

C. H. Brieskorn*) und J. Melchior**)

Quantitative Änderung der Terpenoide im Keimling und Blatt von *Salvia officinalis* L. unter verschiedenen Bedingungen

21. Mitt. über Inhaltsstoffe von *Salvia* off. L.

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg

(Eingegangen am 11. Februar 1969)

Im Keimling von *Salvia* off. besteht das ätherische Öl anfänglich nur aus Terpenkohlenwasserstoffen. Mit fortschreitendem Wachstum treten sauerstoffhaltige Mono- und Sesquiterpenoide auf, deren Synthese dann bevorzugt abläuft. Schon im Keimling sind Oleanol- und Ursolsäure enthalten. Beim Wachstum vermehrt sich der Anteil an Ursolsäure und vermindert sich der Anteil an Oleanolsäure, bis sich schließlich ein konstantes Verhältnis einstellt. Weder im Keimling noch in der Pflanze treten während der Vegetationsperiode qualitative oder quantitative Änderungen der niederen Terpenoide zugunsten der Triterpensäuren auf. In der Kurztagspflanze werden Triterpensäuren vermehrt aufgebaut; der Gehalt an ätherischem Öl ist deutlich vermindert.

Quantitative Change of Terpenoids in the Germ-bud and Leaf of Sage under various Conditions.

In the germ-bud of sage the essential oil consists only of terpene hydrocarbons. With further growth mono- and sesquiterpenoids appear and they will be preferentially synthesized. The germ-bud contains oleanolic- and ursolic acid. With further growth the quantity of ursolic acid becomes higher, the quantity of oleanolic acid lower. After some time both triterpenic acids attain constant rates. There is no changing from essential oil to triterpenic acids. In the short-day-plant triterpenic acids quantity becomes higher, essential oil quantity lower.

Nach Kenntnis der genauen Zusammensetzung des ätherischen Öles von *Salvia* off. war von Interesse zu erfahren, in welchem Stadium des Wachstums die einzelnen Bestandteile entstehen. Der Stoffwechsel der Mono- und Sesquiterpenoide sollte darüber hinaus in Bezug gesetzt werden zum Gehalt an den Triterpensäuren Oleanol- und Ursolsäure. Das benötigte genetisch einheitliche Material gewannen wir aus Stecklingen eines mit etwa 30 Haupttrieben ausgestatteten Stockes von *Salvia* off. und zwar ihrer Unterart minor. Die zur Verfügung stehenden Blätter reichten für

*) Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. P. Kaufmann zum 80. Geburtstag am 29. 10. 1969 in Verehrung und Dankbarkeit gewidmet.

***) Teil der Dissertation *Joachim Melchior*, Universität Würzburg 1968.

die quantitative Bestimmung des ätherischen Öles nicht aus. Weiteres Material beschafften wir uns von Pflanzen, die aus Samen der angegebenen Art stammten.

Das ätherische Öl der aus Stecklingen und der aus Samen gezogenen Pflanzen war gaschromatographisch identisch mit der früher ermittelten Zusammensetzung¹⁾. Die Blätter ernteten wir nach Insertionen getrennt und verglichen den Gehalt an ätherischem Öl und an Triterpensäuren der Blätter des 1. Wirtels vom 1. Erntetag mit Blättern des jeweils gleichen Wirtels bei den darauffolgenden Ernten. Als Bezugsgröße dient für dieses in Größe und Alter identische Material das Trockengewicht der Blätter. Innerhalb eines Pflanzenindividuums ist die Bezugsgröße das einzelne Blatt, da hier ein in Größe und Alter differierendes Material vorliegt. Das ätherische Öl wird volumetrisch, die Zusammensetzung gaschromatographisch festgestellt. Den Gehalt an Oleanolsäure neben Ursolsäure bestimmten wir auf Grund der unterschiedlichen Rot- und Grünwerte, welche beim Einwirken von Acetanhydrid-Schwefelsäure auftreten²⁾.

Ergebnisse

In der Zusammensetzung des Keimlingöls kommt es im Zeitraum von etwa einem Monat zu auffallenden Veränderungen. Nach dem Gaschromatogramm besteht das ätherische Öl anfänglich aus nahezu 90% Terpenkohlenwasserstoffen und nur zu 10% aus sauerstoffhaltigen Verbindungen. Mit fortschreitendem Keimlingswachstum ändert sich dieses Verhältnis zugunsten der sauerstoffhaltigen Monoterpene. Werden jedoch die absolut entstehenden Mengen der einzelnen Ölkomponenten verglichen, dann steigen alle Komponenten an. Die vermehrte Zunahme der sauerstoffhaltigen Verbindungen Thujon, Campher, Borneol und Cineol findet nicht auf Kosten der Kohlenwasserstoffe statt (Tab. 1).

