

**Zur Bildung isomerer Trihydroxy-octadecensäuren
bei der enzymatischen Oxydation von Linolsäure
durch Gerstenmehl**

Von

Hermann Esterbauer und Erwin Schauenstein

Institut für Biochemie, Universität Graz, Österreich

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 24. Januar 1977)

*Isomeric Trihydroxy-octadecenoic Acids Formed Upon Enzymic
Oxidation of Linoleic Acid by Barley Flour*

Incubation of linoleic acid with barley flour at pH 6.8 leads to the formation of three isomeric trihydroxy octadecenoic acids, namely: 9,12,13-trihydroxy-10-*trans*-octadecenoic acid, 9,10,13-trihydroxy-11-*trans*-octadecenoic acid and 9,10,11-trihydroxy-12-*trans*-octadecenoic acid. The acids were isolated by column chromatography using silicic acid and boric acid impregnated silicic acid and their structures were ascertained by means of IR, NMR and mass spectroscopy.

Einleitung

In Samen von zahlreichen Leguminosen¹⁻⁴ und Getreidearten⁵⁻⁸ wurde das Enzym Lipoxydase (EC. 1.13.1.13) nachgewiesen, das Linolsäure in konjugierte *cis,trans*-Linolsäurehydroperoxide überführt. Bei der Keimung werden die Hydroperoxide sofort durch Isomerasen und andere Folgeenzyme in sekundäre Oxydationsprodukte umgewandelt, so daß es zu keiner Akkumulation der toxischen Hydroperoxide kommt^{8, 9}. Graveland^{10, 11} hat gezeigt, daß Inkubation von Linolsäure mit Weizen- oder Gerstenmehl zur Bildung von Ketohydroxy-, Ketodihydroxy- und Trihydroxysäuren führt. Durch präparative DC konnte er ein Gemisch von Trihydroxysäuren isolieren und kam auf Grund von massenspektroskopischen Untersuchungen zu dem Schluß, daß das Gemisch aus 9,12,13-Trihydroxy-10-*trans*-octadecensäure (G_1) und 9,10,13-Trihydroxy-11-*trans*-octadecensäure (G_2) besteht. Eine Trennung der beiden Verbindungen wurde von Graveland aber nicht durchgeführt.

Wir beschreiben in der vorliegenden Untersuchung die präparative Trennung der Trihydroxysäuren G_1 und G_2 und die Isolierung einer weiteren Trihydroxysäure (G_3), sowie die Charakterisierung dieser drei Säuren durch IR, NMR- und Massenspektroskopie.

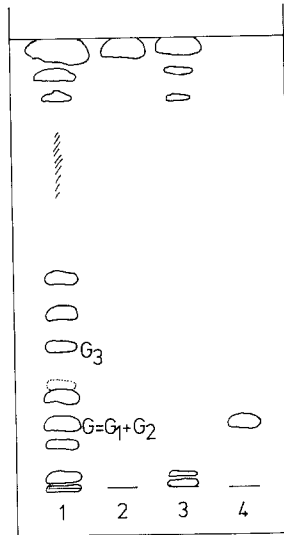


Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm. Kieselgel; Laufmittel: Et_2O — $HOAc$ 98:2; Anfärbung: Phosphormolybdänsäure. 1. Extrakt (gelöst in 50 ml Et_2O) der Inkubation von 2 ml Linolsäure + 140 g Gerstenmehl + 1000 ml 0,1M-Phosphatpuffer, pH 6,8; bandenförmig aufgetragen, 20 μ l. 2. Wie 1) ohne Gerstenmehl. 3. Wie 1) ohne Linolsäure. 4. Verbindung G , isoliert nach Graveland^{10, 11}. G ist ein Isomerengemisch und trennt sich auf Borsäure-imprägniertem Kieselgel in die Substanzen G_1 und G_2 auf

Ergebnisse und Diskussion

Isolierung

Wird Linolsäure einige Stunden mit Gerstenmehl bei pH 6,8 unter Luftzutritt inkubiert, so kommt es zu einer enzymatischen Oxydation des Ausgangsmaterials. Im *DC* des Extrakts lassen sich eine Reihe von Substanzen nachweisen, die bei Inkubation in Abwesenheit von Gerstenmehl oder Linolsäure nicht gebildet werden (Abb. 1). Durch präparative Säulenchromatographie wurden die im *DC* mit G_3 und G bezeichneten Substanzen isoliert. G ist ein Isomerengemisch und trennt sich auf Borsäure-imprägniertem Kieselgel in die Substanzen G_1 und G_2 auf. Die Erkennung des Isomerengemisches G am *DC* war insofern

erleichtert, als uns eine von *Graveland*^{10, 11} isolierte Probe von *G* zur Verfügung stand*.

