

## ÜBER DIE LIPIDE DER PTERIDOPHYTEN—I. DIE ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER POLYENSÄUREN

ALFONS RADUNZ

aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

(Received 26 July 1966)

**Zusammenfassung**—Die Polyensäuren des Wurmfarnes (*Dryopteris filix-mas*) wurden isoliert und durch oxydative Ozonidabbau, Gas- und Dünnschichtchromatographie, i.r.- und u.v.-Spektroskopie identifiziert. Es kommen die  $\Delta^{7,10,13}$ -Hexadecatriensäure, die  $\Delta^{9,12,15}$ -Octadecatriensäure, die  $\Delta^{8,11,14}$ -Eicosatriensäure, die  $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure und die  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eicosapentaensäure vor. Die Fettsäuren von *Phyllitis scolopendrium*, *Osmunda regalis*, *Psilotum triquetum* und der Schachtelhalme *Equisetum arvense* und *Equisetum fluviatile* wie auch die Fettsäuren aus Chloroplasten von *E. arvense* wurden gaschromatographisch untersucht. Die Hexadecatriensäure macht 1 bis 16% der Gesamt fettsäuren, die Octadecatriensäure 21 bis 57%, die Eicosatriensäure 0,4 bis 7%, die Eicosatetraensäure 0,5 bis 8% aus. Die Eicosapentaensäure wurde nur bei *Dryopteris filix-mas*, *Phyllitis scolopendrium*, *Osmunda regalis* und *Psilotum triquetum* zu 0,5 bis 3% gefunden. Die in Algen und grünen Blättern weit verbreitete trans- $\Delta^3$ -Hexadecensäure kommt bei den untersuchten Pteridophyten zu etwa 1% der Gesamt fettsäuren vor.

**Abstract**—The polyenoic acids of *Dryopteris filix-mas* have been isolated and identified by oxidative ozonide degradation, gas- and thin-layer chromatography, i.r.- and u.v.-spectroscopy. There were found the  $\Delta^{7,10,13}$ -hexadecatrienoic acid, the  $\Delta^{9,12,15}$ -octadecatrienoic acid, the  $\Delta^{8,11,14}$ -eicosatrienoic acid, the  $\Delta^{5,8,11,14}$ -eicosatetraenoic acid and the  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -eicosapentaenoic acid. The fatty acids of *Phyllitis scolopendrium*, *Osmunda regalis*, *Psilotum triquetum* and *Equisetum arvense* and *E. fluviatile*, as well as the fatty acids of the chloroplasts of *E. arvense* were examined by gas chromatography. The hexadecatrienoic acid represents 1–16% of the total fatty acids, the octadecatrienoic acid 21–57%, the eicosatrienoic 0.4–7%, the eicosatetraenoic acid 0.5–8%. The eicosapentaenoic acid has been found only from 0.5–3% in *D. filix-mas*, *P. scolopendrium*, *O. regalis* and *P. triquetum*. The trans- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid, also present in algae and green leaves amounts to 1% of the total fatty acids of the examined Pteridophyta.

### EINLEITUNG

DIE Lipide der Algen und der grünen Blätter höherer Pflanzen sind gekennzeichnet durch das Vorkommen bestimmter Polyensäuren. So treten in höheren Pflanzen nur Linol- und Linolensäure auf (Zusammenfassend berichten<sup>1,2</sup>). Außerdem wurden in den Lipiden von *Spinacia oleracea* und *Brassica napus* noch eine Hexadecatriensäure gefunden.<sup>3–7</sup> In Grünalgen überwiegen wie in Blättern höherer Pflanzen mehrfach ungesättigte Säuren mit 18 Kohlenstoffatomen. Daneben wurden aber erhebliche Mengen von C<sub>16</sub>-Polyensäuren und zu geringeren Prozentsätzen auch ungesättigte C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Säuren nachgewiesen.<sup>8–15</sup>

<sup>1</sup> A. T. JAMES und B. W. NICHOLS, *Nature* **210**, 372 (1966).