Das Triterpensäuregemisch des Keimlings besteht im gleichen Zeitraum anfänglich aus 42,8% Oleanolsäure und 57,2% Ursolsäure. Mit zunehmendem Keimlingswachstum und Ausbilden der Primärblätter erfolgt eine Abnahme des Oleanolsäureanteils zugunsten der Ursolsäure. Nach 4 Wochen enthält das Säuregemisch 31,5% Oleanolsäure und 68,5% Ursolsäure.

In den Blättern der Sproßspitze steigt der ätherische Ölgehalt in der Zeit von Juni bis Anfang September von 3,2 auf 4,7% an, um dann wieder abzufallen. Die Gesamtmenge der Triterpensäuren erreicht mit 5,5% im August ihr Maximum, das sich bis zum Ende der Vegetationsperiode im Oktober kaum verändert (Abb. 1).

In der prozentualen Zusammensetzung des ätherischen Öls kann von Erntedatum zu Erntedatum eine Änderung im Komponentenspektrum beobachtet werden. Der Anstieg der Hauptkomponente Thujon erfolgt von 33 auf 54% (Tab. 2).

¹⁾ C. H. Brieskorn und S. Dalferth, Dtsch. Apotheker-Ztg. 104, 1388 (1964).

²⁾ C. H. Brieskorn und H. Hofmann, Arch. Pharmaz. 295, 505 (1962).

Tabelle 1
Quantitative Zusammensetzung des Keimlingöls

Datum	Salven		α -Pinen (+ Tricyclen)		Camphen		β -Pinen		Cineol (+ Limonen)		α - + β - Thujon		Campher		Borneol (+ Bornylacet.)		Caryo- phyllen		Humulen	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
4. 3. 1967	-	-	3,2	+	1,8	+	29	+	1,6	+	8,5	+	1,5	+	1,0	+	6,5	+	45,5	+
15. 3. 1967	-	-	5,3	0,96	3,3	0,59	28	5,1	6,8	1,2	33	6,0	6,7	1,2	0,9	0,16	1,2	0,21	11	2,0
26. 3. 1967	-	-	4,8	3,0	3,2	2,0	19,5	12,3	9,4	6,0	40	25,2	8,3	5,3	1,1	0,7	1,2	0,75	9,5	6,0

a = mg in 100 mg Öl (= Prozentanteil)
b = mg in 1000 Keimlingen (= absolute Menge)

Tabelle 2
Quantitative Zusammensetzung des ätherischen Öls in den Blättern der Sproßspitzen
einjähriger Pflanzen während der Vegetationsperiode

Datum	Salven		α -Pinen/ Tricyclen		Camphen		β -Pinen		Cineol/ Limonen		α - + β - Thujon		Campher		Borneol/ Bornylacet.		Caryo- phyllen		Humulen	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
18. 6. 1966	-	-	5,2	0,16	5,1	0,16	3,8	0,12	12,8	0,40	33,0	1,05	18,6	0,59	4,4	0,14	5,4	0,17	11,0	0,35
30. 6. 1966	-	-	3,9	0,14	4,1	0,15	3,6	0,13	12,5	0,45	35,6	1,29	14,5	0,53	6,0	0,22	6,7	0,24	11,4	0,41
13. 7. 1966	-	-	3,8	0,17	3,4	0,15	4,0	0,18	12,1	0,53	34,0	1,50	14,7	0,64	4,5	0,20	7,4	0,32	14,8	0,65
26. 7. 1966	-	-	3,6	0,16	3,3	0,15	4,7	0,21	14,2	0,63	37,8	1,70	11,7	0,52	3,3	0,15	7,3	0,32	13,1	0,58
12. 8. 1966	-	-	3,0	0,14	3,2	0,15	4,6	0,21	12,8	0,58	46,3	2,10	10,3	0,47	1,9	0,09	5,6	0,26	10,7	0,49
6. 9. 1966	-	-	2,6	0,12	3,0	0,14	4,3	0,20	12,6	0,60	47,0	2,20	12,0	0,57	1,4	0,07	5,8	0,27	11,0	0,51
27. 9. 1966	-	-	2,2	0,08	2,3	0,09	3,6	0,13	9,4	0,35	53,7	2,00	11,5	0,43	1,2	0,05	4,5	0,17	10,5	0,39
18. 10. 1966	-	-	3,4	0,09	4,0	0,11	4,4	0,12	10,6	0,29	53,6	1,50	12,2	0,33	1,7	0,05	3,2	0,09	5,8	0,16

a = g des entsprechenden Terpens in 100 g Öl (= Prozentanteil am Gesamtöl)
b = g des entsprechenden Terpens, berechnet auf 100 g getrocknete Blattdroge (= absolute Menge)

