermutkraut (*Artemisia absinthium*)

Durchführung:

Die Destillationsapparatur vom Vortag haben wir abgebaut und analog die Phasentrennung und die Trocknung der Lösung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  durchgeführt und die Lösung anschließend filtriert.

Das Lösungsmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde im Rotationsverdampfer entfernt.

Das bräunliche Wermutöl (s. Abb. rechts) wurde anschließend im Kühlschrank aufbewahrt. („Wermutöl 2“)



# Protokoll

Datum: 27. Oktober 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Extraktion von Thujaöl aus grünen Pflanzenteilen des abendländischen Lebensbaumes (*Thuja occidentalis*)

Durchführung:

Die Destillationsapparatur wurde gereinigt und neu aufgebaut.

Anschließend zerkleinerten wir grüne Pflanzenteile des Lebensbaumes (s. Abb. rechts oben).

Die Destillationsapparatur bestückten wir mit 50 g der Pflanzenteile und Aqua

dest. im rechten Rundkolben und mit 300 ml Dichlormethan  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  im linken.

Den Versuch ließen wir 3,5 Stunden laufen.

Nach ca. einer halben Stunde verloren die Pflanzenteile ihre leuchtend grüne Farbe.

Die organische Phase war am Ende der Destillation leicht milchweiß, was uns im Ungewissen darüber ließ, ob überhaupt für uns verwertbare Stoffe im Destillat gelöst waren (s. Abb. rechts unten).

Im Anschluss an die Destillation führten wir die Phasentrennung durch. Sehr viel Wasser war im Verlauf der Destillation in den Rundkolben mit dem Lösungsmittel gelangt. Danach wurde das Destillat über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

Nachdem im Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt worden war, sahen wir, dass ein durchsichtiges leicht hellgelbes Öl zurückblieb. („Thujaöl“)



## Protokoll

Datum: 28. Oktober 2005

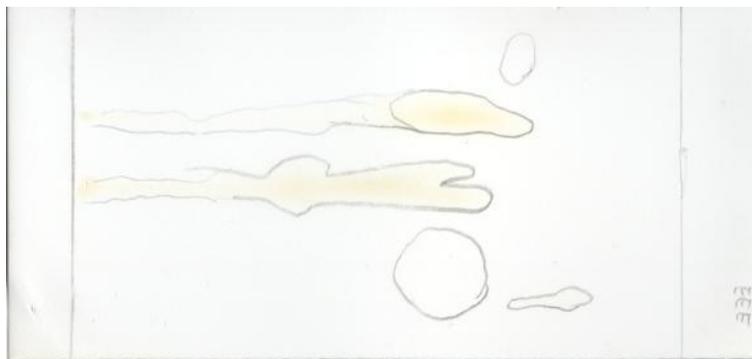
Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Untersuchen der gewonnenen Öle auf das Vorhandensein von  $\alpha$ -Thujon

Durchführung:

Zur Untersuchung der Öle auf  $\alpha$ -Thujon führten wir eine Dünnschichtchromatografie (*auch* thin layer chromatography, TLC) als Handexperiment durch. Als Vergleichssubstanz diente käuflich erworbenes  $\alpha$ -Thujon der Firma Fluka Chemie GmbH. Die DC-Platten stammten von der Firma Merck KGaA.

Die erste Dünnschichtchromatografie wurde mit Ethansäureethylester (*auch* Ethylethanoat, Ethylacetat, Essigester,  $\text{CH}_3\text{COO}-\text{C}_2\text{H}_5$ ) als Flussmittel durchgeführt.



von oben:

$\alpha$ -Thujon (Vergleichssubstanz)

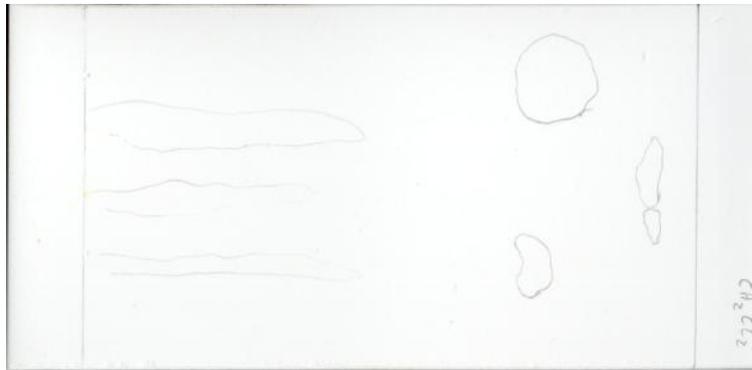
Wermutöl 1

Wermutöl 2

Thujaöl

Die DC-Platte zeigt, dass in allen drei Ölproben  $\alpha$ -Thujon enthalten ist.

Die zweite Dünnschichtchromatografie wurde mit dem Flussmittel Dichlormethan, welches schon bei der Destillation zum Einsatz kam, durchgeführt.



von oben:

$\alpha$ -Thujon (Vergleichssubstanz)

Wermutöl 1

Wermutöl 2

Thujaöl

Die DC-Platte zeigt, dass in Probe Nummer 3 (Thujaöl)  $\alpha$ -Thujon enthalten ist. Über die anderen beiden Proben kann keine Aussage getroffen werden, da das Ergebnis zu undeutlich ist.

Diese Untersuchungen müssen auf jeden Fall wiederholt werden, da es sich in diesem Fall nur um qualitative Untersuchungen handelte, die einen ersten Überblick verschaffen sollten.

## Protokoll

Datum: 01. November 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Untersuchung von gekauftem Wermutöl der Firma ASAV GmbH im Gaschromatographen

Durchführung:

Zuerst wurden wir in die Benutzung eines Gaschromatografen eingeführt.

Anschließend starteten wir einen Testlauf mit gekauftem Wermutöl der Firma ASAV GmbH mit einer kleinen Säule. Das Öl wurde in allen drei Durchläufen direkt eingespritzt.

$V = 90 \mu\text{l}$

$t = 30 \text{ min}$

$P = 38 \text{ psi}$

$T(\text{Ofen}) = 120^\circ\text{C}$

$T(\text{Injektor/Detektor}) = 110^\circ\text{C}$

(WÖ\_011105)

Die Peaks waren schlecht interpretierbar, wahrscheinlich weil es der erste Durchlauf war.

Für den zweiten Versuch verwendeten wir wieder das gekaufte Wermutöl und eine große Säule.

$V = 90 \mu\text{l}$

$t = 30 \text{ min}$

$P = 38 \text{ psi}$

$T(\text{Ofen}) = 120^\circ\text{C}$

$T(\text{Injektor/Detektor}) = 110^\circ\text{C}$

(WÖ2\_011105)

Aus dem Graphen konnte man die Peaks nur schlecht auseinanderhalten, sie waren dicht zusammen.

Der dritte Versuch wurde mit einer großen Säule und erhöhter Temperatur durchgeführt.

$V = 90 \mu\text{l}$

$t = 30 \text{ min}$

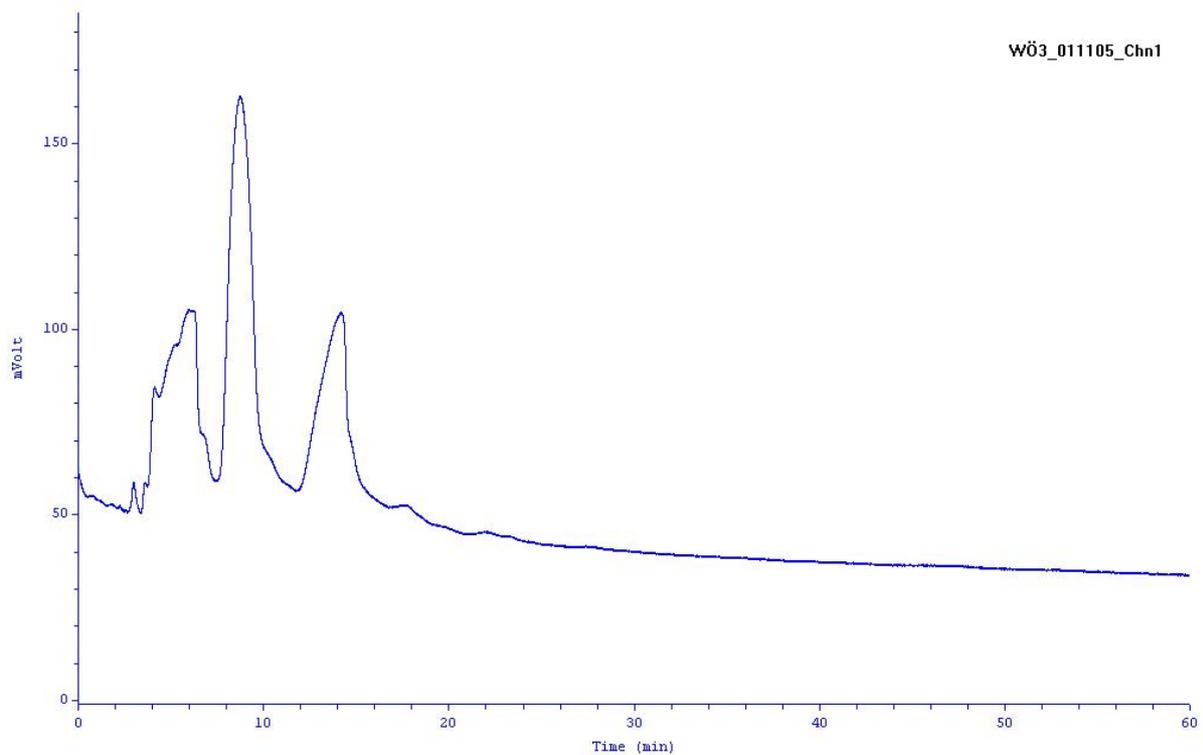
$P = 38 \text{ psi}$

$T(\text{Ofen}) = 200^\circ\text{C}$

$T(\text{Injektor/Detektor}) = 110^\circ\text{C}$

(WÖ3\_011105)

Hier waren die Peaks besser zu erkennen, allerdings muss bei der nächsten Durchführung der Druck, bzw. die Temperatur etwas verringert werden, da die Peaks relativ eng lagen.