Zur präparativen Isolierung der Säuren G_1 , G_2 und G_3 wurde der Extrakt eines Inkubationsansatzes zunächst durch Säulenchromatographie in G_3 - und G -reiche Fraktionen vorgetrennt, aus denen dann durch weitere Trennungen G_3 bzw. G gewonnen wurde. G_3 erwies sich im *DC* auf Kieselgel und Borsäure-imprägniertem Kieselgel als einheitlich, G dagegen gab bei der Trennung auf Kieselgel einen, bei der Trennung auf Borsäure-imprägniertem Kieselgel (Laufmittel a) aber zwei Spots mit *R_f*-Werten von 0,43 (G_1) und 0,25 (G_2). Auf Grund der densitometrischen Vermessung dieses *DC* enthält G 91% G_1 und 9% G_2 . Die präparative Isolierung von G_1 und G_2 gelang auf einer Säule, die mit Borsäure-imprägniertem Kieselgel gefüllt war. Aus dem Reaktionsprodukt von 20 ml (18 g) Linolsäure wurden auf diese Weise insgesamt 142 mg G_1 , 14 mg G_2 und 23 mg G_3 in reiner Form als feste, weiße Substanzen isoliert.

Identifizierung

Die isolierten Substanzen wurden als isomere Trihydroxyoctadecensäuren mit folgenden Strukturen identifiziert:

G_1 : 9,12,13-Trihydroxy-10-*trans*-octadecensäure,

G_2 : 9,10,13-Trihydroxy-11-*trans*-octadecensäure,

G_3 : 9,10,11-Trihydroxy-12-*trans*-octadecensäure.

Die Strukturbeweise für die drei Trihydroxysäuren basieren im wesentlichen auf den IR- und NMR-Spektren der freien Säuren und deren Methylester, den Massenspektren der Trimethylsilylderivate (*TMS*-Derivate) der Methylester und der hydrierten Methylester, sowie den Ergebnissen der Mikrohydrierung. Die IR-Spektren mit charakteristischen Banden bei 2,85—3,10 μ (OH), 3,45—3,55 μ (CH_2), 5,95 μ (COOH) bzw. 5,75 (COOCH_3 bei Ester) und 10,25 μ (*trans*- $\text{CH}=\text{CH}$) zeigten, daß es sich um Polyhydroxycarbonsäuren mit einer *trans*-Doppelbindung handelt. Die NMR-Spektren von G_1 und G_3 zeigten zwar alle auf Grund der Formeln zu erwartende Signale, ihre Aufspaltung aber ergab keine scharfen Banden, sondern meistens unaufgelöste Multipletts, so daß keine Kopplungskonstanten bestimmt wurden. Bei Entkopplungsexperimenten mit G_3 konnten nur die in Tab. 1 angegebenen Kopplungen sicher nachgewiesen werden. Über die Stereochemie der OH-Gruppen kann nichts ausgesagt werden.

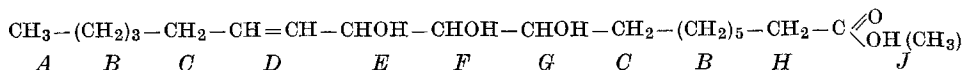
Am aufschlußreichsten waren die Massenspektren der *TMS*-Derivate. Alle Spektren zeigten die für *TMS*-Derivate typischen Fragmente^{12, 13}

* Wir danken Dr. A. *Graveland* für die Überlassung einer kleinen Probe von *G*.

bei m/e 73 (Me_3Si^+), 103 ($CH_2OSiMe_3^+$) und 147 ($Me_2SiOSiMe_3^+$). Das MolekÜlion (m/e 560) war nur bei G_3 zu sehen, alle drei Derivate aber zeigten den $M^+ - 15$ -peak deutlich, der durch Abspaltung von CH_3 aus einer TMS -Gruppe entsteht. Fragmentierung trat hauptsächlich durch Spaltung der C—C-Bindung zwischen zwei vic. TMS -Gruppen ein, wobei das Fragment mit zwei TMS -Gruppen noch weiter $MeSiOH$ absplattete und in das m/e —90-Bruchstück übergang.

