

A study of the KINNEAR-PERREN reaction, using straight chain alkyl halides, revealed that the organophosphorus compounds formed consisted of all the possible position isomers.

Phenylphosphine and elemental selenium give in one step $(C_6H_5PSe)_x$.

MONSANTO RESEARCH SA, 8045 Zürich,
Binzstrasse 39

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] XIX. Mitteilung, L. MAIER, *Angew. Chem.*, **77**, 549 (1965); *Intern. Edit.* **4**, 527 (1965).
- [2] L. MAIER, *Helv.* **46**, 1812 (1962). Eine Übersicht gibt L. MAIER in «Preparation and Properties of Primary and Secondary Phosphine Sulfides, their Thioacids and Thioanhydrides, and Tertiary Phosphine Sulfides» in *Topics in Phosphorus Chemistry*, ed. M. GRAYSON & E. J. GRIFFITH, Interscience Publishers, Inc., New York 1965, Vol. 2, Seite 47.
- [3] W. KUCHEN & H. BUCHWALD, *Chem. Ber.* **91**, 2296 (1958).
- [4] J. J. DALY & L. MAIER, *Nature* **203**, 1167 (1964).
- [5] L. MAIER, «Preparation and Properties of Primary, Secondary, and Tertiary Phosphines» in *Progress in Inorganic Chemistry*, ed. F. A. COTTON, Interscience Publishers, Inc., New York 1963, Vol. V, Seite 27.
- [6] J. P. CLAY, *J. org. Chemistry* **16**, 892 (1951).
- [7] A. M. KINNEAR & E. A. PERREN, *J. chem. Soc.* **1952**, 3437.
- [8] L. D. FREEDMANN & G. O. DOAK, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 3414 (1952); L. HORNER, H. HOFFMANN & P. BECK, *Chem. Ber.* **91**, 1583 (1958); F. PASS & H. SCHINDLBAUER, *Monatsh. Chemie* **96**, 148 (1959).
- [9] G. A. OLAH, *Friedel-Crafts and related reactions*, Interscience Publ., Inc., New York 1963, Vol. I, Seite 68.
- [10] K. ISSLEIB & W. SEIDEL, *Z. anorg. allg. Chem.* **303**, 155 (1960); *Z. Naturf.* **15b**, 267 (1960).
- [11] H. L. KRAUSS & H. JUNG, *Z. Naturforsch.* **15b**, 545 (1960).

129. Beiträge zur Chemie der pflanzlichen Plastiden

4. Mitteilung [1]

Über die Fettsäuren in grünen und gelben Blättern von *Acer platanoides* (L.)

von W. Eichenberger und E. C. Grob

(13. V. 65)

Während der Herbstfärbung steigt der Gehalt an fettlöslichen Stoffen in den Laubblättern beträchtlich an. Kürzlich konnten wir aus gelben Blättern des Spitzahorns (*Acer platanoides* (L.)) als charakteristischen Bestandteil einen gelben Farbstoff isolieren, dem wir die Konstitution des Lutein-3-linolenates zuschrieben [1]. Während die Herkunft des Luteinanteiles hinreichend geklärt werden konnte, war der Ursprung der Linolensäure noch ungewiss. Da die grünen Blätter im allgemeinen einen sehr hohen Linolensäuregehalt aufweisen, durfte einerseits vermutet werden, die Linolensäure entstamme den grünen Blättern. Da aber andererseits während der Vergilbung eine starke Zunahme der Gesamtlipide beobachtet werden kann, ist eine Neubildung der Linolensäure in Herbstblättern nicht von der Hand zu weisen.

Da Angaben über Gesamtfettsäurezusammensetzung und -gehalt von Herbstblättern nicht vorzuliegen scheinen, haben wir im September und Oktober 1963 in den Blättern des bereits früher beschriebenen Versuchsbaumes periodisch Gesamtfettsäure-Bestimmungen durchgeführt. Der gewählte Zeitpunkt lag insofern günstig, als er erlaubte, gleichzeitig grüne und vergilbte Blätter zu untersuchen.

1. *Grüne Blätter*: Frische Blätter wurden getrocknet, fein zerkleinert und mit HCl-haltigem Methanol behandelt, um die Fettsäuren direkt in die Methylester überzuführen. Durch Chromatographieren, nachfolgendes Verseifen und erneutes Verestern ist das Fettsäuregemisch von Begleitstoffen befreit worden.

Der gravimetrisch bestimmte Fettsäuregehalt als Methylester der Blätter von Spitzahorn ist in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. *Gesamtfettsäure-Gehalt (als Methylester bestimmt) der Blätter von Acer platanoides in verschiedenen Vergilbungsstadien*

Stadium	mg aus 5 g trockenem Blattmaterial vom			
	26. 9.	1. 10.	5. 10.	14. 10.
grün	250	228	250	252
schwach gelb	—	—	—	196
stark gelb	—	—	—	194

Mit zunehmender Vergilbung stellen wir einen starken Abfall des Fettsäuregehaltes fest.