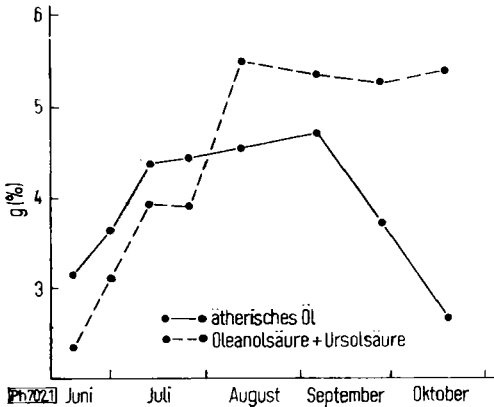


Abb. 1

Änderungen des Gehalts an ätherischem Öl und Triterpensäuren während der Vegetationsperiode, bezogen auf Trockengewicht

Bezogen auf die absolut entstandenen Mengen steigen alle Einzelkomponenten, abgesehen von kleinen Schwankungen, von Juni bis Anfang September an, um dann wieder abzufallen. Anstieg bzw. Abfall des ätherischen Ölgehaltes beruht demnach auf einem gemeinsamen Anstieg bzw. Abfall seiner einzelnen Komponenten, ohne daß eine quantitative Veränderung des einen Bestandteils zugunsten des anderen erfolgt.

In den Blättern der Sproßspitzen der einjährigen Pflanze bleibt während der Vegetationsperiode das Verhältnis von 28,3% Oleanolsäure zu 71,7% Ursolsäure nahezu konstant.

Innerhalb einer Pflanze erreicht der Gehalt an ätherischem Öl in den Blättern der 3. Insertion, bei den Triterpensäuren in denen der 4. Insertion sein Maximum. Die Hauptkomponenten Thujon, Campher und Cineol zeigen in den Ölen aller Insertionen einen annähernd konstanten Prozentgehalt. Das Maximum der absoluten Mengen tritt für alle Einzelkomponenten in den mittleren Blattinsertionen auf (Tab. 3). Die absoluten Mengen der Terpenoide sind jeweils mit der Änderung des Gesamtölgehaltes identisch. Eine Ausnahme macht der Kohlenwasserstoff Salven. Er tritt erst im Öl der 3. Insertion auf und steigt mit zunehmender Insertionszahl an. Das Verhältnis von Oleanolsäure zu Ursolsäure bleibt innerhalb der verschiedenen Blattinsertionen nahezu unverändert. Es beträgt durchschnittlich 28,7% zu 71,3%.

Bei zweijährigen Pflanzen ist durch den Blütenstand die Ernte wachstumsidentischer Blätter erschwert. Unsere Ergebnisse beziehen sich auf das jeweilige erste Blatt unterhalb des Blütenstandes. Bei aufeinanderfolgenden Ernten weist demnach das Blatt zum Zeitpunkt der Ernte ein unterschiedliches Alter auf. Der Öl- und Triterpengehalt ist auf das Blatt bezogen.

Tabelle 3

Quantitative Zusammensetzung des ätherischen Öls in den einzelnen Blattinsertionen einjähriger Pflanzen