Tabelle 1. 100 MHz-NMR-Daten für G_3 und G_3 -Methylester

Zuordnung	G_3 -Methylester, δ (ppm), ($CDCl_3$)	G_3 (freie Säure), δ (ppm), $DMSO-d_6$
A	0,85	0,85
B	1,2—1,6	1,2—1,7
C	2,1	2,05
H	2,25	2,20
OH	2,55	3,55
G	3,35	2,70
J	3,65	—
F	3,80	3,10
E	4,60	4,25
D	5,50	5,40
sichere Koppl.	CG, GC	FE, EF ED, DE



Als Beispiel ist in Abb. 2 das Spektrum des G_3 (methyliert und silyliert) angegeben. Abb. 3 zeigt, wiederum am Beispiel von G_3 , daß sich aus der Fragmentierung der Kette der TMS -Derivate der Methylester und der hydrierten Methylester die Position der Hydroxylgruppen und der Doppelbindung ableiten läßt.

Bildungsmechanismus

Nach Graveland¹⁴ ist für die Bildung der Trihydroxysäuren G_1 und G_2 eine an Glutenin gebundene Lipoxydase verantwortlich, welche Linolsäure zu 9- und 13-Hydroperoxy-octadecensäuren oxydiert, die sich dann zu 9-Hydroxy-12,13-epoxy-octadecensäure und 9,10-Epoxy-13-hydroxy-octadecensäure isomerisieren. Durch Hydrolyse der Hydroxyepoxy-säuren sollen schließlich G_1 und G_2 entstehen (Abb. 4). Der Befund, daß bei der Oxydation von Linolsäure durch Gerstenmehl auch die Trihydroxysäure G_3 entsteht, spricht dafür,

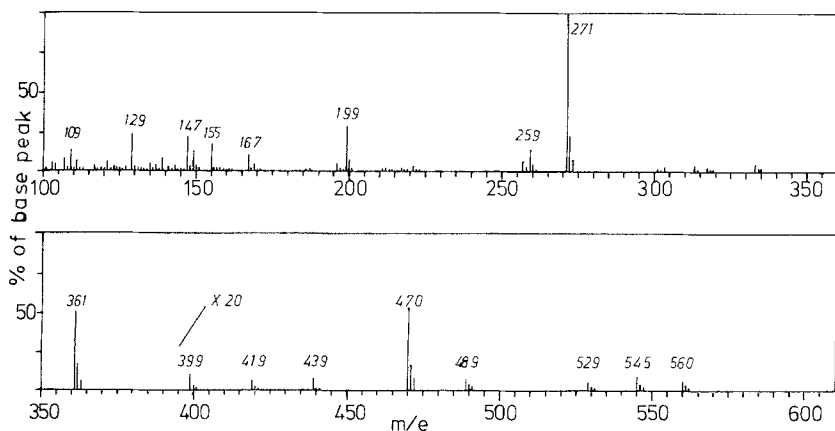
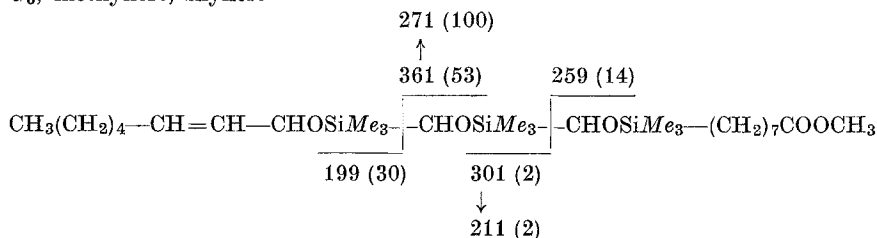
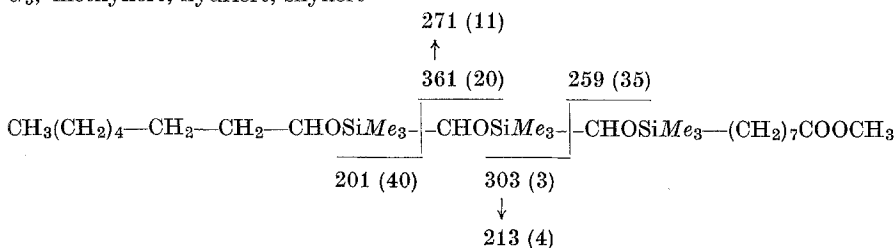