<sup>2</sup> A. RADUNZ, *Flora* **157** (1966).

<sup>3</sup> H. DEBUCH, *Z. Naturforsch.* **16b**, 561 (1961).

<sup>4</sup> H. DEBUCH, *Experientia* **18**, 61 (1962).

<sup>5</sup> A. RADUNZ, *Z. Physiol. Chem.* **343**, 294 (1966).

<sup>6</sup> F. B. SHORLAND, *Nature* **156**, 269 (1945).

<sup>7</sup> J. K. HEYES und F. B. SHORLAND, *Biochem. J.* **49**, 503 (1951).

<sup>8</sup> H. SCHLENK, H. K. MANGOLD, J. L. GELLERMAN, W. E. LINK, R. A. MORISSETTE, R. T. HOLMAN und H. HAYES, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **37**, 547 (1960).

<sup>9</sup> E. KLENK, W. KNIPPRATH, D. EBERHAGEN und H. P. KOOF, *Z. Physiol. Chem.* **334**, 44 (1963).

<sup>10</sup> E. KLENK und W. KNIPPRATH, *Z. Physiol. Chem.* **327**, 283 (1962).

<sup>11</sup> J. ERWIN und K. BLOCH, *Biochem. Z.* **338**, 496 (1963).

<sup>12</sup> I. IWATA, *Agr. Biol. Chem.* **28**, 610 (1964).

<sup>13</sup> H. WAGNER und P. POHL, *Biochem. Z.* **341**, 476 (1965).

<sup>14</sup> J. L. GELLERMAN und H. SCHLENK, *J. Protozool.* **12**, 178 (1965).

<sup>15</sup> A. G. VERESHCHAGIN und G. L. KLYACHKO-GURVICH, *Biokemia* **30**, 543 (1965).

Ein anderes Bild der Fettsäurenzusammensetzung zeigen die Rot- und Braunalgen.<sup>9, 13</sup> Vorherrschend treten in den Rotalgen die C<sub>20</sub>-Polyensäuren neben nur geringen Mengen der mehrfach ungesättigten C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>- und der C<sub>22</sub>-Säuren auf. Die Braunalgen enthalten C<sub>18</sub>- und C<sub>20</sub>-Polyensäuren und nur in Spuren C<sub>16</sub>- und C<sub>22</sub>-Polyensäuren. Sie stehen somit bezüglich der Fettsäurenzusammensetzung zwischen den Grün- und Rotalgen.

Da auch in den Moosen, die einen Übergang zwischen den Thallophyten und den Kormophyten bilden, in erheblichen Mengen ungesättigte C<sub>20</sub>-Säuren vorkommen<sup>16, 17</sup> und in grünen Blättern der höheren Pflanzen diese Polyensäuren bisher nicht nachgewiesen wurden, soll in dieser Arbeit über die Fettsäuren der Pteridophyten berichtet werden.

#### ERGEBNIS UND DISKUSSION

Die Fettsäuren gemische der in Tabelle 1 zusammengestellten Farne und Schachtelhalme bestehen zu 21–34 % aus Fettsäuren mit 16 Kohlenstoffatomen, zu 55–70 % aus Säuren mit 18 Kohlenstoffatomen und zu 6–14 % aus Säuren mit 20 Kohlenstoffatomen. 70–85 % der Säuren sind ungesättigt. Davon machen Polyensäuren mit drei und mehr Doppelbindungen 80–90 % aus. *Phyllitis scolopendrium* und *Psilotum triquetum* enthalten wesentlich weniger Octadecatriensäure als die übrigen Farne und auch als die Schachtelhalme.