(Durchführung 3, WÖ3\_011105)

## Protokoll

Datum: 15. November 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Untersuchung von Wermut- und Thujaöl im Gaschromatographen

Durchführung:

Erster Lauf des GC mit gekauftem Wermutöl der Firma ASAV GmbH:

V = 90 µl

t = 30 min

p = 29 psi

T(Ofen) = 200°C

T(Injektor/Detektor) = 110°C

(WÖ4\_151105)

Der Graph zeigte einen deutlichen Peak zwischen 11 Minuten und 13,5 Minuten Laufzeit, von dem wir vermuten, dass es sich um Thujon handelt. Der Peak bei 4,5 Minuten ist wahrscheinlich der des Lösungsmittels Dichlormethan  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , mit dem die Injektionsspritze ausgespült wurde.

Zweiter Lauf des GC mit extrahiertem Wermutöl aus getrocknetem Wermutkraut

(Wermutöl 1):

V = 80µl

t = 30 min

p = 29 psi

T(Ofen) = 200°C

T(Injektor/Detektor) = 114°C

(WÖg\_151105)

Das Wermutöl wurde vor dem Einspritzen mit Dichlormethan verdünnt. Wahrscheinlich zu sehr, da es an der erwarteten Stelle (11 Minuten) nur einen sehr kleinen Peak gab, dafür

aber bei ca. 4 Minuten einen schulterförmigen vermuteten Dichlormethan-Peak, der auf eine zu hohe Verdünnung hindeutete.

Dritter Lauf des GC mit extrahiertem Wermutöl aus gefrorenen frischen Blütenständen des Wermutkrauts (Wermutöl 2):

$V = 5 \mu\text{l}$

$t = 30 \text{ min}$

$p = 30 \text{ psi}$

$T(\text{Ofen}) = 200^\circ\text{C}$

$T(\text{Injektor/Detektor}) = 120^\circ\text{C}/124^\circ\text{C}$

(WÖg2\_151105)

Das Wermutöl wurde unverdünnt in den Gaschromatographen gegeben. Bei ca. 10,5-11 Minuten gab es einen kleinen Peak, bei dem es sich vermutlich um Thujon handelte.

Allerdings war er so klein, dass wir keine Probe auffangen konnten.

Vierter Lauf des GC mit extrahiertem Wermutöl aus gefrorenen frischen Blütenständen des Wermutkrauts (Wermutöl 2):

$V = 40 \mu\text{l}$

$t = 30 \text{ min}$

$p = 30 \text{ psi}$

$T(\text{Ofen}) = 200^\circ\text{C}$

$T(\text{Injektor/Detektor}) = 124^\circ\text{C}/128^\circ\text{C}$

(WÖg3\_151105)

Das Wermutöl wurde mit etwas Dichlormethan verdünnt. Der vermutete Thujon-Peak ist verschwindend klein ausgefallen.

Fünfter Lauf des GC mit extrahiertem Thujaöl aus frischen grünen Pflanzenteilen des Thuja (*Thuja occidentalis*) (Thujaöl):

V = 50 µl

t = 30 min

p = 30 psi

T(Ofen) = 200°C

T(Injektor/Detektor) = 127°C/134°C

(TÖ\_151105)

Das Thujaöl wurde mit etwas Dichlormethan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt. Am Anfang des Laufes ist das PC-Programm abgestürzt, sodass die Aufzeichnung mit 2 Minuten Verspätung begann. Zum Zeitwert für den vermuteten Thujon-Peak sind daher 2 Minuten zu addieren, um einen akkuraten Wert zu erhalten.

Diesmal konnten wir eine Probe des vermuteten Thujon bei 8-9,5 min (10-11,5 min) auffangen.

Sechster Lauf des GC mit extrahiertem Thujaöl aus frischen grünen Pflanzenteilen des Thuja (*thuja occidentalis*) (Thujaöl):

V = 60 µl

t = 20 min

p = 30 psi

T(Ofen) = 200°C

T(Injektor/Detektor) = 128°C/136°C

(TÖ2\_151105)

Das Thujaöl wurde mit etwas Dichlormethan CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt. Der Peak trat wieder zwischen 10-11,5 Minuten auf und wir haben die Probe aufgefangen.

Siebenter Lauf des GC mit extrahiertem Thujaöl aus frischen grünen Pflanzenteilen des Thuja (*thuja occidentalis*) (Thujaöl):

V = 80 µl

t = 20 min

p = 30 psi

T(Ofen) = 200°C

T(Injektor/Detektor) = 130°C/137°C

(TÖ3\_151105)

Auch diesmal haben wir das Thujaöl mit etwas Dichlormethan verdünnt. Der Peak trat zwischen 10 und 12 Minuten Laufzeit auf. Es gelang uns erneut die Probe aufzufangen.

Achter Lauf des GC mit extrahiertem Thujaöl aus frischen grünen Pflanzenteilen des Thuja (*thuja occidentalis*) (Thujaöl):

V = 80 µl

t = 20 min

p = 30 psi

T(Ofen) = 200°C

T(Injektor/Detektor) = 130°C/137°C

(TÖ4\_151105)

Das Thujaöl wurde mit etwas Dichlormethan verdünnt. Wieder konnten wir den vermuteten Thujon-Peak bei 10-12 Minuten Laufzeit entdecken und die Probe entsprechend auffangen.

Neunter Lauf des GC mit extrahiertem Thujaöl aus frischen grünen Pflanzenteilen des Thuja (*thuja occidentalis*) (Thujaöl):

V = 80 µl

t = 20 min

p = 30 psi

T(Ofen) = 200°C

T(Injektor/Detektor) = 130°C/137°C

(TÖ5\_151105)

Das Thujaöl wurde wieder in Dichlormethan gelöst und der vermutete Thujon-Peak trat an erwarteter Stelle auf. Das Thujon wurde aufgefangen.

Zehnter Lauf des GC mit extrahiertem Thujaöl aus frischen grünen Pflanzenteilen des Thuja (*Thuja occidentalis*) (Thujaöl):

$V = 100 \mu\text{l}$

$t = 20 \text{ min}$

$p = 30 \text{ psi}$

$T(\text{Ofen}) = 200^\circ\text{C}$

$T(\text{Injektor/Detektor}) = 130^\circ\text{C}/137^\circ\text{C}$

(TÖ6\_151105)

Im zehnten Durchlauf verhielt sich das verdünnte Thujaöl erwartungsgemäß und wir haben eine Probe bei 10-12 Minuten aufgefangen.

Bei den GC-Durchläufen des Thujaöl war festzustellen, dass bei jedem Durchlauf der vermutete Dichlormethan-Peak, der bei ca. 4 Minuten Laufzeit auftrat, kleiner ausfiel (er fiel von über 400mV bis auf knapp über 300 mV im letzten Durchlauf). Das lag wahrscheinlich daran, dass wir den Kolben mit dem Thujaöl geöffnet ließen und das Lösungsmittel langsam verdampfte, was von Vorteil für die Gaschromatographie war. Die Größe des vermuteten Thujon-Peaks nahm mit den Versuchen immer weiter zu (von ca. 100 mV am Anfang bis ca. 195 mV an Ende). Ebenso war eine schöne Regelmäßigkeit der beiden größten Peaks zu beobachten, was das Auftreten nach Laufzeit betrifft.

Die Proben, von denen wir vermuten, dass es sich um Thujon handelt, haben wir mit einem Röhrchen, welches in einem Eisbad gekühlt wurde, aufgefangen (s. Abb. unten rechts).

Anschließend wurde das Röhrchen mit Dichlormethan  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gespült und die Lösung aufgefangen, da es sich jedes Mal nur um sehr geringe Mengen des vermuteten Thujons handelte. Das Lösungsmittel wurde anschließend verdampft. Es blieb eine geringe Menge der Probe zurück („GC-Probe“).