Abb. 2. 70 eV-Massenspektrum von G_3 (methyliert, silyliert)

G_3 , methyliert, silyliert



G_3 , methyliert, hydriert, silyliert



Base Peak $m/e = 73$

Abb. 3. Fragmentierung von G_3 . In Klammer die Intensität relativ zum Base Peak

daß bei der Isomerisierung des 9- bzw. 13-Hydroperoxids tatsächlich jeweils zwei Epoxyhydroxysäuren entstehen, deren Hydrolyse jeweils zwei Trihydroxysäuren ergibt. Wie Abb. 4 zeigt, bilden sich dann aus dem 9-Hydroperoxid die Säuren G_1 und G_3 und aus dem 13-Hydro-

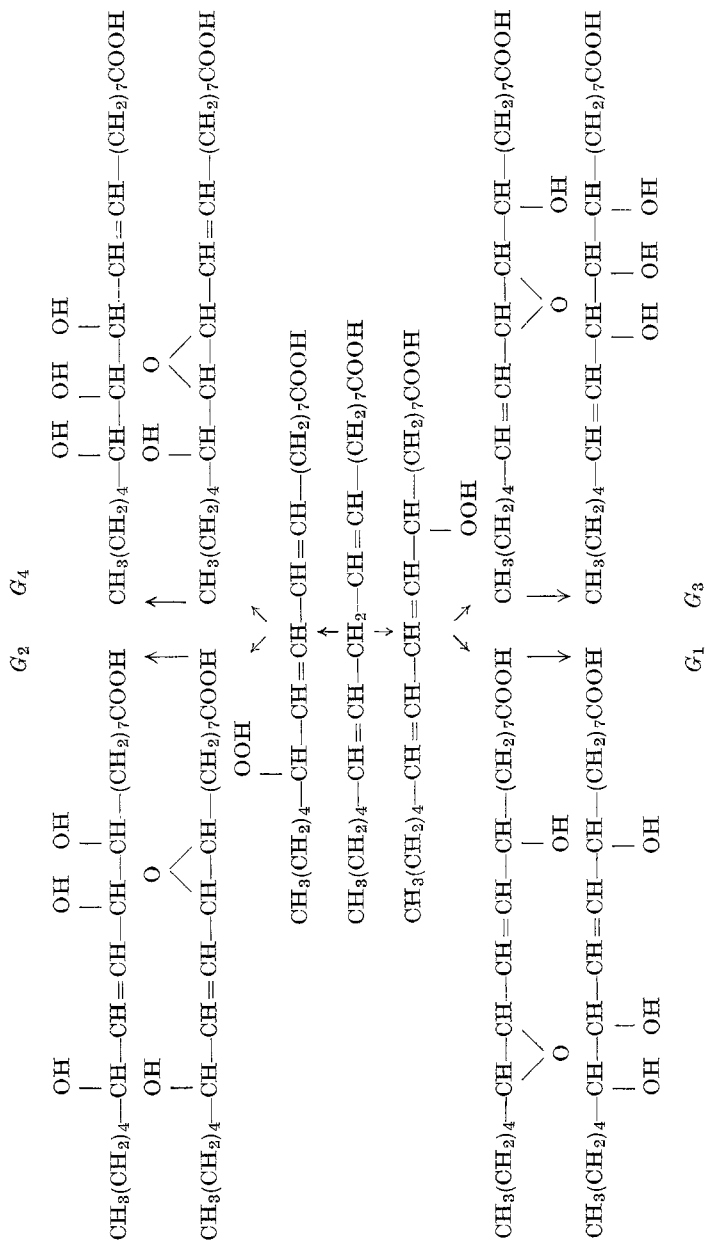


Abb. 4. Bildungsmechanismus der isomeren Trihydroxyoctadecensäuren

peroxid analog die Säuren G_2 und G_4 . Die Bildung von G_1 , G_2 und G_3 ist auf Grund von *Gravelands* und unserer Arbeit eindeutig gesichert. Die Verbindung G_4 ist bisher noch nicht nachgewiesen worden und es ist anzunehmen, daß sie nur in sehr geringen Mengen gebildet wird. Gereinigte Lipoxydase aus Gerstensamen oxydiert nämlich Linolsäure hauptsächlich zum 9-Hydroperoxid (etwa 90%), während nur geringe Mengen (etwa 10%) des 13-Hydroperoxids gebildet werden⁸. Es ist daher zu erwarten, daß bei der Inkubation von Linolsäure mit Gerstenmehl vorzugsweise jene Substanzen entstehen, die sich von 9-Hydroperoxid herleiten, wie z. B. die Säuren G_1 und G_3 . Auf Grund der bei der säulenchromatographischen Trennung erhaltenen Ausbeuten an G_1 , G_2 und G_3 ergibt sich für die gebildeten Mengen des Isomerenpaares $G_1 : G_3$ ein Verhältnis von 1 : 0,17; nimmt man für das Paar $G_2 : G_4$ dasselbe Verhältnis an, ergibt sich für die Bildung der vier Isomeren die folgende prozentuelle Verteilung: 78,4% G_1 , 7,7% G_2 , 12,3% G_3 und 1,3% G_4 .

Experimenteller Teil

Gerstenmehl: Gerste wurde mit einer Brabender-Laboratoriumsmühle gemahlen und das Mehl durch ein feines Sieb gesiebt.

Linolsäure: 9-*cis*,12-*cis*-octadecensäure, 98%, wurde von der Fa. Roth, Karlsruhe, bezogen.