TABELLE 1. ZUSAMMENSETZUNG DER FETTSÄURENGEMISCHE AUS BLÄTTERN DER SCHACHTELHALME UND FARNE

Kohlenstoffzahl und Doppel- bindungen	<i>Equisetum arvense</i>		<i>Equisetum</i> <i>fluviatile</i>	<i>Dryopteris</i> <i>filix-mas</i>	<i>Phyllitis</i> <i>scolopendrium</i>	<i>Osmunda</i> <i>regalis</i>	<i>Psilotum</i> <i>triquetum</i>
	Blätter	Chloroplasten					
C <sub>10:0</sub>							
C <sub>11:0</sub>							
C <sub>12:0</sub>	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur
C <sub>12 unges.</sub>	0,5		Spur	0,3	0,5	Spur	1,3
C <sub>14:0</sub>	0,4	0,6	0,2	0,3	0,5	0,7	0,7
C <sub>15:0</sub>	Spur	0,5	Spur	Spur	Spur	Spur	Spur
C <sub>15 unges.</sub>		1,8					
C <sub>16:0</sub>	12,6	14,4	15,4	18,3	17,3	18,7	22,0
C <sub>16:1</sub>	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4
C <sub>16:1 trans</sub>	0,9	1,0	1,2	1,0	1,3	1,3	0,7
C <sub>16:2</sub>				Spur			
C <sub>16:3</sub>	13,8	15,9	12,5	11,5	1,6	9,8	0,7
C <sub>17:0</sub>	0,7	0,4	0,5	Spur	0,3	0,5	0,4
C <sub>18:0</sub>	0,4	0,4	0,7	0,8	1,3	0,5	3,9
C <sub>18:1</sub>	2,4	1,4	1,4	4,4	18,7	3,6	13,0
C <sub>18:2</sub>	6,7	4,1	7,8	8,7	29,5	5,3	19,6
C <sub>18:3</sub>	54,7	57,0	51,6	40,8	20,8	48,7	27,7
C <sub>20:0</sub>	1,2	Spur	2,3	2,1	1,3	1,9	1,0
C <sub>20:1</sub>	1,0		1,0	Spur	Spur	Spur	Spur
C <sub>20:3</sub>	1,2	0,5	1,3	1,3	0,4	0,5	6,5
C <sub>20:4</sub>	3,0	1,6	3,6	7,5	6,1	4,7	0,5
C <sub>20:5</sub>				2,6	Spur	3,3	0,5

Die Polyensäuren wurden aus Blättern von *Dryopteris filix-mas* durch präparative Gaschromatographie isoliert und über die Quecksilber-II-Acetat-Addukte säulenchromatographisch und dünnenschichtchromatographisch rein dargestellt. Die Kettenlänge wurde

<sup>16</sup> J. L. GELLERMAN und H. SCHLENK, *Experientia* 20, 426 (1964).

<sup>17</sup> H. WAGNER und H. FRIEDRICH, *Naturwissenschaften* 52, 305 (1965).

durch Hydrierung der Säuren mit Platinoxyd als Katalysator und anschließender gaschromatographischer Analyse bestimmt. Die Zahl der Doppelbindungen konnte aus dem Verhalten der entsprechenden Quecksilberadditionsverbindungen an Kieselgel-Kieselgur-Dünnenschichtplatten ermittelt werden.<sup>18</sup> Zur weiteren Strukturaufklärung wurden i.r.- und u.v.-Spektren aufgenommen und der oxydative Ozonidabbau sowohl der Säuren wie auch der Methylester nach Klenk und Bongard<sup>19</sup> durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Als freie Dicarbonsäure wurde unter den Spaltprodukten der Methylester nur Malonsäure erhalten. Demnach sind die Doppelbindungen der Polyensäuren in Divinylmethangruppierung angeordnet. Das Verhältnis Malonsäure/längerketige Dicarbonsäure betrug unter den Abbaudicarbonsäuren der Triensäuren im Mittel 1:1, der Tetraensäure 3:2 und der Pentaensäure 3:1. Auch Klenk und Bongard<sup>19</sup> fanden Malonsäure in einer Ausbeute von 50 bis 70% der theoretisch zu erwartenden Menge. Die erhaltenen Abbauprodukte der Fettsäuren und der Methylester weisen auf das Vorkommen der folgenden Polyensäuren hin: die  $\Delta^{7,10,13}$ -Hexadecatriensäure, die  $\Delta^{9,12,15}$ -Octadecatriensäure (=Linolensäure), die