Das Fettsäuremethylestergemisch wurde gas-chromatographisch aufgetrennt, wobei die einzelnen Komponenten mittels der Retentionszeiten identifiziert wurden. Zur Bestimmung der Kettenlänge der ungesättigten Fettsäuren wurden die entsprechenden Methylester hydriert. Die daraus entstandenen gesättigten Fettsäuren wurden wiederum aufgrund ihrer Retentionszeiten identifiziert. Zur Bestimmung der Doppelbindungszahl dienten die entsprechenden Acetomercurimethoxy-Verbindungen, die auf der Dünnschichtplatte chromatographiert wurden. Aus der Laufgeschwindigkeit dieser Verbindungen kann auf die Anzahl Doppelbindungen geschlossen werden. Die rasche Bildung der Quecksilberacetat-Addukte deutet überdies auf das überwiegende Vorhandensein von *cis*-Bindungen. Die Verteilung der verschiedenen Fettsäuren nach C-Zahl und Anzahl Doppelbindungen in den grünen Blättern ist aus Tab. 2 ersichtlich.

Die in Tab. 2 aufgeführten Werte wurden durch Flächenmessung der Gas-Chromatogramme der Ester gewonnen. Den Hauptanteil (70%) bildet die Linolensäure,

Tabelle 2. *Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren grüner Ahornblätter verschiedenen Alters*

Datum der Blattentnahme	Anteil in % der Gesamtfettsäuren nach C-Zahl und Anzahl der Doppelbindungen							
	12; 0	14; 0	16; 0	16; 1	18; 0	18; 1	18; 2	18; 3
26. 9.	1	1	21	3	1	3	6	64
1. 10.	1	1	22	2	1	1	8	65
5. 10.	1	3	19	2	1	1	7	65
8. 10.	1	2	17	1	1	2	5	73
14. 10.	1	3	19	2	1	1	5	67
22. 10.	1	2	20	1	1	1	5	68

gefolgt von Palmitinsäure mit 20%, Linolsäure mit ca. 6%. In nur sehr geringen Mengen liegen Stearin-, Öl-, C₁₆-Monoen-, Myristin- und Laurinsäure vor. Über die ganze Zeitspanne der Entnahme von Blättern ist die Fettsäurezusammensetzung konstant geblieben.

Zur Feststellung der Fettsäureverteilung innerhalb der Blattzellen haben wir Bestimmungen in isolierten Chloroplasten vorgenommen. Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte nach dem Gradientenverfahren in nichtwässrigem Milieu. Bei diesem Verfahren werden jedoch die Lipide z. T. aus den Zellbestandteilen herausgelöst. Deshalb haben wir auch die in die Lösungsmittel übergegangenen Fettsäuren bestimmt.

Tabelle 3. Die relative Fettsäurezusammensetzung in intakten Blättern und in Chloroplasten und die Zusammensetzung der bei der Plastenisolierung ausgewaschenen Fettsäuren

Substrat	Prozentualer Anteil des jeweiligen Gesamtgehaltes C-Zahl; Anzahl der Doppelbindungen							
	12; 0	14; 0	16; 0	16; 1	18; 0	18; 1	18; 2	18; 3
Ganze Blätter	1	2	17	1	1	5	5	73
Chloroplasten	1	1	14	2	1	1	3	80
Ausgewaschener Anteil	2	8	14	1	1	1	7	67

Wie aus den Resultaten (s. Tab. 3) ersichtlich ist, herrscht auch in den Chloroplasten die Linolensäure vor. Zu entsprechenden Ergebnissen gelangten auch DEBUCH [2] und RADUNZ [3] bei *Antirrhinum majus*, sowie CROMBIE [4] bei *Acer negundo*. In auffallender Weise werden durch das bei der Plastenaufarbeitung verwendete Lösungsmittel die niedrigen, ungesättigten Fettsäuren bevorzugt herausgelöst. Es scheint somit, dass diese Fettsäuren in den Chloroplasten weniger fest verankert sind als die übrigen.

2. *Vergilbte Blätter*: Untersucht wurden Blätter verschiedenen Vergilbungsgrades. Alle zur Fettsäurebestimmung verwendeten Blätter wurden gleichzeitig gepflückt; je nach ihrem Aussehen wurden sie in die Gruppen: grün, schwach vergilbt, vorwiegend vergilbt und vollständig vergilbt aussortiert. Die Ergebnisse der Tab. 4 zeigen, dass die Linolensäure auch in vollständig vergilbten Blättern Hauptkomponente bleibt, dass aber ihr relativer Anteil mit zunehmender Vergilbung abnimmt. Bemerkenswert ist ausserdem der beachtliche, relative Anstieg der gesättigten C₁₂-C₁₆-Fettsäuren.