IR-, NMR- und Massenspektren: Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer Modell 21 in KBr aufgenommen, die NMR-Spektren mit einem Varian HA-100 A; die δ -Werte werden relativ zu *TMS* (intern) angegeben. Die Massenspektren wurden mit einem AEI, MS 20-Gerät registriert. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV, die Ionenquelle hatte eine Temp. von 120°. Alle Substanzen wurden für die Massenspektroskopie methyliert und silyliert und gelöst in Äther nach der Direkteinführungstechnik eingebracht.

Methylierung: Die Trihydroxysäuren G_1 , G_2 , G_3 wurden mit Diazomethan nach *Schlenk* et al.¹⁵ in die Methylester übergeführt.

Silylierung: Etwa 5–8 mg der Methylester von G_1 , G_2 , G_3 wurden mit 0,5 ml Pyridin + 0,3 ml Hexamethyldisilazan + 0,15 ml Trimethylchlorsilan 2 Stdn. bei Raumtemp. umgesetzt¹⁶. Anschließend wurden bei 30° im Stickstoffstrom die Reagentien abgeblasen, der Rückstand mit 1 ml Et_2O (p. A.) aufgenommen, zentrifugiert und die Et_2O -Lösung erneut mit N_2 zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Et_2O gelöst und für die Massenspektroskopie verwendet.

Hydrierung: Die Mikrohydrierungen wurden vom *Pregl*-Laboratorium der Universität Graz gemacht. Als Katalysator wurde PtO_2 verwendet.

Dünnschichtchromatogramme: Kieselgel—Alufolie 60 F 254 (Merck) und Borsäure-impregnierete Kieselgel-Alufolie. Zur Imprägnierung wurden die Folien 5 Sek. in eine 5proz. methanol. Borsäurelösung getaucht und anschließend bei Raumtemp. mindestens 24 Stdn. getrocknet. Als Laufmittel wurden verwendet:

a) Et_2O — $HOAc$ 98 : 2.

b) Benzol— Et_2O — $EtOH$ — $HOAc$ 250 : 200 : 30 : 1.

Zur Anfärbung wurden die DC mit 10proz. alkohol. Phosphormolybdän-säurelösung besprüht und einige Min. auf 120° erwärmt. Die getrennten Substanzen erschienen als graublau Spots.

Inkubation und Extraktion: Eine Suspension von 2 ml Linolsäure, 140 g Gerstenmehl und 100 ml 0,1M-Phosphatpuffer, pH 6,8, wurde 2 Stdn. in einem offenen Gefäß geschüttelt. Anschließend wurde mit 500 ml 4M-HCl angesäuert und 3mal mit je 500 ml CHCl_3 —MeOH (2:1) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden nach 2stdg. Stehen bei —20° durch ein Faltenfilter filtriert und am Rotavapor zur Trockene gebracht. Nach Trocknen bei 0,01 Torr wurden 3,4 g eines gelbbraunen, viskosen Rückstands erhalten.