TABELLE 2. ABBAU-DICARBONSÄUREN UND -MONOCARBONSÄUREN DER ISOLIERTEN FETTSÄUREN

	Oxydativer Ozonidabbau der Fettsäuren		Oxydativer Ozonidabbau der Fettsäuremethylester
	Dicarbonsäuren	Monocarbonsäuren	Dicarbonsäuren-Monomethylester
Hexadecensäure	C <sub>3</sub> , Malonsäure	C <sub>13</sub> , Tridecansäure	—
Hexadecatriensäure	C <sub>3</sub> , Malonsäure C <sub>7</sub> , Pimelinsäure	C <sub>3</sub> , Propionsäure	C <sub>7</sub> , Pimelinsäure
Octadecatriensäure	C <sub>3</sub> , Malonsäure C <sub>9</sub> , Azelainsäure	C <sub>3</sub> , Propionsäure	C <sub>9</sub> , Azelainsäure
Eicosatriensäure	C <sub>3</sub> , Malonsäure C <sub>8</sub> , Suberinsäure C <sub>5</sub> , Glutarsäure	C <sub>6</sub> , Capronsäure	C <sub>8</sub> , Suberinsäure C <sub>5</sub> , Glutarsäure
Eicosatetraensäure	C <sub>3</sub> , Malonsäure C <sub>5</sub> , Glutarsäure	C <sub>6</sub> , Capronsäure	C <sub>5</sub> , Glutarsäure
Eicosapentaensäure	C <sub>3</sub> , Malonsäure C <sub>5</sub> , Glutarsäure	C <sub>3</sub> , Propionsäure	C <sub>5</sub> , Glutarsäure

$\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure (=Arachidonsäure) und die  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eicosapentaensäure. Nach den i.r.-Spektren haben diese Säuren all-cis-Konfiguration. Gaschromatographisch sind sie identisch mit den von Klenk *et al.*<sup>9</sup> aus Algen isolierten Polyensäuren.\* Schlenk und Gellerman<sup>20</sup> wiesen bei zwei anderen Farnarten (*Matteuccia struthiopteris*, *Osmunda claytoniana*) die gleichen Polyensäuren nach.

Ferner wurde eine Eicosatriensäure isoliert, die bei der gaschromatographischen Analyse eine etwas längere Retentionszeit hatte als die authentische  $\Delta^{5,8,11}$ -Eicosatriensäure. Der Ozonidabbau ergab, daß die Doppelbindungen sich in den Positionen 8, 11 und 14 befinden. Im u.v.-Spektrum trat aber zwischen 220 und 240 nm ein weiteres Maximum auf (Abb. 1b), was nach O'Connor<sup>21</sup> auf das Vorhandensein konjugierter Doppelbindungen deutet, die

\* Herrn Prof. Dr. E. Klenk sei für die Überlassung der  $\Delta^{5,8,11}$ -Eicosatriensäure, der  $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure und der  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eicosapentaensäure als Testsubstanz gedankt.

<sup>18</sup> H. WAGNER und H. POHL, *Biochem. Z.* **340**, 337 (1964).

<sup>19</sup> E. KLENK und W. BONGARD, *Z. Physiol. Chem.* **290**, 181 (1952).

<sup>20</sup> H. SCHLENK und J. L. GELLERMAN, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 504 (1965).