# Protokoll

Datum: 29. November 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

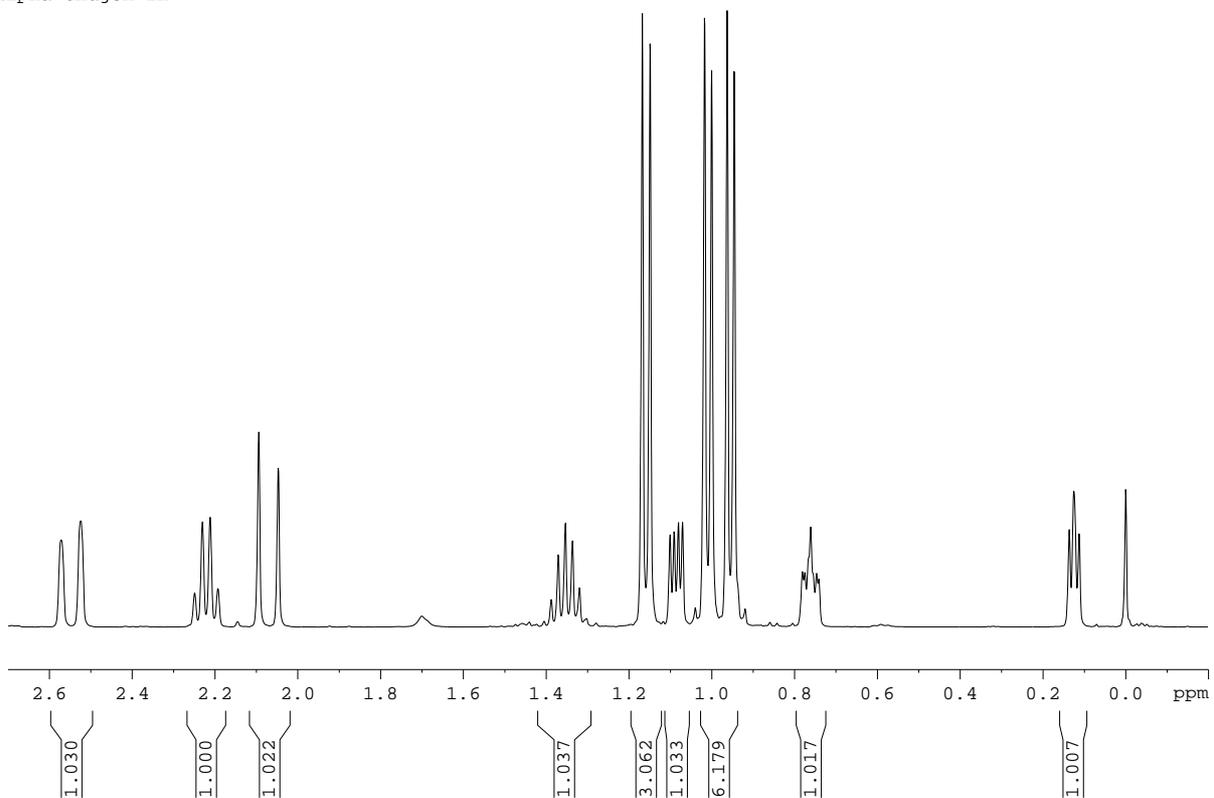
Tätigkeit: Untersuchung von Thujon und Thujaöl im GC/MS und NMR-Spektroskop

Durchführung:

Vor Beginn der Untersuchungen erhielten wir eine Einführung in die Anwendung der Analysegeräte zur Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) und in die Anwendung des NMR-Spektroskops durch Frau Oehme und Prof. Berger.

Als erstes erstellten wir von gekauftem  $\alpha$ -Thujon der Firma Fluka Chemie GmbH ein NMR-Spektrum, um ein Vergleichsspektrum zu unseren Substanzen zu erhalten. Dazu wurde dieses in deuteriertem Chloroform (Trichlormethan-d oder  $\text{CDCl}_3$ ) gelöst und untersucht.

alpha thujon 1H



$^1\text{H}$ -Spektrum des  $\alpha$ -Thujons

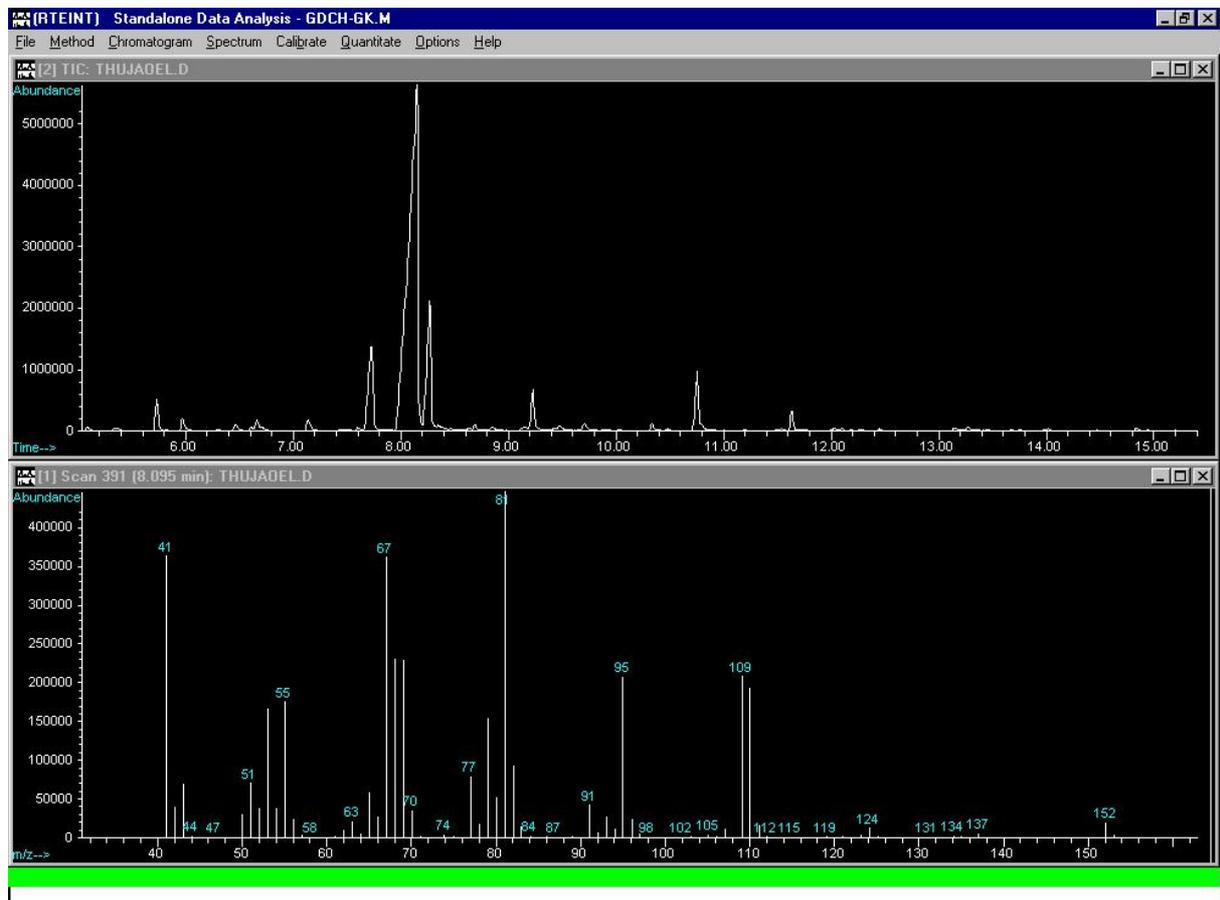
Die Untersuchung der „GC-Probe“ vom 15.11.2005 ergab, dass kein Thujon in der Probe vorhanden war.

Untersuchen der „GC-Probe“ mithilfe von GC/MS:

Diese Untersuchung zeigte, dass nur sehr wenig Thujon enthalten sein könnte.

(Thujonth.m )

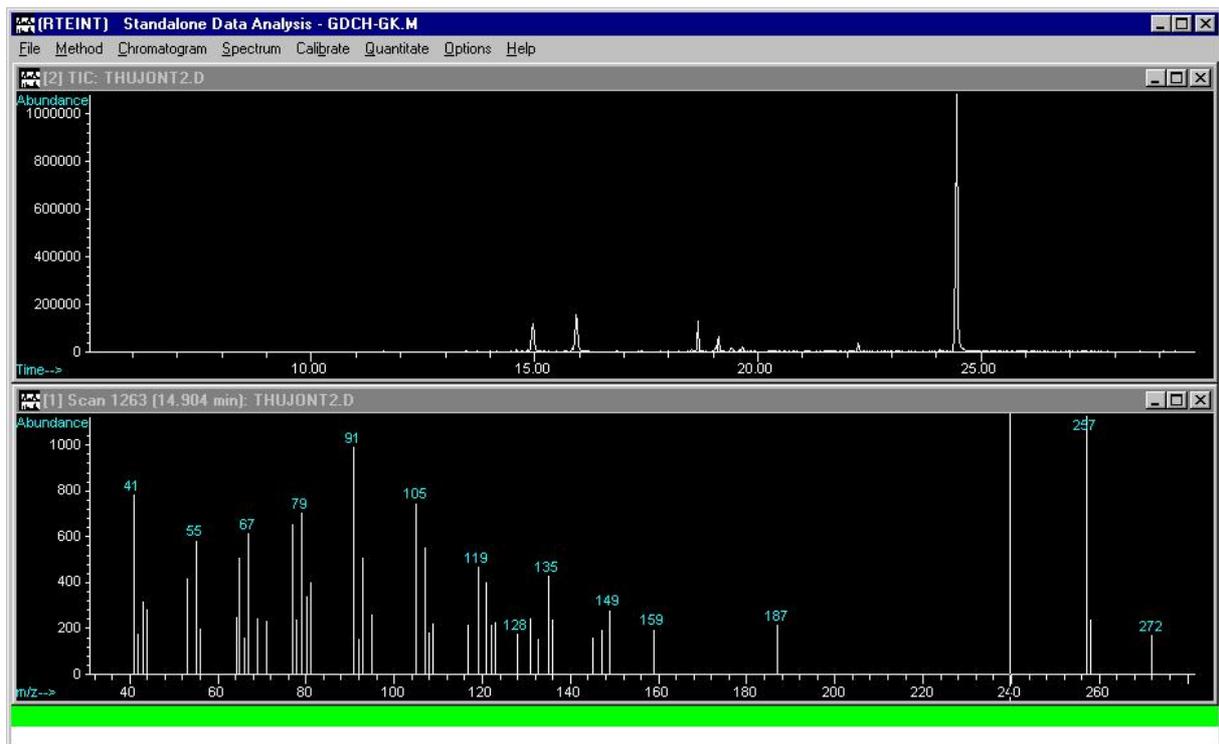
Untersuchen von Thujaöl („Thujaöl“), genau wie wir es aus der Wasserdampfdestillation erhalten haben, mithilfe von Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS):