Isolierung und Charakterisierung von G₃

30 g Kieselgel (7734 Merck) wurden mit 4 ml H₂O desaktiviert und mit einem Gemisch aus Benzol — wassergesätt. Äther — HOAc 50:50:2 in die Säule (2 cm Durchmesser) eingeschlämmt. Aufgetragen wurde der Extrakt aus einem Inkubationsansatz. Eluiert wurde mit 200 ml Benzol—wassergesätt. Äther—HOAc 50:50:2, dann 300 ml wassergesätt. Äther—HOAc 98:2 und 100 ml MeOH—HOAc 98:2. Die Durchlaufgeschwindigkeit war 1 ml/min, gesammelt wurden 10 ml-Fractionen. Die DC-Überprüfung ergab für die einzelnen Fractionen folgende Zusammensetzung: Fraction 1—15, unpolare Substanzen mit *R_f* > 0,48, 2840 mg; Fraction 16—45 Substanzen mit *R_f* 0,20—0,48, 188 mg; Fraction 50—60, Substanzen mit *R_f* < 0,20, 325 mg. Das Substanzgemisch von Fraction 16—45 wurde erneut wie oben beschrieben getrennt. Der Trockenrückstand der G₃ enthaltenden Fractionen aus 10 Trennungen (entsprechend 20 ml oxydierter Linolsäure) wurde mit 1 ml Et₂O digeriert und nach 1stdg. Stehen bei —20° bei 0° zentrifugiert. Nach Trocknen des Sediments wurden 23 mg G₃ als weiße, feste Substanz erhalten. G₃ ist schwer löslich in Hexan, mäßig löslich in Et₂O, gut löslich in Äthylacetat und Methanol.

UV-Spektrum (MeOH): Schulter bei 285 nm (ϵ' = 0,35) und 235 nm (ϵ' = 1,0), dann kontinuierlicher Anstieg.

Das IR-Spektrum (KBr) zeigte Banden bei (s = stark, m = mittel, w = schwach) 2,85 m, 2,90 s, 3,10 s, 3,45 s, 3,52 s, 5,92 s, 6,12 w, 6,82 m, 7,12 w, 7,50 w, 7,70 w, 7,80 w, 7,92 w, 8,10 w, 8,15 w, 8,82 w, 8,95 w, 9,05 w, 9,17 w, 9,37 w, 9,45 w, 9,85 s, 10,0 w, 10,25 w, 11,0 w, 11,73 w, 12,17 w, 12,95 w, 13,90 w μ .

Das IR-Spektrum des G₃-Methylesters zeigte Banden bei: 2,95 s, 3,43 s, 3,52 s, 5,77 s, 6,10 w, 6,82 m, 6,97 m, 7,25 w, 7,55 w, 7,70 w, 7,95 m, 8,23 m, 8,40 m, 8,52 m, 9,75 s, 9,85 s, 10,25 m, 11,0 w, 11,40 w, 11,75 w, 12,15 w, 12,95 w, 13,90 w μ .

NMR-Spektren: siehe Tab. 1.

Massenspektrum (methyliert, silyliert): siehe Abb. 2.

Massenspektrum (methyliert, hydriert, silyliert): *m/e* 441 (1,1%, M—31—90), 434 (2,5), 419 (0,6), 373 (1,2), 361 (1,6), 345 (1,0), 332 (1,2), 317 (1,0), 315 (1,0), 303 (3,0), 271 (11), 259 (35), 215 (4), 214 (4), 213 (4), 204 (16), 201 (45), 200 (12), 155 (3), 149 (17), 148 (12), 147 (75), 143 (10), 133 (22), 131 (15), 130 (10), 129 (65), 109 (30), 103 (40), 101 (20), 73 (100).

Mikrohydrierung: Verbrauch 338 μ l H₂ pro 5,996 mg G₃-Methylester; ber. 390 μ l H₂.