<sup>21</sup> R. T. O'CONNOR, In *Fatty Acids, Their Chemistry, Properties, Production and Uses*, (Edited by K. S. MARKLEY), Part 1, p. 285. New York (1960).

nach dem Dientypus angeordnet sind. Mehrfach wurde auch über das Vorkommen geringer Mengen Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen in grünen Blättern berichtet.<sup>3, 22, 23</sup> Da unter den Abbaudicarbonsäuren aber keine Oxal- und Bernsteinsäure nachgewiesen werden konnte, muß zunächst offenbleiben, ob eine isomere Triensäure mit zwei konjugierten  $\text{—C=C—}$ -Gliedern vorkommt. Die unter den Spaltprodukten noch auftretende Glutarsäure, die mengenmäßig etwa 10% der Suberinsäure ausmacht, dürfte wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der Triensäure mit Arachidonsäure zurückzuführen sein.

Die Polyensäuren von *Phyllitis scolopendrium*, *Osmunda regalis* und *Psilotum triquetum* stimmen gaschromatographisch mit den aus *Dryopteris filix-mas* isolierten Säuren überein (Tabelle 1). In *P. triquetum* tritt noch eine weitere Eicosatriensäure auf, die mit der  $\Delta^{5,8,11,14}$ -

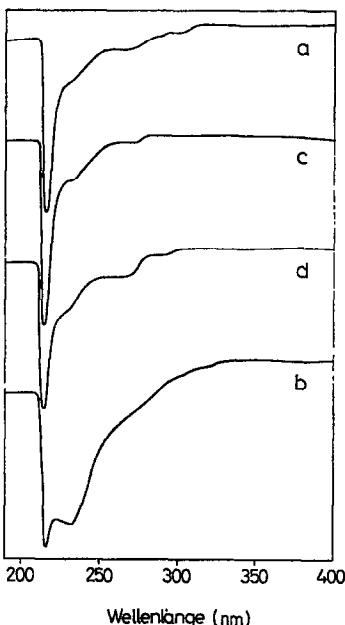


ABB. 1. U.V.-SPEKTREN DER ISOLIERTEN FETTSÄUREN, 1%IGE LÖSUNG IN HEXAN, GERÄT: PERKIN-ELMER-SPEKTROMETER, MODEL 137 u.v.

Methylester der (a)  $\Delta^{7,10,13}$ -Hexadecatriensäure; (c)  $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure; (d)  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eicosapentaensäure; und (b)  $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatriensäure.

Eicosatriensäure in der Retentionszeit übereinstimmt, und ferner eine Eicosatetraensäure, die eine etwas längerer Retentionszeit als die  $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure hat.

In den Schachtelhalmen *Equisetum arvense* und *E. fluviatile* kommen mit Ausnahme der C<sub>20</sub>-Polyensäuren die gleichen Säuren vor wie in den Farnen. Eine Eicosatriensäure hat, wie die gaschromatographische Analyse ergab, eine etwas längere Retentionszeit als die authentische  $\Delta^{5,8,11}$ -Eicosatriensäure und eine Eicosatetraensäure hat eine etwas längere Retentionszeit als die authentische  $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure. Nach Gellerman and Schlenk<sup>20</sup> handelt es sich bei den Schachtelhalmen *E. arvense* und *E. hiemale* um die ungewöhnliche  $\Delta^{5,11,14}$ -Eicosatriensäure und um die  $\Delta^{5,11,14,17}$ -Eicosatetraensäure. Eine Eicosapentaensäure kommt in Schachtelhalmen nicht vor (Tabelle 1). Die Chloroplasten

<sup>22</sup> K. J. ZIRM, A. PONGRATZ und W. POLESOFSKY, *Biochem. Z.* **326**, 405 (1955).

<sup>23</sup> W. M. CROMBIE, *J. Exp. Bot.* **9**, 254 (1958).

von *E. arvense* enthalten im Vergleich zu den Blättern mehr Hexadecatrien- und Octadecatriensäure. In Blättern hingegen sind wieder mehr C<sub>20</sub>-Trien- und -Tetraensäure vorhanden.

Wie in den Lipiden aus grünen Blättern höherer Pflanzen steht in den Pteridophyten die Linolensäure mit 28–57% der Fettsäuren an erster Stelle. Eine Ausnahme macht *P. scolopendrium*. Hier tritt die Octadecadiensäure zu 30% der Gesamtfettsäuren stark hervor.