Nach den absoluten Fettsäurewerten, die in Blättern verschiedener Vergilbungsstadien gefunden wurden (s. Tab. 5), nehmen die gesättigten C₁₂- und C₁₄-Fettsäuren

Tabelle 4. Die relative Fettsäurezusammensetzung grüner und vergilbter Blätter von *Acer platanoides*

Stadium	Prozentualer Anteil des jeweiligen Gesamtgehaltes C-Zahl; Anzahl der Doppelbindungen							
	12; 0	14; 0	16; 0	16; 1	18; 0	18; 1	18; 2	18; 3
grün	1	2	12	1	1	1	5	80
schwach vergilbt	1	2	17	1	1	1	7	72
vorwiegend vergilbt	1	3	18	1	1	1	8	67
vollständig vergilbt	2	7	19	—	1	1	4	64

im letzten Vergilbungsstadium etwas zu, während die Palmitin(16; 0)- und die Linolensäure(18; 2) im gleichen Zeitraum merkbar abnehmen. Der Linolensäuregehalt sinkt während des ganzen Vergilbungsprozesses gleichmässig ab. Die vollständig vergilbten Blätter enthalten nurmehr noch rund 38% der ursprünglichen Menge.

Tabelle 5. *Der absolute Fettsäuregehalt grüner und vergilbter Blätter von Acer platanoides*

Stadium	mg Fettsäure je 5 g trockener Blätter			
	C-Zahl; Anzahl Doppelbindungen			
	12; 0 und 14; 0	16; 0	18; 2	18; 3
grün	4,0	18	7,5	120
schwach vergilbt	3,5	19	8,0	80
vorwiegend vergilbt	4,0	19	8,0	70
vollständig vergilbt	6,0	13	3,0	45

Diskussion. – Die Herbstfärbung ist mit einem beträchtlichen Rückgang der Fettsäuren verbunden. Damit ist klar gezeigt, dass der starke Anstieg des «Lipidgehaltes» in vergilbenden Blättern nicht durch freie Fettsäuren oder deren Ester, sondern durch andere fettlösliche Stoffe bedingt ist, mit deren Untersuchung wir zur Zeit beschäftigt sind. Die grösste Abnahme weist die Linolensäure auf; eine Neubildung in den Herbstblättern ist daher sehr unwahrscheinlich. Es scheint somit die im Lutein-3-ester vorgefundene Linolensäure den Chloroplasten zu entstammen. Der Gehalt an gesättigten Fettsäuren (C_{12} und C_{14}) nimmt jedoch merklich zu. Diese Zunahme kann nur auf eine Neubildung zurückgeführt werden. Ob diese Säuren durch Kettenverkürzung aus höheren Fettsäuren gebildet werden, ist zur Zeit noch ungewiss. Über eine ähnliche Beobachtung bei Bohnenblättern berichtet NEWMAN [5]. Mit steigendem Alter der Blätter konnte er eine Zunahme der kürzerkettigen Fettsäuren unter gleichzeitiger Abnahme der längerkettigen Säuren feststellen.

Experimentelles. – a) *Trocknung und Zerkleinerung des Blattmaterials*: Frisch gepflückte und entstieltete Blätter werden im belüfteten Trockenschrank während 4 Std. bei 50° getrocknet, in einer KRUPS-Kaffeemühle fein zerkleinert und dann im Vakuum über $CaCl_2$ aufbewahrt.

b) *Umesterung*: Das Trockenmaterial wurde mit der 20fachen Menge Methanol «MERCK» 5% HCl 2 Std. am Rückflusskühler unter Stickstoff gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das HCl mit wenig festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die festen Anteile wurden abzentrifugiert und mit Äther ausgewaschen. Die Ätherphase wurde nach mehrmaligem Auswaschen mit Wasser eingedampft und der Rückstand über $CaCl_2$ im Vakuum getrocknet.

c) *Verseifung der Fettsäure-methylester*: Die Trockenrückstände von 100–300 mg wurden mit 10-proz. alkoholischem KOH 1 Std. am Rückflusskühler unter Stickstoff gekocht; nach dem Erkalten wurde mit Wasser auf ca. 100 ml verdünnt. Zur Entfernung des Unverseifbaren wurde zunächst mit 50 ml Petroläther, dann mit Petroläther-Äther 1:1 und schliesslich mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde sodann mit 5N H_2SO_4 angesäuert und wiederum mit Petroläther und Äther ausgeschüttelt. Nach gründlichem Auswaschen der organischen Phase mit Wasser wurde sie mit Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Vakuum vollständig getrocknet.