Isolierung und Charakterisierung von G₁

Die bei der Isolierung von G_3 erhaltenen Fraktionen 50—60 wurde auf einer Kieselgelsäule (40 g, desaktiviert und 4 ml H_2O) mit 900 ml wassergesätt. Äther—HOAc 98:2 getrennt. Durch 10 Trennungen (entsprechend 20 ml oxydierte Linolsäure) wurden 165 mg G (Gemisch von $G_1 + G_2$) frei von anderen Substanzen erhalten. Die Trennung von G_1 und G_2 erfolgte auf 40 g Borsäure-imprägniertem Kieselgel mit 300 ml wassergesätt. Äther—HOAc 98:2 als Elutionsmittel. Aufgetragen wurden 160 mg G . Zur Imprägnierung wurden 50 g Kieselgel mit 50 ml einer 3proz. Lösung von Borsäure in MeOH gut durchgemischt und das MeOH am Rotavapor bei 40° entfernt. Das trockene Gel wurde nochmals in gleicher Weise imprägniert, so daß sich ein Imprägnierungsgrad von 6% ergab. Bei einer Teilung des Eluats in 5 ml-Fraktionen enthielten Fraktion 25 bis 38 G_1 und Fraktion 42—50 G_2 .

Zur Entfernung von Borsäure wurde der Trockenrückstand von Fraktion 25—38 in 10 ml MeOH gelöst und das MeOH im Vak. abdestilliert. Der Vorgang wurde 3mal wiederholt. Der Trockenrückstand von G_1 wurde in einem Zentrifugenröhrchen mit 1 ml Et_2O digeriert, Et_2O wurde abzentrifugiert und das Sediment getrocknet. 142 mg G_1 wurde als weiße, feste Substanz erhalten.

Das IR-Spektrum zeigte Banden bei 2,85 s, 3,02 s, 3,45 s, 3,52 s, 5,92 s, 6,15 w, 6,85 m, 6,95 m, 7,10 w, 7,52 m, 7,65 m, 7,90 m, 8,12 w, 8,20 w, 8,35 w, 8,85 m, 9,10 m, 9,35 s, 9,70 m, 10,26 s, 10,75 w, 11,60 m, 11,95 w, 13,80 m μ .

Das NMR-Spektrum des G_1 -Methylesters zeigte Signale bei δ 0,90 (etwa t, 3 H, CH_3CH_2), 1,20—2,0 [breiter Peak, $(CH_2)_n$], 2,30 (t, CH_2COOCH_3), 2,5 (breit, OH), 3,45 (m, CH_2CHOH), 3,65 (s, $COOCH_3$), 3,90 (m, $CH=CH-CHOH$), 4,15 (m, $CH_2CHOHCHOH$), 5,75 (m, $CH=CH$).

Das Massenspektrum (methyliert, silyliert) zeigte peaks bei m/e 545 (0,3%, $M-15$), 460 (14, $M-100$), 439 (0,7, $M-31-90$), 429 (0,4), 387 (2), 381 (1), 317 (1,1), 298 (5), 297 (2), 259 (17), 247 (0,8), 245 (0,9), 243 (0,5), 230 (1,2), 217 (1,1), 212 (2,4), 173 (100), 159 (1), 155 (4), 147 (7), 129 (3), 103 (11), 75 (11), 73 (74).

Das Massenspektrum (methyliert, hydriert, silyliert) zeigte Peaks bei m/e 443 (1,5%), 441 (1,1), 389 (3), 383 (1,1), 374 (4,6), 359 (1,5), 317 (4,6), 315 (5,3), 299 (100), 285 (4,6), 271 (2,7), 259 (23), 227 (7), 173 (27), 159 (4,6), 149 (5,3), 147 (7), 133 (3), 129 (12), 109 (4,6), 103 (15), 101 (5,3), 95 (9), 83 (19), 81 (9), 75 (23), 73 (69).

Die Mikrohydrierung ergab einen Verbrauch von 391 μ l H_2 pro 4,709 mg G_1 -Methylester, ber.: 306 μ l.

DC: Auf Kieselgel mit Laufmittel a) R_f 0,15, auf Borsäure imprägniertem Kieselgel, Laufmittel a) R_f 0,43. Laufmittel b) R_f 0,31.

Isolierung und Charakterisierung von G₂

Die bei der Isolierung von G_1 anfallenden Fraktionen mit G_2 wurden wie bei G_1 von Borsäure befreit, der Trockenrückstand wurde dann in einem Zentrifugenröhrchen mit 0,5 ml Äther digeriert und zentrifugiert. Nach Trocknen des Sediments wurden 14 mg G_2 als weiße feste Substanz erhalten.