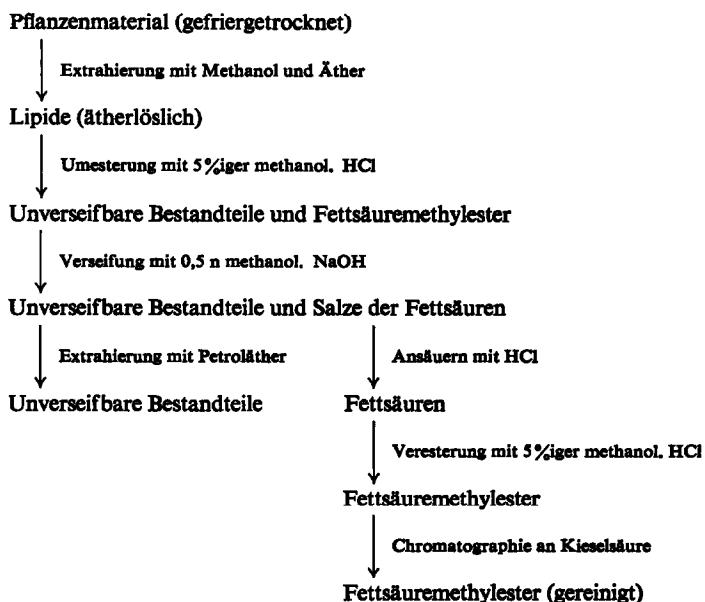
Die trans-Δ<sup>3</sup>-Hexadecensäure, über deren Vorkommen in photosynthetisch aktiven Geweben und Algen des öfteren berichtet wurde<sup>2, 3, 9, 10, 24–28</sup>, konnte in Farnen und Schachtelhalmen zu 1,3% der Gesamtfettsäuren nachgewiesen werden (Tabelle 1).

#### MATERIAL UND METHODEN

Die untersuchten Arten der Schachtelhalme und der Farne sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Geerntet wurden die Blattspreiten während der Monate August und September. Die Sporangien der Farne waren ausgereift. Der Wurmfarn (*Dryopteris filix-mas*) und die Schachtelhalme stammen aus den Waldgebieten um die Oedenthaler Mühle bei Lüdenscheid (Sauerland). Die anderen Arten wurden im Gewächshaus oder im Garten des Botanischen Institutes der Universität gezogen.

Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials sowie die Gewinnung der ätherlöslichen Lipide und der Fettsäuren erfolgte nach den in früheren Arbeiten beschriebenen Methoden<sup>2, 29, 30</sup>.

#### Aufarbeitungsgang



<sup>24</sup> F. HAVERKATE und L. L. M. VAN DEENEN, *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 78 (1965).

<sup>25</sup> L. F. ALLEN, P. GOOD, H. F. DAVIS und S. D. FOWLER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 424 (1964).

<sup>26</sup> R. O. WEENINK und F. B. SHORLAND, *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 613 (1964).

<sup>27</sup> B. W. NICHOLS, B. J. B. WOOD und A. T. JAMES, *Biochem. J.* **95**, 6 (1965).

<sup>28</sup> E. ROTSCHE und H. DEBUCH, *Z. Physiol. Chem.* **343**, 135 (1965).

<sup>29</sup> A. RADUNZ, *Z. Physiol. Chem.* **341**, 192 (1965).

<sup>30</sup> A. RADUNZ, *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 386 (1966).

### *Gaschromatographische Analyse*

Die Fettsäurengemische der einzelnen Objekte wurden gaschromatographisch mit einem Pye-Argon-Gaschromatographen an einer PEGA-Säule und an einer Reoplex-400-Säule bei 190° und einer Argon-Durchflußgeschwindigkeit von 60 ml/min untersucht. Die einzelnen Fettsäuren wurden durch Vergleichschromatogramme mit authentischen Säuren und durch Hydrierung der Gemische mit Platinoxyd als Katalysator identifiziert. Die prozentuale Zusammensetzung der Fettsäurengemische wurde nach der bereits beschriebenen Methode ermittelt.<sup>2</sup>

Die Isolierung der Chloroplasten wurde nach der am hiesigen Institut üblichen und bei Kreutz und Menke<sup>31</sup> beschriebenen Methode in wässrigem Medium vorgenommen. Dabei erhält man das Lamellarsystem der Chloroplasten. Diese Präparate wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet.