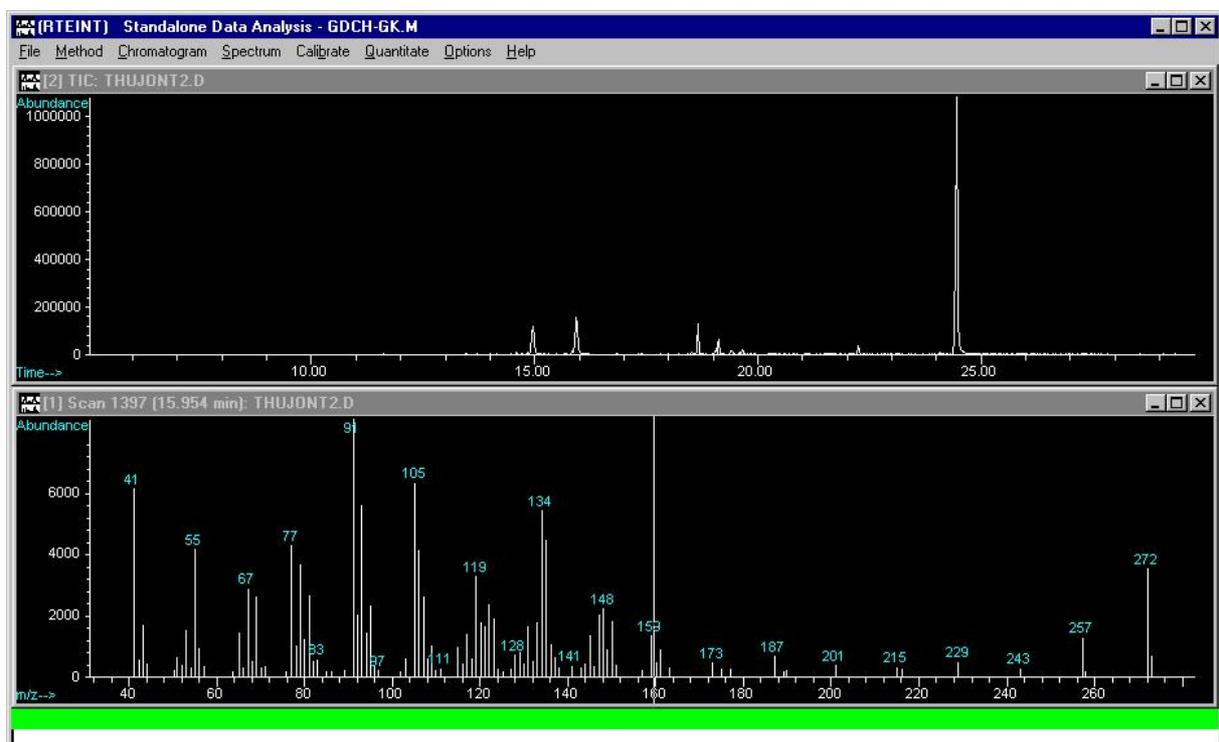
In diesem Massenspektrum kann man eindeutig Thujon bei rund 8 Minuten Laufzeit erkennen.

(Thujaoel.d)

Untersuchen von der „GC-Probe“ mit weniger Lösungsmittel als beim ersten GC/MS:



Massenspektrum der bei 15 Minuten auftretenden Substanz.



Massenspektrum der bei 16 Minuten auftretenden Substanz.

Es war kein Thujon in der Probe „GC-Probe“ vorhanden. Ein Abgleich mit der Bibliothek zeigte, dass wahrscheinlich bei 15 Minuten Laufzeit Rimuen (Phenanthren,  $C_{20}H_{32}$ ;  $M=272 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) und bei 16 Minuten Laufzeit Kaur-16-en ( $C_{20}H_{32}$ ;  $M=272 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) in der Probe auftraten.

(ThujonT2.d)

Funktionsweise:

- Quadropol trennt die Ionen
- Stoffe, die keinen Stickstoff enthalten, haben eine gerade Molmasse
- Molpeak - der letzte Peak
- der Molpeak ist selten der Basispeak
- der intensivste Peak: Basispeak

## Protokoll

Datum: 13. Dezember 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Extraktion von Salbeiöl aus getrocknetem Salbei (*Salvia officinalis*)

Durchführung:

Wegen der defekten Hochleistungsflüssigkeitschromatografieanlage (HPLC) konnten wir die bereits destillierten Öle nicht noch weiter trennen und haben uns entschieden eine weitere Pflanze zur Thujonextraktion heranzuziehen. Verwendet wurde getrocknetes Salbei. Zunächst haben wir die Destillationsapparatur gereinigt und aufgebaut, wie schon bei den vorangegangenen Destillationen.



Danach wogen wir 50 g des getrockneten Salbeis ab und bestückten die Destillationsapparatur damit (s. Bild rechts).

Weiterhin gaben wir in den linken Rundkolben der Destillationsapparatur 300 ml Dichlormethan  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  als Lösungsmittel für das ätherische Öl des Salbeis.

Die Destillation ließen wir 4 Stunden laufen.

Am Ende der Destillation war die organische Phase durchsichtig. (s. Abb. unten).



## Protokoll

Datum: 14. Dezember 2005

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Extraktion von Salbeiöl aus getrocknetem Salbei (*Salvia officinalis*)

Durchführung:

Im Anschluss an die Wasserdampfdestillation vom Vortag führten wir die Trennung der wässrigen und organischen Phase durch, da viel Wasser im Verlauf der Destillation in den linken Rundkolben (s. Abb. rechts) mit dem Lösungsmittel Dichlormethan gelangt war.

Danach wurde die organische Phase über Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) getrocknet.

Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im

Rotationsverdampfer blieb ein klares gelboranges Öl zurück. („Salbeiöl“)



# Protokoll

Datum: 03. Januar 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Instandsetzung der Hochleistungsflüssigkeitschromatografieanlage

Durchführung:

Da unsere weitere Tätigkeit von der Verfügbarkeit der Hochleistungsflüssigkeitschromatografieanlage (HPLC) anhängig war, mussten wir uns darum kümmern sie nach einem UV-Lampentausch mit unserer Betreuerin Frau Maywald wieder in Gang zu bringen.

Die Anlage war bereits seit einigen Wochen nicht mehr arbeitsfähig. Zunächst haben wir uns mit dem zugehörigen Anwendungsprogramm vertraut gemacht und danach die Ursache für die zu geringe Lichtintensität gesucht. Schließlich konnten wir mit einigen Testläufen die Säule spülen.



# Protokoll

Datum: 17. Januar 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Reinigen der Drehbandkolonnendestillationsapparatur, Destillation von Wermutöl der Firma ASAV GmbH, Wissensaneignung über die Funktionsweise der verschiedenen Kolonnendestillationsapparaturen

Durchführung:

Die Drehbandkolonnendestillationsapparatur (s. Abb. rechts) wurde in Leerläufen mit Dichlormethan und Aceton gespült.

Anschließend versuchten wir 5 ml Wermutöl der Firma ASAV GmbH zu destillieren.

Dabei war unser Ziel  $\alpha$ -Thujon und  $\beta$ -Thujon von den restlichen Ölbestandteilen zu trennen. Zum Erhitzen der Probe wurde ein Silikonölbad verwendet, da die Siedetemperatur für die beiden Thujone bei ca. 201°C bei Normdruck liegt. Unglücklicherweise war die Heizplatte nicht stark genug und die 201°C konnten nicht erreicht werden.

Die verspiegelte Kolonne diente dabei zur Stabilisierung des Systems, insbesondere hinsichtlich der Temperatur, und sollte eine vorsichtige, den Stoff schonende Destillation erlauben.



# Protokoll

Datum: 31. Januar 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Destillation von Wermutöl der Firma ASAV GmbH in der Drehbandkolonnen-destillationsapparatur

Durchführung:

Heute haben wir die

Drehbandkolonnendestillation unter Vakuum

durchgeführt. Zur Erzeugung des Vakuums

wurde eine Wasserstrahlpumpe verwendet.

Die Destillation konnte nicht erfolgreich

beendet werden, das Vakuum wahrscheinlich

nicht stark genug war.



# Protokoll

Datum: 21. Februar 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Destillation von Wermutöl der Firma ASAV GmbH in der Drehbandkolonnendestillationsapparatur

Durchführung:

Die Drehbandkolonnendestillation wurde unter Vakuum durchgeführt. Zur Erzeugung des Vakuums verwendeten wir eine Vakuumpumpe. Wir entnahmen drei Fraktionen zwischen des Destillats zwischen 22°C und 35°C. Ergebnisse siehe Tabelle unten.