Insertion	Salven		α -Pinen/ Tricyclen		Camphen		β -Pinen		Cineol/ Limonen		α - + β - Thujon		Campher		Borneol/ Bornylacet.		Carvo- phyllen		Humulen	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
I	—	—	3,8	0,038	3,9	0,040	4,0	0,045	12,1	0,12	34,0	0,34	14,5	0,145	4,5	0,045	7,4	0,075	14,8	0,15
II	—	—	3,7	0,064	4,1	0,070	3,7	0,064	12,0	0,21	37,9	0,65	16,5	0,28	4,6	0,08	4,8	0,082	11,5	0,20
III	Spur	Spur	3,9	0,068	4,3	0,074	3,0	0,052	11,8	0,21	36,6	0,64	15,6	0,27	7,6	0,13	4,6	0,080	11,4	0,20
IV	0,4	0,006	5,4	0,086	4,6	0,074	2,9	0,046	11,9	0,19	36,3	0,58	18,4	0,30	5,3	0,085	3,8	0,061	9,2	0,15
V	0,8	0,011	5,6	0,075	5,4	0,072	2,9	0,039	10,4	0,14	35,0	0,47	21,3	0,28	4,6	0,061	3,9	0,052	8,9	0,11
VI	1,7	0,021	6,1	0,075	5,8	0,072	3,9	0,048	10,6	0,13	37,6	0,46	16,3	0,20	4,5	0,056	4,1	0,051	8,3	0,10

a = mg des entsprechenden Terpens in 100 mg Öl (= Prozentanteil am Gesamtöl)

b = mg des entsprechenden Terpens in 1 Blatt (= absolute Menge)

Das ätherische Öl zeigt bei der zweijährigen Pflanze einen über die Vegetationsperiode konstant bleibenden Gehalt. Die prozentuale Zusammensetzung ist gegenüber der der einjährigen jedoch deutlich verändert. So zeigt sich eine beachtliche Zunahme der Kohlenwasserstoffe β -Pinen, Caryophyllen und Humulen. Der Anteil der sauerstoffhaltigen Verbindungen Thujon und Campher nimmt hingegen ab (Tab. 4). Der Gehalt an Salven steigt von 1,7% im ersten Jahr auf 4,1% im zweiten Jahr.

Tabelle 4

Vergleich der quantitativen Zusammensetzung des ätherischen Öls

	Einjährig Juli 1966 g/100 g Öl	Zweijährig Juli 1967 g/100 g Öl
Salven	1,7	4,1
α -Pinen (+ Tricyclen)	6,1	5,4
Camphen	5,8	4,5
β -Pinen	3,9	11,7
Cineol (+ Limonen)	10,6	13,5
α - + β -Thujon	37,6	24,5
Campher	16,3	2,5
Borneol (+ Bornylacetat)	4,5	4,2
Caryophyllen	4,1	15,3
Humulen	8,3	12,5

Der Gesamtgehalt an Triterpensäuren erfährt während der Vegetationsperiode pro Blatt eine Vermehrung um 130%. Das Verhältnis von Oleanolsäure zu Ursolsäure beträgt bei der zweijährigen Pflanze wiederum 28,7% zu 71,3%. Der Ursolsäureanteil erfährt somit im zweiten Jahre keine weitere Zunahme.

Belichtung und Temperatur haben auf das Entstehen des ätherischen Öles in der Pflanze einen wichtigen Einfluß. Nach *Sprecher*³⁾, *Peach*⁴⁾, *Bode*⁵⁾, *Bedaux*⁶⁾, *Rabak*⁷⁾ und *Hegenauer*⁸⁾ bewirken vermehrte Belichtung und erhöhte Temperatur eine Steigerung der ätherischen Ölbildung. Über Einflüsse auf den Stoffwechsel von Oleanol- und Ursolsäure liegen bislang keine Angaben vor.

Wir setzten Pflanzen während der Monate Juni und Juli in Klimakammern folgenden Bedingungen aus: a) einer Temperatur von 25° und einer täglichen Belichtung von 18 Std. („Langtagspflanzen“); b) einer Temperatur von 15° und einer täglichen Belichtung von 12 Std. („Kurztagspflanzen“). Die Ergebnisse gelten für die Blätter der Sproßspitzen. Als Bezugskonstante dient das Trockengewicht der Blätter.

³⁾ E. *Sprecher*, Pharmazie 13, 151 (1958).

⁴⁾ K. *Peach*, Z. Bot. 40, 53 (1952).

⁵⁾ H. R. *Bode*, Heil- und Gewürzpflanzen 19, 33 (1940).

⁶⁾ F. C. *Bedaux*, Pharmac. Weekbl. 87, 652 (1952).

⁷⁾ F. *Rabak*, Ind. Eng. Chem. 13, 536 (1921).

⁸⁾ R. *Hegenauer*, Pharmac. Weekbl. 89, 505 (1954).