### *Die Isolierung der ungesättigten Säuren*

Das Fettsäurengemisch des Wurmfarves wurde durch präparative Gaschromatographie mit Hilfe eines F & M-Gerätes, Modell 770 nach der Kettenlänge aufgetrennt. Die Säulenlänge des Gerätes betrug 8 Fuß und der Durchmesser  $\frac{3}{4}$  in. Die Säulenfüllung bestand aus Chromosorb W, 60–80 mesh, beladen mit 10% Polyäthylenglykol-Adipinsäureester. Als bewegliche Phase wurde ein Gasgemisch aus Stickstoff/Heilum im Verhältnis 80:20 verwendet. Die Arbeitstemperatur der Säule lag bei 210°.

Die Fraktion der C<sub>16</sub>-Säuren bestand aus der Hexadecansäure, der cis- und trans-Hexadecensäure, der Hexadecadien- und der Hexadecatriensäure. Zur Reindarstellung der trans-Hexadecen- und der Hexadecatriensäure wurden zunächst die Quecksilber-II-Acetat-Addukte hergestellt<sup>32, 33</sup> und das Gemisch an einer Kieselgelsäule (Merck, Korngröße 0,05–0,2 mm) in die Mono-, Di- und Tri-Addukte getrennt. Die Monoenfraktion, bestehend aus der cis- und trans-Hexadecensäure wurde nochmals in die Quecksilber-Verbindungen übergeführt. Da cis-Verbindungen wesentlich schneller Addukte bilden als trans-Verbindungen, wurde die Reaktion nach 2 Stdn. unterbrochen. Der Ester der trans-Säure konnte nun als freier Ester mit Benzol und der Ester der cis-Säure als Monoaddukt mit Diäthyläther von der Kieselgelsäule eluiert werden. Von den C<sub>18</sub>-Säuren wurde nur die Octadecatriensäure ebenfalls über Quecksilber-Addukte säulenchromatographisch isoliert.

Die bei der präparativen Gaschromatographie gewonnene Fraktion der C<sub>20</sub>-Säuren enthielt eine Eicosamonoen-, Eicosatrien-, Eicosatetraen- und Eicosapentaensäure. Die Isolierung der einzelnen Polyensäuren gelang über Quecksilber-II-Acetat-Addukte an Kieselgel G/Kieselgur (15:35)-Dünnenschichtplatten nach den Arbeitsvorschriften von Wagner und Pohl.<sup>18</sup>

### *I.r.-Spektrographie*

Die i.r.-Spektren wurden als Film auf NaCl-Kristalle aufgenommen. Als Aufnahmegerät stand ein Perkin-Elmer-Spektrophotometer, Infracord 137 zur Verfügung.

### *U.v.-Spektrographie*

Die u.v.-Spektren der isolierten Polyensäuren wurden in optisch reinem Hexan als 1%ige Lösungen aufgenommen. (Abb. 1) Gerät: Perkin-Elmer-Spektrophotometer, Modell 137.

<sup>31</sup> W. KREUTZ und W. MENKE, *Z. Naturforsch.* **15b**, 402 (1960).

<sup>32</sup> E. JANTZEN und H. ANDREAS, *Chem. Ber.* **92**, 1427 (1959).

<sup>33</sup> E. JANTZEN und H. ANDREAS, *Chem. Ber.* **94**, 628 (1961).