Anschließend bereiteten wir NMR-Röhrchen der Destillate vor, um zu untersuchen, ob sich darin  $\alpha$ -Thujon bzw.  $\beta$ -Thujon befinden. Als Lösungsmittel diente deuteriertes Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ). Wir

vermuten, dass es sich zum größten Teil um  $\beta$ -Thujon handelt, da dieses Isomer im Wermut häufiger vorkommt, als  $\alpha$ -Thujon.



Fraktion	Gew. Kolben vor der Destillation	Gew. Kolben nach der Destillation	Gew. Destillat	Temperaturbereich
1	26,5033 g	27,0884 g	0,5851 g	22°C – 25°C
2	15,9218 g	16,0699 g	0,1481 g	26°C – 28°C
3	10,8063 g	11,8562 g	1,0499 g	29°C – 35°C

# Protokoll

Datum: 22. Februar 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: NMR-spektroskopische Untersuchung der Wermutöldestillate vom Vortag, Gaschromatografie der Destillate

Durchführung:

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der drei Fraktionen resultierte in folgenden

Ergebnissen:

- die erste und zweite Fraktion sind nahezu identisch
- bei beiden ergab eine grobe Auswertung des NMR-Spektrums, dass es sich um relativ reines Thujon handelt (~90%, geschätzt)
- die dritte Fraktion enthält einen unbekanntes Stoff, den es zu identifizieren gilt, sofern Zeit dafür vorhanden ist

Durch eine schlechte Kommunikation zwischen dem Gaschromatografen und dem Rechner mussten wir als Grundlage zum Auffangen des Thujons ein Spektrum verwenden, welches einige Tage zuvor von unserer Betreuerin Frau Maywald mit einem sehr ähnlichen Stoffgemisch angefertigt wurde. Demzufolge lag die Thjonspitze zwischen 8 und 9,5 Minuten Laufzeit. Wir führten vier Chromatografien durch und fingen das Thujon jedes mal zur angegebenen Zeit auf. Anschließend wurde es im Kühlschrank aufbewahrt.

# Protokoll

Datum: 28. Februar 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: HPLC von gekauftem  $\alpha$ -Thujon der Firma Fluka und drehbanddestilliertem Wermutöl der Firma ASAV GmbH (Fraktionen 1 und 2)

Durchführung:

Am Vormittag haben wir die Gaschromatografie der Fraktion 1 vom 21. Februar 2006 durchgeführt, am Nachmittag die HPLC.

Als Lösungsmittel für die HPLC wurde Methanol verwandt und die Laufzeit betrug 30 Minuten. Wir verwandten die Säule Eurospher 100.

In der Auswertung stellten wir fest, dass kein Peak auf das Vorhandensein von Thujon deutete. Dass schlossen wir aus dem  $\alpha$ -Thujon Vergleichsgraphen.



## Protokoll

Datum: 11. April 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: HPLC von einer  $\alpha$ -/ $\beta$ -Thujonmischung aus gekauftem  $\alpha$ -Thujon der Firma Fluka und drehbanddestilliertem Wermutöl der Firma ASAV GmbH (Fraktionen 1 und 2)

Durchführung:

Mit dieser Mischung wollen wir versuchen die beiden Thujonisomere voneinander zu trennen. Wenn uns das gelingt, können wir auch das durch Drehbanddestillation gewonnene Thujon reinigen.

Vor der HPLC der Mischung wurde die analytische Säule mit Trichlormethan (Choloroform) gespült. Dieses Lösungsmittel wurde gewählt, weil es nicht so polar, wie das zuletzt verwendete Methanol ist.

Die Graphen weisen alle eine ähnliche Struktur auf. Nach ca. 2,5 Minuten (bei 1 ml/min) bzw. 4,25 Minuten (bei 0,5 ml/min) treten zwei Peaks auf.

Zur Untersuchung der Peaks haben wir mehrere Chloroformläufe ohne Thujon durch geführt. Dabei haben wir festgestellt, dass der zweite der gemeinsam auftretenden Peaks der Chloroform-Peak ist. Weiterhin vermuten wir, dass es sich bei dem ersten Peak um den Thujon-Peak handelt, wobei die beiden Isomere gemeinsam auftreten.

Darüber hinaus versuchten wir zum Ende des Tages hin das Lösungsmittel polarer zu gestalten, indem wir 5 v.H. Ethanol und 95 v. H. Chloroform einsetzten.

Da uns die Zeit ausging, werden wir die entsprechenden Graphen das nächste Mal aufnehmen.

# Protokoll

Datum: 02. Mai 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: HPLC von  $\alpha$ -Thujon der Firma Fluka

Durchführung:

Das gekaufte  $\alpha$ -Thujon enthält laut Prof. Bergers NMR-Spektrum einen gewissen Anteil an  $\beta$ -Thujon. Diesen versuchten wir mittels HPLC vom  $\alpha$ -Thujon zu trennen, um nachzuweisen, dass eine solche Trennung möglich ist.

Da sich ein gewisser Dichtungsring in der Apparatur beim Durchfluss von einem polaren gefolgt von einem unpolaren Lösungsmittel verengt, mussten wir erst mit dem polaren Ethanol spülen, um dann bei der Analyse mit unpolarerem Acetonitril (Methylcyanid, Ethannitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) genügend Druck zu haben.

Für alle: große präparative Säule C18, 230 nm, Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min

- 1.) Lösungsmittel: Ethanol (Spülung)
- 2.) Lösungsmittel: Acetonitril (Spülung)
- 3.) Lösungsmittel: Acetonitril  
 $\alpha$ -Thujon: 55  $\mu\text{l}$  (pur)  
[alpha\_Thujon\_020506\_1]
- 4.) Lösungsmittel: Acetonitril  
 $\alpha$ -Thujon: 55  $\mu\text{l}$  (pur)  
[alpha\_Thujon\_020506\_2]
- 5.) Lösungsmittel: Acetonitril  
 $\alpha$ -Thujon: 70  $\mu\text{l}$  (pur)  
[alpha\_Thujon\_020506\_3]  
aufgefangen, NMR (1)
- 6.) Lösungsmittel: Ethanol (Spülung)
- 7.) Lösungsmittel: Ethanol  
 $\alpha$ -Thujon: 90  $\mu\text{l}$   
[a-Thujon\_ethanol\_20060502\_1]  
aufgefangen, NMR (2)

Die NMR-spektroskopische Analyse ergab, dass es sich bei NMR (1) und (2) um  $\alpha$ -Thujon mit dem selben Grad an Verunreinigung durch  $\beta$ -Thujon handelt. Die Verunreinigung, die von Anfang an in der Probe vorhanden war, konnte nicht abgetrennt werden.

# Protokoll

Datum: 10. Mai 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: NMR-Spektren von  $\alpha$ -Thujon der Firma Fluka

Durchführung:

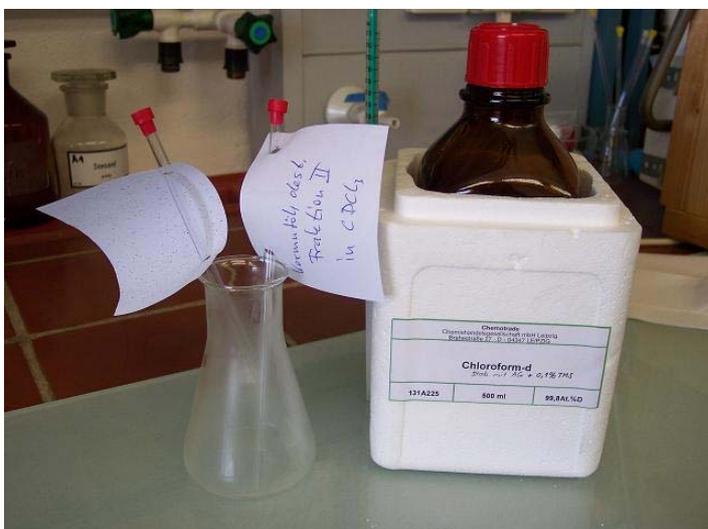
Zuerst haben wir etwas  $\alpha$ -Thujon in deuteriertem Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) gelöst und ein NMR-Röhrchen vorbereitet (s. Bild unten links).

Anschließend starteten wir die Messungen und erhielten folgende Spektren:

- $^1\text{H}$  Spektrum
- $^{13}\text{C}$  Spektrum
- APT (Attached Proton Test)
- COSY (Correlation Spectroscopy)
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
- NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)

Wir haben dieselben Spektren auch von noch vorhandenem drehbanddestillierten Wermutöl vom 21.2.2006 aufgenommen.

Danach haben wir ein Modell des Thujons zur bessern Verständlichkeit gebaut und die Daten der  $\alpha$ -Thujon Spektren verarbeitet.



# Protokoll

Datum: 11. Mai 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Verarbeiten der NMR-Spektren

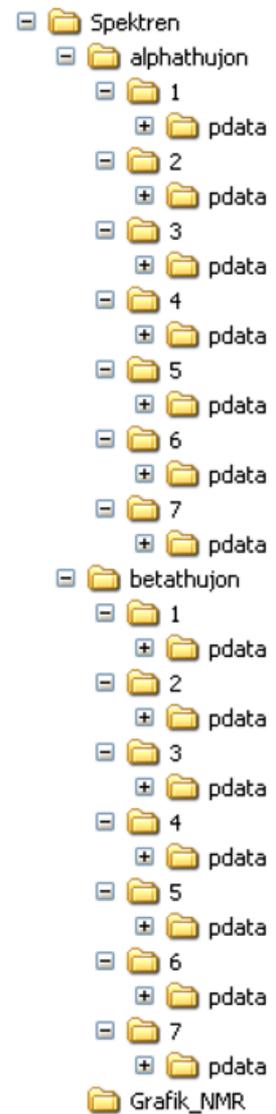
Durchführung:

Heute haben wir die im NMR-Spektroskop aufgenommenen Daten des  $\beta$ -Thujons mit dem Programm „Bruker Topspin 1.3“ verarbeitet.