Tabelle 5

Quantitative Zusammensetzung des ätherischen Öls in den Blättern der Sproßspitzen von „Langtagspflanzen“

Datum	Salven		α -Pinen/ Tricyclen		Camphen		β -Pinen		Cineol/ Limonen		α - + β - Thujon		Campher		Borncol/ Bornylacet.		Caryo- phyllen		Humulen	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1. 6. 1967	-	-	4,1	0,14	4,4	0,15	3,5	0,12	12,2	0,41	41,0	1,38	18,6	0,63	2,1	0,07	3,3	0,11	7,2	0,24
15. 6. 1967	-	-	3,9	0,14	4,4	0,16	3,4	0,12	11,7	0,41	45,0	1,57	19,8	0,69	1,8	0,06	2,1	0,07	6,6	0,23
29. 6. 1967	-	-	4,8	0,19	4,9	0,20	3,0	0,12	11,5	0,46	39,0	1,57	21,7	0,87	2,2	0,09	3,9	0,16	6,4	0,26
13. 7. 1967	-	-	5,2	0,25	6,0	0,29	3,0	0,15	9,5	0,46	32,6	1,60	27,3	1,30	4,9	0,24	3,1	0,15	5,8	0,28
27. 7. 1967	-	-	6,7	0,36	7,0	0,37	3,9	0,21	11,9	0,64	32,0	1,70	26,6	1,40	3,5	0,19	2,2	0,12	5,7	0,30

a = g des entsprechenden Terpens in 100 g Öl (= Prozentanteil am Gesamtöl)

b = g des entsprechenden Terpens, berechnet auf 100 g getrocknete Blattdroge (= absolute Menge)

Tabelle 6

Quantitative Zusammensetzung des ätherischen Öls im Blatt der Sproßspitze von „Kurztagspflanzen“

Datum	Salven		α -Pinen/ Tricyclen		Camphen		β -Pinen		Cineol/ Limonen		α - + β - Thujon		Campher		Borncol/ Bornylacet.		Caryo- phyllen		Humulen	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
1. 6. 1967	-	-	4,5	0,15	5,2	0,17	4,4	0,15	11,6	0,38	40,0	1,32	18,6	0,60	2,8	0,09	3,1	0,11	9,0	0,30
15. 6. 1967	-	-	2,5	0,08	3,2	0,10	3,3	0,11	11,9	0,38	46,5	1,48	17,4	0,55	1,8	0,06	2,7	0,09	7,9	0,25
29. 6. 1967	-	-	3,2	0,09	3,7	0,11	3,9	0,11	10,9	0,32	51,8	1,52	12,1	0,36	2,1	0,06	2,5	0,07	8,0	0,24
13. 7. 1967	-	-	3,7	0,10	4,3	0,11	4,6	0,12	12,0	0,32	52,6	1,40	10,5	0,28	1,3	0,04	2,1	0,06	6,3	0,17
27. 7. 1967	-	-	3,1	0,06	3,6	0,07	4,9	0,10	10,6	0,22	53,0	1,10	10,4	0,21	1,8	0,04	2,3	0,05	7,0	0,14

a = g des entsprechenden Terpens in 100 g Öl (= Prozentanteil am Gesamtöl)

b = g des entsprechenden Terpens, berechnet auf 100 g getrocknete Blattdroge (= absolute Menge)

Im Blatt der Langtagspflanze nimmt der Ölgehalt während der beiden Monate laufend zu. Die Erhöhung um 59,4% ist verursacht durch die Gesamtheit der Einzelbestandteile. Verschiebungen innerhalb der Mengen der Einzelkomponenten sind nicht zu beobachten (Tab. 5).

Der Gesamttriterpensäuregehalt unterliegt nur geringen Schwankungen. Das Verhältnis von Oleanolsäure zu Ursolsäure bleibt bei der Langtagspflanze im Vergleich zur Freilandpflanze nahezu unverändert.

Bei 15° und 12stdg. Belichtung kommt es zu einer deutlichen morphologischen Veränderung der Pflanze, die am Ende der Versuchsreihe nur $\sim 1/10$ so groß wie die Langtagspflanze ist. Noch auffallender ist die Veränderung am einzelnen Blatt. Nach der mikroskopischen Analyse weist die Cuticula der Kurztagspflanze im Vergleich zur Langtagspflanze eine wesentliche Verdickung auf. Außerdem ist eine Abnahme der Öldrüsenzahzahl pro Flächeneinheit feststellbar*). Der Ölgehalt hat am Ende des Versuchszeitraumes um 38,5% abgenommen. Das Absinken resultiert aus einer gemeinsamen Abnahme der absoluten Mengen seiner Einzelkomponenten. Bemerkenswert ist die Zunahme des Thujonanteils am Gesamtöl von 40% auf 53% (Tab. 6). Die Triterpensäuren weisen in der Kurztagspflanze eine Zunahme um 21,6% auf. In diesem Gemisch beträgt der Anteil an Oleanolsäure 26,5%, der an Ursolsäure 73,5%.