d) *Veresterung der Fettsäuren*: Der Trockenrückstand von 50–200 mg wurde mit 10 ml Methanol-HCl 5-proz. $\frac{3}{4}$ Std. unter Rückfluss erhitzt, dann wurde das HCl mit Natriumcarbonat neutralisiert und das Fettsäure-methylester-Gemisch mit Petroläther ausgeschüttelt.

e) *Hydrierung*: 10–20 mg Fettsäure-methylester wurden in 2 ml Äthanol gelöst und mit ca. 1 mg Pt-Katalysator versetzt. In das Gemisch wurde während $\frac{1}{2}$ Std. Wasserstoff aus der Bombe eingeleitet.

f) *Acetoxymercurimethoxy-Verbindungen*: Herstellung und Dünnschichtchromatographie nach STAHL [6].

g) *Dünnschichtchromatographie der Fettsäure-methylester*: Sorptionsmittel: Kieselgel-G «MERCK». Laufmittel: Benzol «MERCK». Sichtbarmachen der Zonen: Besprühen mit 50-proz. H_2SO_4 und Erwärmen über der Flamme.

h) *Säulenchromatographie*: Die Ester wurden in Petroläther gelöst und an Aluminiumoxid «MERCK» (Aktivitätsstufe I) mit Petroläther, dem stufenweise 1–5% Äther zugesetzt wurde, chromatographiert.

i) *Gaschromatographie*: Die in Benzol gelösten gereinigten Ester wurden in einem PYE-Argon-Gaschromatographen getrennt. Säule: Celit 100/120 mesh (PYE) mit 5% Polyäthylenglycoadipat (PYE). $T = 180^\circ$. Gasstrom: 10 ml Argon in 22,0 s. Detektorspannung: 1500 V. Papiervortrieb: 15 inch/h. Testgemisch: PERKIN-ELMER enthaltend Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure-ester; zugesetzt wurden noch Laurin- und Myristinsäureester.

k) *Isolierung der Chloroplasten*: 10 g gefriergetrocknete Blätter wurden vorerst in einer KRUPS-Kaffeemühle fein zerkleinert und dann im Mörser mit Seesand in Gegenwart von Petroläther zerrieben. Nach Absetzen der groben Anteile wurde die dunkelgrüne Suspension (150 ml) zentrifugiert. Das Sediment wurde in wenig Petroläther suspendiert und die Suspension auf einen durch sorgfältiges Übersichten von Petroläther-Tetrachlorkohlenstoff-Gemischen verschiedener Dichte (1,34; 1,31; 1,26) hergestellten Gradienten gegeben. Beim Zentrifugieren während 10 Min. bei 1000 g reicherten sich die Chloroplasten in den beiden unteren Dichtebereichen an. Nach Verdünnen der sorgfältig abpipettierten Suspension mit Petroläther wurden die Chloroplasten abzentrifugiert. Nach Wiederholung der Fraktionierung mit einer Dichtefolge von 1,40; 1,34; 1,31 wurde das dunkelgrüne Material im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 0,68 g.

Dem SCHWEIZ. NATIONALFONDS danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Gesamtfettsäuren von grünen und gelben Blättern von *Acer platanoides* (L.) untersucht. Linolensäure erwies sich sowohl in den ganzen Blättern als auch in den Chloroplasten als Hauptfettsäure, gefolgt von Palmitinsäure und Linolsäure. Bei der Herbstvergilbung beobachtet man einen besonders starken Abfall des Linolensäuregehaltes, während der Gesamtanteil der gesättigten Säuren praktisch unverändert bleibt. Auffallend ist die bei der Herbstvergilbung feststellbare relative und absolute Zunahme der kürzerkettigen (C_{12} und C_{14}) Fettsäuren. Über deren Entstehung können z. Z. keine Angaben gemacht werden. Da eine Neubildung der Linolensäure während der Herbstverfärbung unwahrscheinlich ist, müssen wir annehmen, dass die im Lutein-3-ester enthaltene Linolensäure den Chloroplasten entstammt.

Institut für Organische Chemie der Universität Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 3. Mitteilung: W. EICHENBERGER & E. C. GROB, *Helv.* 46, 2411 (1963).
- [2] H. DEBUCH, *Z. Naturforsch.* 16b, 561 (1961).
- [3] A. RADUNZ, Dissertation Universität Köln, 1964.
- [4] W. M. CROMBIE, *J. exp. Botany* 9, 254 (1958).
- [5] D. W. NEWMAN, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 9, 179 (1962).
- [6] E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, S. 182, Springer-Verlag Berlin (1962).