Dies war notwendig, um die Daten sinnvoll interpretieren zu können.

Die Daten des  $\alpha$ -Thujons haben wir bereits gestern verarbeitet.

Desweiteren haben wir die Spektren zur digitalen Weiterverarbeitung und Einbindung in unsere „Besondere Lernleistung“ vorbereitet.



# Protokoll

Datum: 12. Mai 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Interpretation der NMR-Spektren

Durchführung:

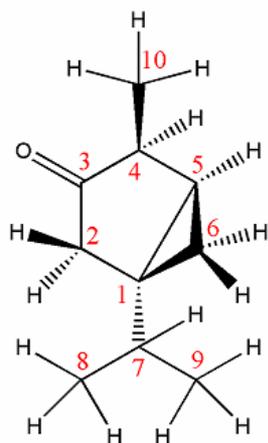
Am heutigen Tag haben wir die ersten Schritte unternommen, die Spektren des  $\alpha$ -Thujons zu interpretieren.

Im folgenden findet man die Tabelle mit den chemischen Verschiebungen der Peaks im  $^1\text{H}$ - und im  $^{13}\text{C}$ -NMR:

C Atom	Verschiebung in ppm	Bemerkung
1	29,63	
2	39,69	
3	221,36	C=O
4	47,36	
5	25,52	
6	18,71	
7	32,91	
8	19,99	C9 ?
9	19,71	C8 ?
10	18,19	
$\text{CDCl}_3$	77,03	

H Atom	Verschiebung in ppm	Bemerkung
2a	2,07	2e ?
2e	2,55	2a ?
4a	2,22	
5a	1,09	
6i	0,76	6f ?
6f	0,13	6i ?
7a	1,35	
8a-c	1,01	9a-c ?
9a-c	0,96	8a-c ?
10a-c	1,16	

Folgende Nummerierung der H- und C-Atome liegt dieser Auflistung zugrunde:



Strukturformel des  $\alpha$ -Thujons, IUPAC Nummerierung

Für diese Überlegungen haben wir die Spektren  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , APT, COSY, HSQC und HMBC herangezogen.

Einige Protonen und C-Atome konnten wir aufgrund ihrer Ähnlichkeit noch nicht zuordnen.

Insbesondere betrifft dies die beiden Methylgruppen am C7-Atom und deren Protonen, sowie die Protonen am C2- und C6-Atom.

Diese Sachverhalte müssen nun mit Zuhilfenahme des NOESY-Spektrums geklärt werden.

## Protokoll

Datum: 15. Mai 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Interpretation der NMR-Spektren

Durchführung:

Die Auswertung der NOESY-Spektren:

Die Zuordnung der geminalen Protonen am Dreiring ist zugleich die Bestimmung, ob es sich um  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Thujon handelt.

Im  $\alpha$ -Thujon NOESY hat das geminale Dreiringproton, welches nahe am TMS Signal ist (6f), Kontakt zu seinem Zwilling, zum axialen 2a Proton und zu 4a. Das heißt, dass das Proton selber das ist, welches über den Fünfring ragt, und dass 4a nach vorn gerichtet ist, während die C10-Methylgruppe nach hinten schaut. Deshalb handelt es sich hier eindeutig um das cis-Thujon, das  $\alpha$ -Thujon.

Das 6i Proton bei 0,76 ppm (0,6 ppm bei  $\beta$ -Thujon) hat einen NOE Kontakt zum 7a, d.h. zum CH der Isopropylgruppe. Weiterhin gibt es eine Korrelation zwischen 5a und der C10 Methylgruppe.

Im  $\beta$ -Thujon NOESY fehlt der 6f und 4a Kontakt, stattdessen sieht das 6f die C10-Methylgruppe und das 5a Proton korreliert mit dem 4a Proton, was die trans-Situation deutlich macht.

Eindeutige Isomeriezuordnung:

**$\alpha$  - cis:** 6f sieht 4a, 5a sieht C10-Methylgruppe im  $\alpha$ -Thujon NOESY

**$\beta$  - trans:** 6f sieht C10-Methylgruppe, 5a sieht 4a im  $\beta$ -Thujon NOESY

# Protokoll

Datum: 25. Oktober 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Wasserdampfdestillation von zerkleinerten Thujaästen

Durchführung:

Zuerst wurden die Thujaäste in kleine Teile zerhackt und in den rechten Kolben der Wasserdampfdestillationsapparatur gefüllt (s. Bild unten). Es wurden 500 ml destilliertes Wasser hinzugegeben. In den linken Kolben füllten wir 400 ml Dichlormethan. Die Destillation lief zwei Stunden.

Desweiteren haben wir für den Folgetag die Drehbandkolonnendestillation von gekauftem Salbeiöl (s. Bild unten) vorbereitet.



Kolben mit Thujaästchen



Salbeiöl

# Protokoll

Datum: 26. Oktober 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Drehbandkolonnendestillation von gekauftem Salbeiöl, Wasserdampfdestillation von zerkleinerten Thujaästen

Durchführung:

Vom am Vortag gewonnenen Destillat wurde die Dichlormethanphase abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und einrotiert.

Die Drehbandkolonnendestillation wurde mit 20 ml gekauftem Salbeiöl (*salvia officinalis*) von Bioherba unter Vakuum ( $7 \cdot 10^{-2}$  mbar) durchgeführt. Wir benutzten diesmal eine größere Kolonne (s. Bild) als bei der Destillation des Wermutöls. Der Kolben war vollständig von Silikonöl umgeben, um eine gleichmäßige Erwärmung des Salbeiöls zu gewährleisten. Es wurden fünf Proben genommen. Dazu muss man bemerken, dass kein eindeutiger Temperaturbereich angegeben werden kann, da die Temperatur in der Kolonne nach dem Verdampfen eines Stoffes immer wieder absank. Die Temperaturkurve sieht also wie eine Berglandschaft aus. Das kann auch daran liegen, dass nach Perioden ohne Gasphase in der Kolonne plötzlich viel Gas am Thermometer vorbeiströmte und deshalb die Anzeige nicht korrekt war. Außerdem war der Messbereich des Thermometers ungeeignet, es war aber kein besseres Thermometer zu beschaffen.

Vorlauf	< 38 °C
Kolben 1	38°C - 35°C
Kolben 2	35°C - 45°C
Kolben 3	40°C - 52°C
Kolben 4	50°C - 75°C (ca. 10 ml)
Kolben 5	65°C - 30°C



# Protokoll

Datum: 27. Oktober 2006

Anwesend: Stefan Döge und Igor Kunze

Tätigkeit: Untersuchung der Fraktion 4 und des Thujaöls vom Vortag, Drehbandkolonnendestillation der Fraktion 4

Durchführung:

Am Morgen haben wir mit Prof. Berger die Zusammensetzung des Thujaöls und der Fraktion 4 des Salbeiöls untersucht. Das wasserdampfdestillierte Thujaöl entsprach von der Reinheit etwa dem, was man im Laden als Duftöle von Thuja, Salbei oder Wermut verkauft bekommt.

Die Fraktion 4 des drehbanddestillierten Salbeiöls wies einen sehr geringen Gehalt an Reststoffen auf und bestand zu 86,5 v. H. aus  $\alpha$ -Thujon und zu 13,5 v. H. aus  $\beta$ -Thujon.

Danach führten wir eine Drehbandkolonnendestillation der Fraktion 4 (etwa 10 ml) durch.

Der Druck betrug 0,1 mbar und wir entnahmen folgende vier Fraktionen:

Kolben 1	< 24°C
Kolben 2	24°C – 29°C
Kolben 3	29°C – 32°C
Kolben 4	32°C – 35°C

Leider konnten wir die Destillation aus Zeitgründen nicht zu Ende führen. Unsere Betreuerin im Labor, Frau Maywald, führte sie weiter.

Das Verhältnis zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thujon berechnet man über die Verhältnisse der Integrale zweier beliebiger Protonenpaare, von denen man weiß, wo sie im jeweiligen  $^1\text{H}$ -Spektrum von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thujon auftreten (hier: 6f, im  $^1\text{H}$ -Spektrum als A bezeichnet).