Diskussion der Ergebnisse

Weder im Keimling noch in der einjährigen Pflanze treten während der Vegetationsperiode qualitative oder quantitative Veränderungen des ätherischen Öles zugunsten der Triterpensäuren auf. Beide erreichen im gleichen Erntemonat ihre Höchstwerte.

Keines der Mono- und Sesquiterpene scheint damit eine biogenetische Vorstufe der Triterpensäuren zu sein. Vielmehr muß ausreichend Isopentenylpyrophosphat zur Verfügung stehen, um die Terpenoide des ätherischen Öls und die Triterpensäuren gleichzeitig, entsprechend dem Synthesevermögen der Pflanze, in maximalen Mengen aufzubauen. Gleiches gilt für die zweijährige Pflanze.

Die Ergebnisse bei den Kurztagspflanzen lassen eine entgegengesetzte Produktion der beiden Stoffgruppen erkennen: der ätherische Ölgehalt sinkt ab, während im gleichen Zeitraum der Gesamttriterpensäuregehalt ansteigt. Bei den „Langtagspflanzen“ hingegen nimmt der Ölgehalt bei nahezu konstant bleibendem Triterpensäuregehalt zu.

Die Schaffung optimaler Bedingungen, nämlich 25° und Langtag und 15° und Kurztag, begünstigt im ersten Fall das Entstehen des ätherischen Öls und im zweiten Fall das der Triterpensäuren. Demnach führen von der gemeinsamen biogenetischen

*) Für die Durchführung der mikroskopischen Analyse möchten wir Herrn Prof. Dr. E. Reinhard, Lehrstuhl für Pharmakognosie der Universität Tübingen, sehr herzlich danken.

Vorstufe, dem aktiven Isopren — so wie es auch *Lynen*⁹⁾ annimmt — zwei voneinander getrennte Wege zu den Endprodukten. Dahingestellt muß bleiben, ob durch die bevorzugte Bildung der einen Stoffgruppe für die andere nicht mehr ausreichend 3-Methylbuten-(3)-yl-diphosphat zur Verfügung steht oder ob die Umweltfaktoren die Biosynthese bestimmter Mono- und Sesquiterpene hemmen.

Die Blattinsertionen innerhalb einer Pflanze zeigen Unterschiede bei den Terpenoiden. Der C-9-Kohlenwasserstoff Salven z. B. tritt erstmalig im Öl älterer Blätter auf, in denen sämtliche Komponenten bereits abnehmen und in denen nach *Battaille* und *Loomis*¹⁰⁾ eine Primärspezernierung nicht mehr stattfindet. Diese Beobachtung weist Salven als Sekundärprodukt aus, was auch im Einklang steht mit seiner Zunahme in der zweijährigen Pflanze. Diese Feststellung widerspricht nicht der Annahme von *Brieskorn* und *Dalferth*¹¹⁾, die im Salven ein Abbauprodukt des Thujons sehen. Nach ihren Ergebnissen kommt Salven nur in Salbeiölen vor, die gleichzeitig Thujon enthalten.

Von besonderem Interesse sind die am Keimling gewonnenen Ergebnisse. Das anfänglich nahezu alleinige Auftreten von Kohlenwasserstoffen und der dann mit fortschreitendem Keimlingswachstum ansteigende Anteil sauerstoffhaltiger Verbindungen lassen erkennen, daß zeitlich gesehen die Biosynthese der Mono- und Sesquiterpenkohlenwasserstoffe vor der Synthese der sauerstoffhaltigen Komponenten erfolgt. Dann jedoch läuft bevorzugt die Entstehung der Hauptkomponenten Thujon, Campher, Borneol und Lineol ab, woraus sich eine laufende Änderung in der prozentualen Zusammensetzung des ätherischen Öles ergibt.