Das IR-Spektrum zeigte Banden bei 3,10 s, 3,45 s, 3,55 s, 5,92 s, 6,15 w, 6,85 m, 7,0 w, 7,12 w, 7,70 w, 7,95 w, 8,80 w, 8,95 w, 9,35 m, 9,90 w, 10,25 w, 10,32 w, 10,80 w, 13,90 w.

Das Massenspektrum (methyliert, silyliert) zeigte Peaks bei m/e 545 (0,3%, $M-15$), 460 (13, $M-100$), 455 (1,2), 439 (0,7), 387 (1,9), 381 (2,1), 317 (2,4), 301 (2,4), 298 (3,4), 259 (100), 245 (0,7), 243 (1,3), 230 (1,3), 212 (7,9), 211 (2,6), 173 (47), 155 (23), 147 (9,4), 137 (2,1), 133 (1,6), 129 (6,8), 119 (1,3), 109 (6,8), 103 (6,8), 83 (7,3), 75 (11,0), 73 (89).

Das Massenspektrum (methyliert, hydriert, silyliert) zeigte Peaks bei m/e 401 (1,8), 398 (1,5), 374 (3,0), 332 (7,4), 303 (22), 301 (30), 300 (11), 299 (41), 259 (100), 243 (12), 228 (11), 215 (30), 214 (18), 213 (67), 173 (37), 159 (9), 155 (37), 149 (22), 147 (22), 143 (7), 141 (11), 133 (9), 131 (7), 129 (30), 109 (11), 103 (15), 101 (7), 95 (15), 85 (7,0), 83 (18), 81 (18), 75 (22), 73 (98).

Die Mikrohydrierung ergab einen Verbrauch von 39 μ l H_2 pro 0,553 mg, ber.: 36 μ l.

DC: Auf Kieselgel mit Laufmittel a) R_f 0,15, auf Borsäure-imprägniertem Kieselgel mit Laufmittel a) R_f 0,25, mit Laufmittel b) R_f 0,22.

Für die Förderung der Arbeit danken wir der Stroh Brewery Comp. Detroit, USA.

Literatur

- ¹ R. T. Holman und S. Bergström, in: The Enzymes (J. B. Sumner und K. Myrbäck, Hrsg.), Vol. II, Part 1, S. 565. New York: Academic Press. 1951.
- ² J. Christopher, E. Pistorius und B. Axelrod, Biochim. Biophys. Acta **198**, 12 (1970).
- ³ W. M. Verhue und A. Franke, Biochim. Biophys. Acta **284**, 43 (1972).
- ⁴ M. Haydar und D. Hadziyev, J. Sci. Food Agr. **24**, 1039 (1973).
- ⁵ W. Franke und H. Frehse, Z. Physiol. Chem. **295**, 333 (1953).
- ⁶ J. W. Wallace und E. L. Wheeler, Cereal Chem. **49**, 92 (1972).
- ⁷ H. W. Gardner, J. Lipid Res. **111**, 311 (1970).
- ⁸ S. Yabuuchi und M. Amaha, Phytochem. **14**, 2569 (1975).
- ⁹ S. Yabuuchi und M. Amaha, Phytochem. **15**, 387 (1976).
- ¹⁰ A. Graveland, L. Pesman und P. van Eerde, Master Brewers Assn. Amer. Techn. Quart. **9**, 98 (1972).
- ¹¹ A. Graveland, J. Amer. Oil Chem. Soc. **47**, 352 (1970).
- ¹² G. R. Waller, Biochemical Applications of Mass Spectrometry, S. 220, 318. Wiley. 1972.
- ¹³ G. Eglinton und D. H. Hunneman, Phytochem. **7**, 313 (1968).
- ¹⁴ A. Graveland, Biochem. Biophys. Res. Commun. **41**, 427 (1970).
- ¹⁵ H. Schlenk und J. L. Gellerman, Anal. Chem. **32**, 1142 (1960).
- ¹⁶ C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita und W. W. Weels, J. Amer. Chem. Soc. **85**, 2497 (1963).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

Prof. Dr. H. Esterbauer
 Institut für Biochemie
 Universität Graz
 Halbärthgasse 5
 A-8010 Graz
 Österreich