6f bei  $\alpha$ -Thujon: 0,13 ppm

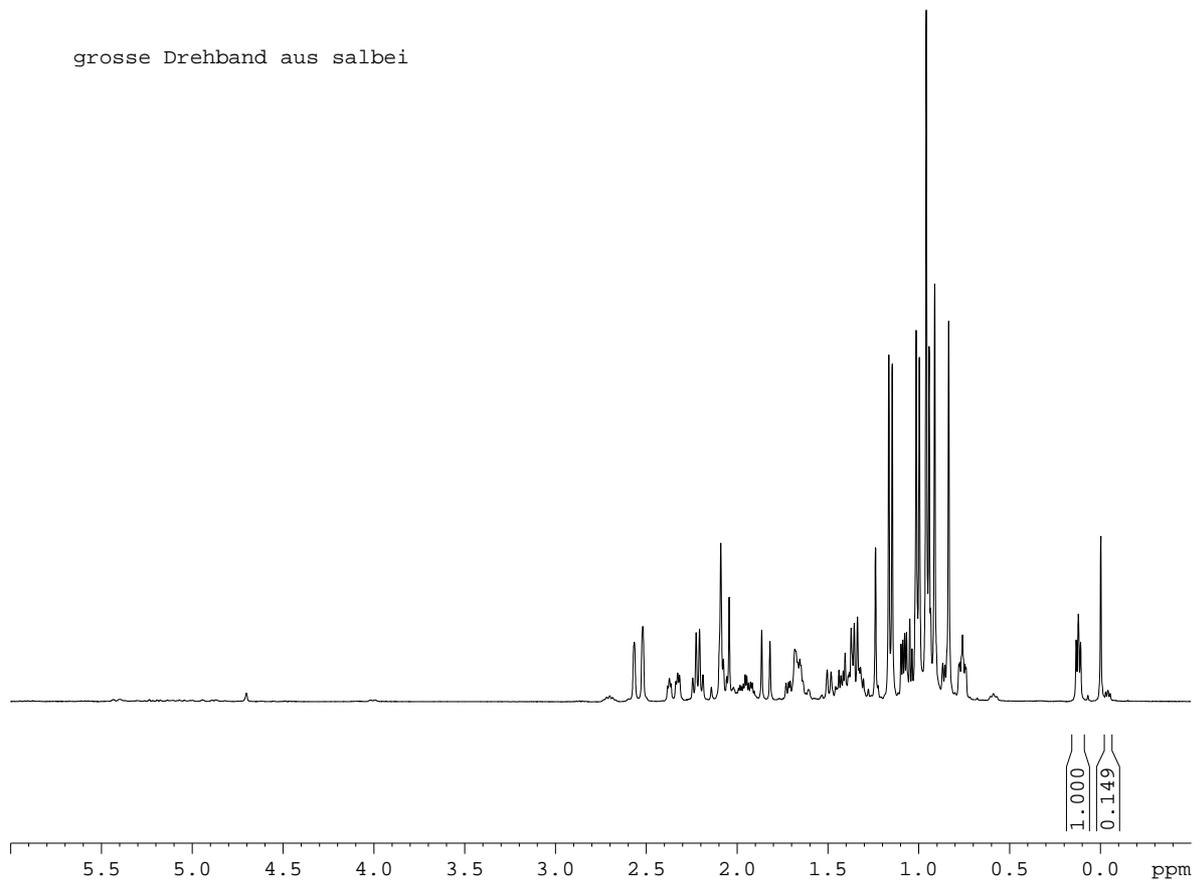
6f bei  $\beta$ -Thujon: -0,04 ppm

Anteil  $\alpha$ -Thujon (in %) =  $\frac{\text{Integral } \alpha\text{-6f}}{(\text{Integral } \alpha\text{-6f} + \text{Integral } \beta\text{-6f})} \cdot 100$ ;

für  $\beta$ -Thujon analog

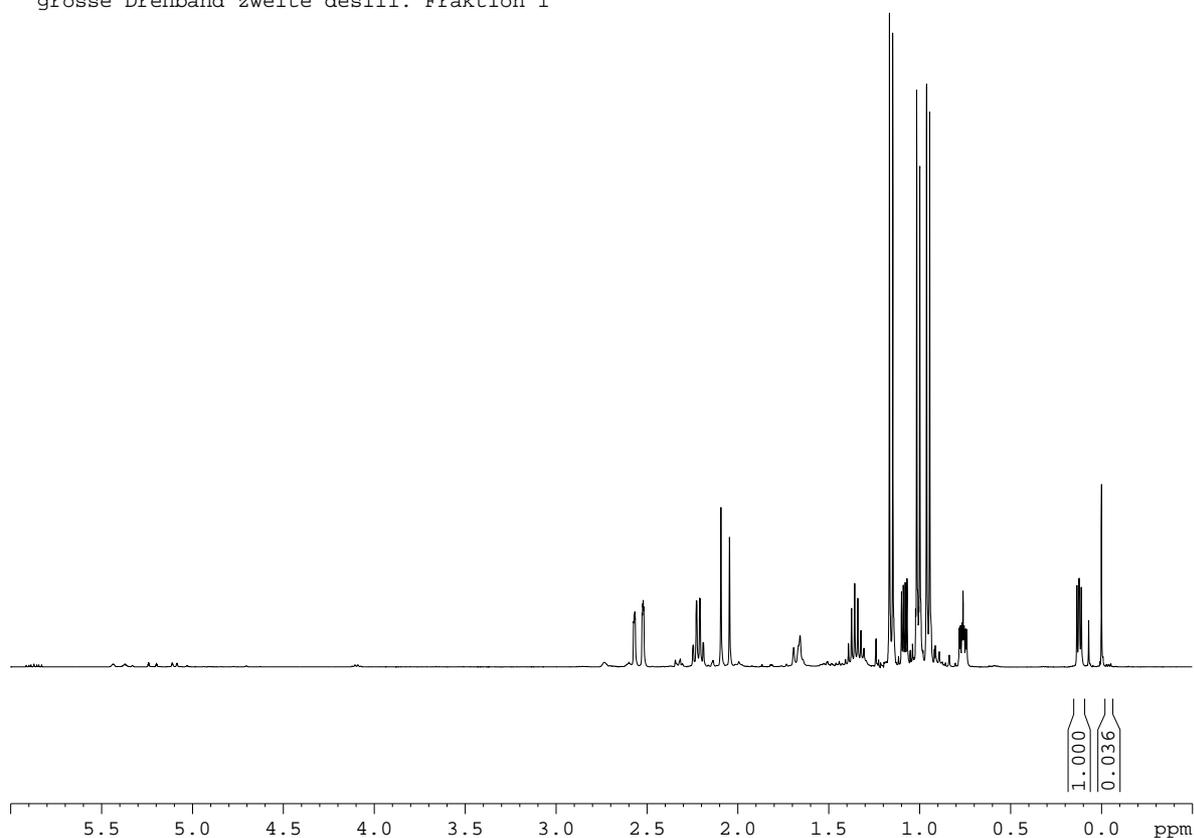
Die NMR-spektroskopische Auswertung der Fraktionen ergab die folgenden Spektren:

grosse Drehband aus salbei



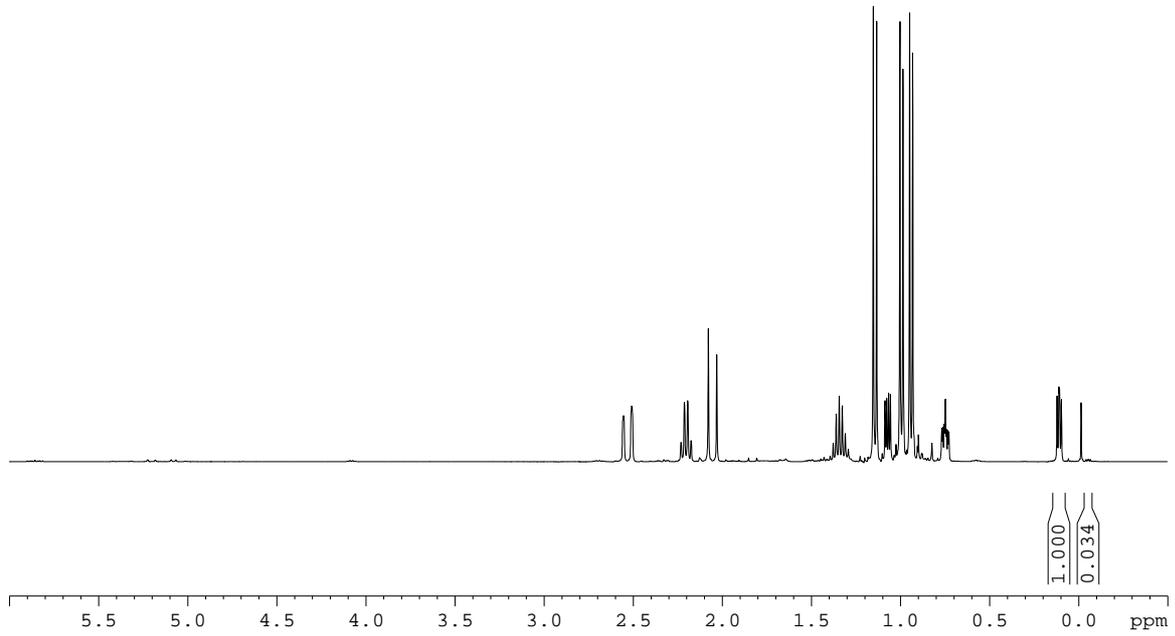
$\alpha$ -Thujon: 87,0 %;  $\beta$ -Thujon: 13,0 %