Aus dem gleichzeitigen Vorkommen von Oleanolsäure und Ursolsäure im Salbeiblatt vermuten *Brieskorn*, *Eberhardt* und *Briner*¹²⁾ eine biogenetische Beziehung zwischen den Säuren. Sie nehmen an, daß Oleanolsäure die primär entstehende Hydroxytriterpensäure darstellt, welche sich durch Wanderung einer der geminalen Methylgruppen von C-20 nach C-19 zur Ursolsäure umlagert. Diese Umlagerung trifft für das Keimlingsstadium weitgehend zu, nachdem dort der Gehalt an Oleanolsäure von 42,8% auf 28% abnimmt, der der Ursolsäure um einen annähernd gleichen Betrag von 57,2% auf 72% zunimmt. Im weiteren Verlauf des Wachstums der Salbeipflanze wird aber stets mehr Ursolsäure als Oleanolsäure produziert. Die die Umwandlung bewirkenden Enzyme haben demnach bereits im jüngsten Blatt ihre maximale Aktivität erlangt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Bereitstellung von Sachmitteln, Herrn Prof. Dr. *W. Simonis*, Botanisches Institut der Universität Würzburg, und Herrn Prof. Dr. *O. H. Volk*, Institut für Pharmakognosie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung von Anbaumöglichkeiten sowie für wertvolle Ratschläge.

⁹⁾ *F. Lynen*, Chem. Weekbl. 43, (56), 581 (1960).

¹⁰⁾ *J. Battaille* und *W. D. Loomis*, Biochim. Biophys. Acta 51, 545 (1961).

¹¹⁾ *C. H. Brieskorn* und *S. Dalferth*, Liebigs Ann. Chem. 676, 171 (1964).

¹²⁾ *C. H. Brieskorn*, *K. H. Eberhardt* und *M. Briner*, Arch. Pharmaz. 236, 501 (1953).

Beschreibung der Versuche

1. Bestimmung des ätherischen Öls im Keimling und Blatt

Als Gerät diente die Karlsruher Apparatur. Die erste Ernte des Keimlings erfolgte bei einer Hypokotyllänge von 10—13 mm und dann in Abständen von 10 Tagen bis zum Auftreten der Primärblätter. Für eine Bestimmung fanden 1000 Keimlinge Verwendung.

30 g frisch geerntete Blätter, nach Insertionen getrennt, werden zunächst gezählt und anschließend unzerkleinert der Destillation unterworfen. Um methodische Fehler bei den Reihenuntersuchungen zu eliminieren, standardisierten wir die Arbeitsbedingungen für die Ölgewinnung wie folgt:

Destillationskolben:	500 ml mit 200 g gereinigtem Perlkies
Wassermenge:	40 ml
Heizquelle:	Heizpilz mit 3-Stufenschaltung
Destillationszeit:	30 Min. auf Stufe II und 30 Min. auf Stufe III
Ablesen der Ölmenge:	20 Min. nach Beendigung der Destillation

Von jeder Probe werden drei Destillationen durchgeführt. Das für die GC benötigte Öl wird der Apparatur, in *n*-Pentan gelöst, entnommen.

Die Dichte des ätherischen Öls von Blatt und Keimling ermittelten wir aus den zugehörigen GC. Zur Auswertung zogen wir die 100%-Methode¹³⁾ heran. Nach ihr errechneten wir den Volumenanteil der Einzelkomponenten am Gesamtöl. Die Vol. der Einzelkomponenten werden mit ihren Dichten multipliziert.

Die Trockensubstanzbestimmung der Blätter der jeweiligen Insertion erfolgt bei 100° in üblicher Weise.

2. Isolierung des Triterpengemisches

5,0 g der wasserdampfdestillierten Droge werden fein gepulvert und im Soxhlet mit Äther erschöpfend extrahiert. Die nach dem Abdampfen des Äthers verbleibende dunkelgrüne Substanz wird in einem Meßkolben auf 250 ml Chloroform gelöst. Das Abtrennen der nicht triterpenoiden Substanzen erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie auf Kieselgel H (nach Stahl). Als Fließmittel dient Tetrachlorkohlenstoff/Aceton/Methanol 75 : 21 : 4. Oleanolsäure und Ursolsäure lassen sich chromatographisch nicht trennen. An beiden Rändern der Platte wird zu ihrer Erkennung eine ätherische Lösung der reinen Säuren aufgetragen. Zur Detektion dient SbCl₅ (1%) in Chloroform. Die Triterpensäuren färben sich blauviolett an und fluoreszieren im UV-Licht. Die dadurch angezeigte Triterpenzone wird aus der Platte gekratzt. Das Triterpensäuregemisch wird anschließend in der Soxhletapparatur mit Chloroform vom Kieselgel heruntergelöst und gravimetrisch bestimmt.