grosse Drehband zweite desill. Fraktion 1



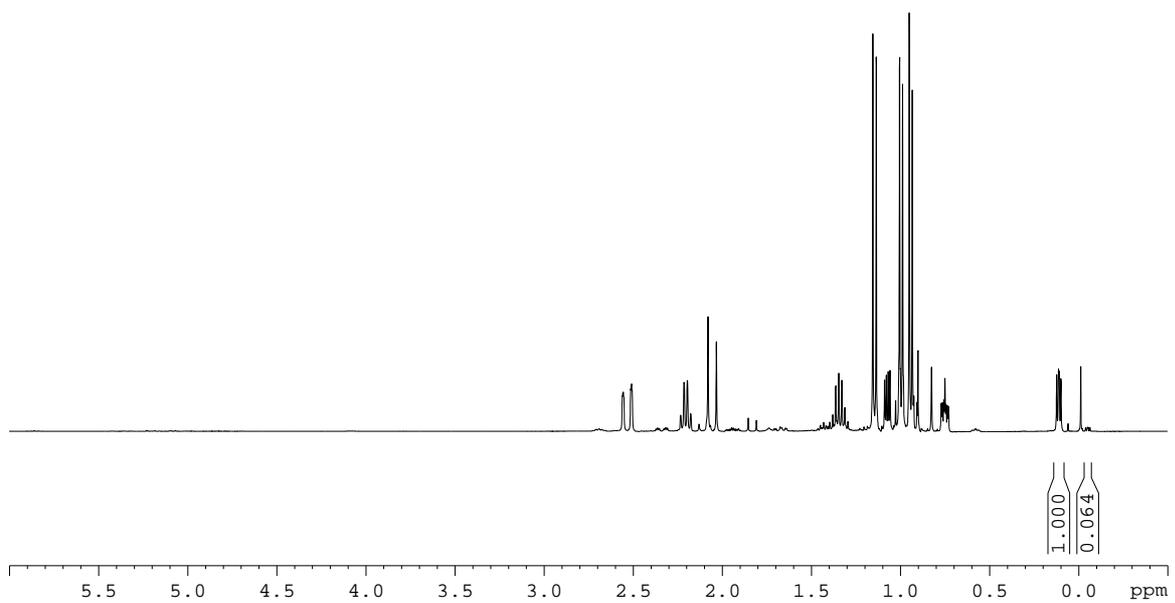
$\alpha$ -Thujon: 96,5 %;  $\beta$ -Thujon: 3,5 %

grosse Drehband zweite desill. Fraktion 2



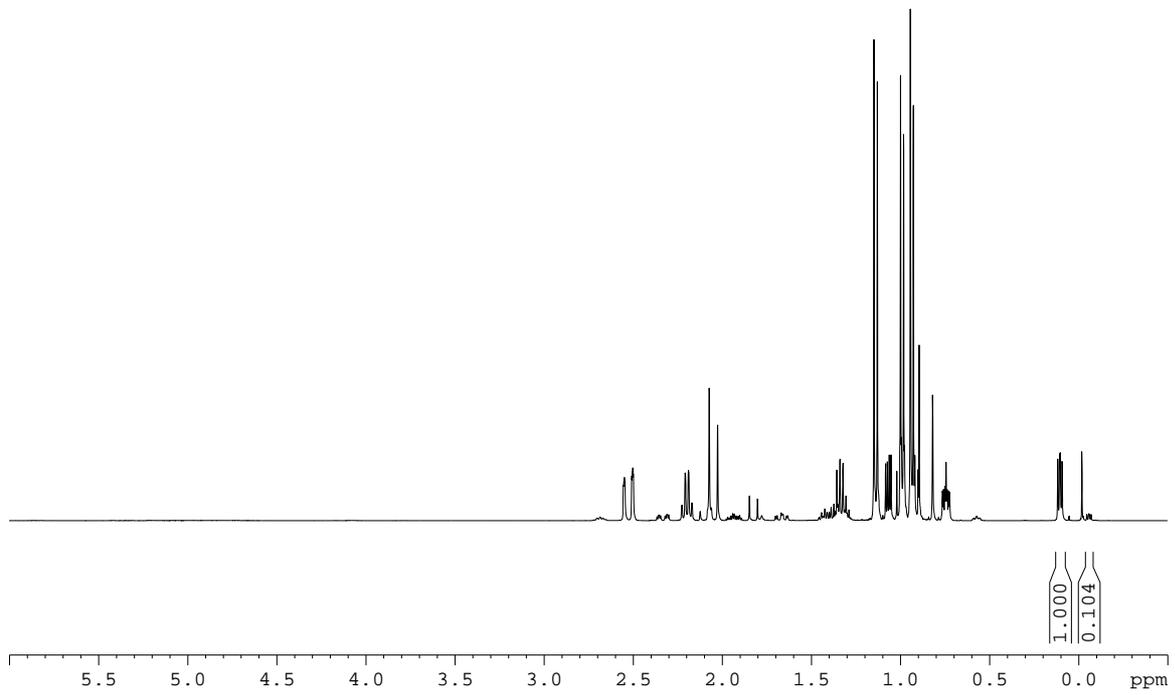
$\alpha$ -Thujon: 96,7 %;  $\beta$ -Thujon: 3,3 %

grosse Drehband zweite Destill. Fraktion 3



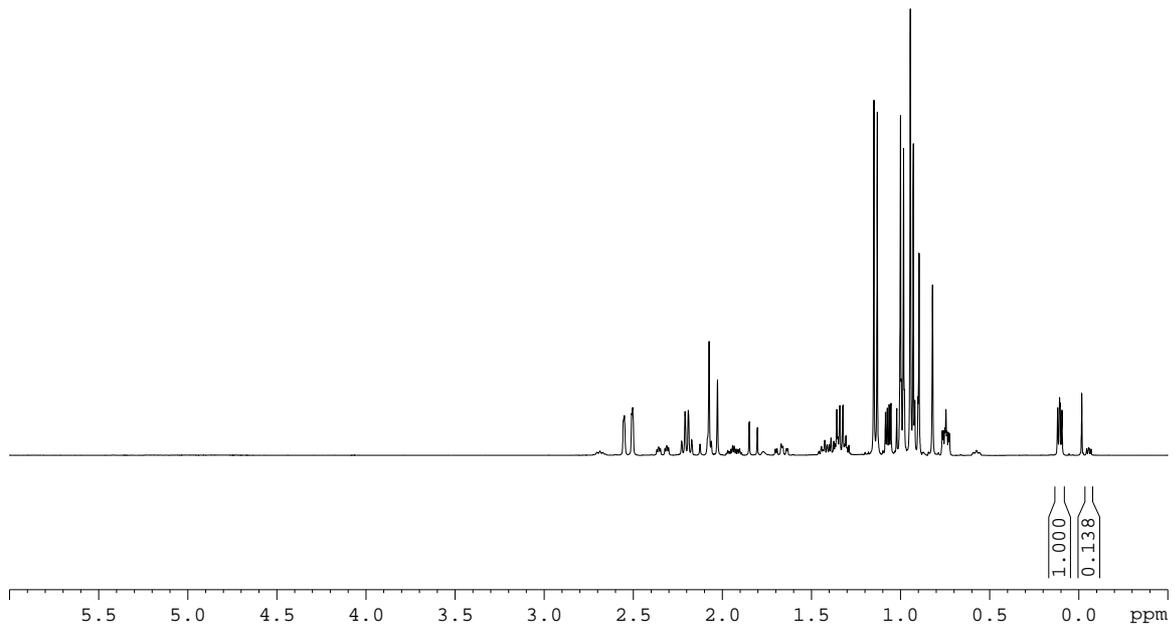
$\alpha$ -Thujon: 94,0 %;  $\beta$ -Thujon: 6,0 %

grosse Drehband zweite Destill. Fraktion 4



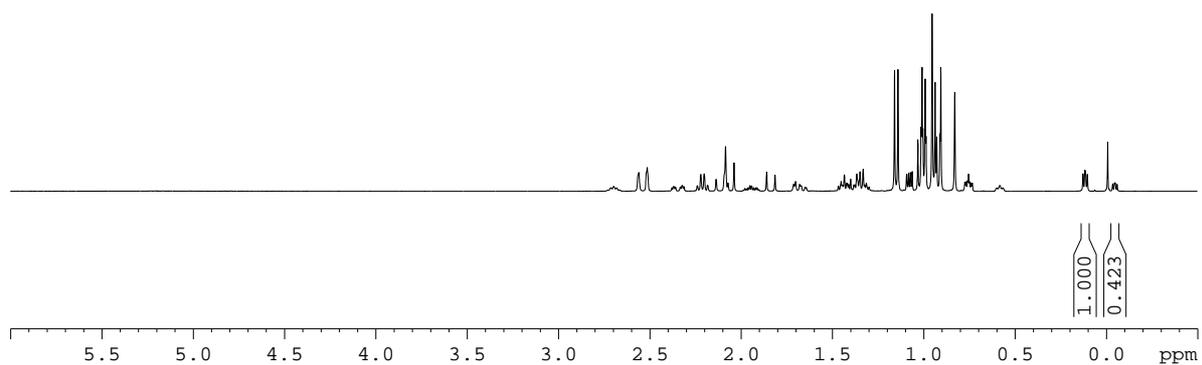
$\alpha$ -Thujon: 90,6 %;  $\beta$ -Thujon: 9,4 %

grosse Drehband zweite Destill. Fraktion 5



$\alpha$ -Thujon: 87,9 %;  $\beta$ -Thujon: 12,1 %

grosse Drehband zweite Destill. Fraktion 7



$\alpha$ -Thujon: 70,3 %;  $\beta$ -Thujon: 27,7 %

Diese Auswertung zeigt, dass eine Trennung der beiden Isomere generell möglich ist. Es ist jedoch von besonderer Wichtigkeit, ein sehr genaues Thermometer und ein fein abstimmbares Heizelement, bzw. Ölbad zu verwenden. Außerdem ist die Trennung der Isomere außerordentlich zeitaufwändig, weil die Probe behutsam, d.h. langsam erhitzt werden muss.