3. Bestimmen von Oleanolsäure neben Ursolsäure²⁾

α) Herstellung der Stamm- und Probelösungen:

50 mg schmelzpunktreine Oleanolsäure (Schmp. 309° Vak.) bzw. Ursolsäure (Schmp. 286° Vak.) werden jeweils in 100 ml Chloroform gelöst (Stammlösung).

Aus den Stammlösungen werden mit Chloroform 10 Verdünnungen bereitet, so daß in 10 ml Lösung 0,5 bis 4,5 mg Oleanolsäure und 4,5 bis 0,5 mg Ursolsäure enthalten sind. Von den reinen Säuren und den Mischungen werden nach Zugabe des Reagenzes die zugehörigen Rot- (528 nm) und Grünwerte (610 nm) gemessen und eine Eichkurve aufgestellt.

¹³⁾ R. Kaiser, „Chromatographie in der Gasphase“, Teil IV, Bibliographisches Institut, Mannheim 1965.

Das Reagens besteht aus 2 T. konz. Schwefelsäure und 10 T. Essigsäureanhydrid. Bei der Herstellung läßt man unter Eiswasserkühlung und Umschwenken die Schwefelsäure in das Essigsäureanhydrid einfließen.

β) Ausführen der Farbreaktion:

1 ml der 0,05proz. Triterpensäurelösung wird mit 3 ml Chloroform verdünnt und in Eiswasser gekühlt. Aus einer Feinbürette tropft unter Rühren 2 ml des Reagenzes innerhalb von 30 Sek. zu. Nach weiteren 30 Sek. wird bei 40° gemessen. Der Quotient aus Rotwert und Grünwert ergibt das prozentuale Verhältnis von Oleanolsäure und Ursolsäure an. Bei der Durchführung der Reihenversuche wird der Quotient aus 5 Messungen ermittelt.

4. Analytische Gaschromatographie

Fraktometer F 6/4 HF der Firma Perkin-Elmer in Verbindung mit einem Siemens Kompensograph L 288 × 288 (2,5 mV Vollausschlag). Detektor: Flammenionisationsdetektor. Folgende Original-Säulen (Perkin-Elmer) wurden verwendet:

R-Säule	R-Golaysäule
2 m Länge, 3 mm Durchmesser	50 m Länge, 0,25 mm Durchmesser
15% Polypropylenglykol R (Ucon LB-550 x) auf Celite 545 60—100 mesh	Polypropylenglykol R (Ucon LB-550 x)
Säulentemperatur: 70—180°/5° Steigerung/min	Monoterpenkohlenwasserstoffe: 100° übrige Terpene: 150°
Einspritztemp.: 225°	170°/200°
Trärgas: Stickstoff	Stickstoff
Strömungsgeschwindigkeit: 25 ml/min	100 ml/min
Strömungsteilung: —	1: 100
Empfindlichkeit: 1: 128	1: 8/1: 16/1: 32
Papiergeschwindigkeit: 1 cm/min	1 cm/min
Probenmenge: 1,0 µl in n-Pentan gelöst	0,5 µl in n-Pentan gelöst

Die quantitative Auswertung der Gaschromatogramme erfolgt durch Ausschneiden und Wägen der Peakflächen. Die 100%-Methode¹³⁾ ist nur dann anwendbar, wenn der Detektor für gleiche Konzentrationen der verschiedenen Substanzen gleiche Ausschlagsignale erzeugt. Dies trifft für die Mehrzahl der Komponenten des untersuchten Salbeiöls zu, die sich in Konstitution und Molekulargewicht nicht wesentlich unterscheiden.

Um einen genaueren Vergleich zwischen den einzelnen Bestandteilen des ätherischen Öls anstellen zu können, korrigierten wir die erhaltenen Bandengewichte nach der Formel:

$$f = \frac{\text{Mol.-Gew.}}{\text{Anzahl C-Atome} \times 12}$$

Der stoffspezifische Korrekturfaktor *f* ist die Zahl, mit der das Bandengewicht einer gaschromatographisch getrennten Komponente korrigiert werden muß, damit das Endergebnis in Gewichtskonzentrationswerten (Gew. %) erhalten wird^{13) 14)}.

¹⁴⁾ H. Farnow, „Gaschromatographie“ d. Fa. Dragoco, Holzminden.