### Der oxydative Abbau der ungesättigten Fettsäuren

Der oxydative Ozonidabbau wurde nach dem bei Klenk und Bongard<sup>19</sup> beschriebenen Verfahren durchgeführt. 20 mg Fettsäuren bzw. Fettsäuremethylester wurden in 4 ml Essigsäuremethylester gelöst und auf minus 15° abgekühlt. In diese Lösung wurde unter ständigem Schütteln solange aus einem Ozongenerator (Ozotron, Stage KG) ein ozonhaltiger Luftstrom geleitet bis eine als Indikator zugefügte Lösung von Sudanrot sich weingelb färbte. Das überschüssige Ozon wurde durch Einleiten eines Stickstoffstromes vertrieben. Zur Spaltung und Oxydation der Ozonide wurden nun 2 ml Eisessig und 1,5 ml Perhydrol zugegeben und 72 Stdn. auf 37° erwärmt. Danach wurden die gebildeten Peroxyde durch Zugabe von 5 mg Platinoxyd und anschließendem kurzem Aufkochen zerstört. Vom Platinoxyd wurde abfiltriert und das Filtrat im Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wurde der Rückstand hydriert und zur Gewinnung der Monocarbonsäuren bzw. der Dicarbonsäuren-Monomethylester in Petroläther aufgenommen. Um die mitgerissenen Dicarbonsäuren zu entfernen, wurde diese Lösung mit Wasser gewaschen und das Waschwasser gefriergetrocknet.

### Der Nachweis der Abbaumono- und der Abbaudicarbonsäuren

(a) *Gaschromatographische Analyse.* Die Abbaumonocarbonsäuren wie die Abbaudicarbonsäuren-Monomethylester und Abbaudicarbonsäuren wurden mit einem Pye-Argon-Gaschromatographen an einer PEGA- und einer Reoplex-400-Säule unter den in Tabelle 3

TABELLE 3. ARBEITSBEDINGUNGEN FÜR DIE GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE DER ABBAU-DICARBON-SÄUREN-MONOMETHYLESTER UND -DICARBON-SÄUREN UND -MONOCARBON-SÄUREN

	PEGA-Säule (10% beladen)		Reoplex-400-Säule (10% beladen)	
	Säulen-temperatur	Argondurch-flußgeschwin-digkeit	Säulen-temperatur	Argondurch-flußgeschwin-digkeit
Dicarbonsäuren-Monomethylester	200°	75 ml/min	165°	60 ml/min
Dicarbonsäuren-Dimethylester	150°	60 ml/min	115°	60 ml/min
kurzkettige Monocarbonsäure-Amylester	100°	40 ml/min	—	—

angegebenen Arbeitsbedingungen untersucht. Hierzu wurden die Dicarbonsäuren mit Diazomethan in die Dimethylester und die Monocarbonsäuren in die n-Amylester überführt. Die bei der Ozonisierung der Fettsäuremethylester entstandenen Dicarbonsäuren-Monomethylester wurden direkt chromatographiert (Abb. 2). Die als Testsubstanzen verwendeten Dicarbonsäuren wurden von Mann Research Laboratories, New York, bezogen. Die Testsubstanzen der Dicarbonsäuren-Monomethylester wurden dargestellt, und zwar der Glutarsäuremonomethylester ( $C_5$ ) aus dem entsprechenden Anhydrid und Methanol nach Clutterbuch und Raper,<sup>34</sup> der Pimelinsäuremonomethylester ( $C_7$ ) aus dem entsprechenden Diester und Natriumalkoholat nach Blaise und Köhler<sup>35</sup> (Abb. 2). Der Azelainsäuremonomethylester ( $C_9$ ) wurde durch Ozonisierung der authentischen Ölsäure gewonnen. Die Identifizierung des Suberinsäuremonomethylesters ( $C_8$ ) erfolgte nach der Retentionszeit.

<sup>34</sup> P. W. CLUTTERBUCH und H. S. RAPER, *Biochem. J.* 19, 3835 (1925).

<sup>35</sup> E. E. BLAISE und A. KÖHLER, *Bull. Soc. Chim. France* 5, 215 (1910).

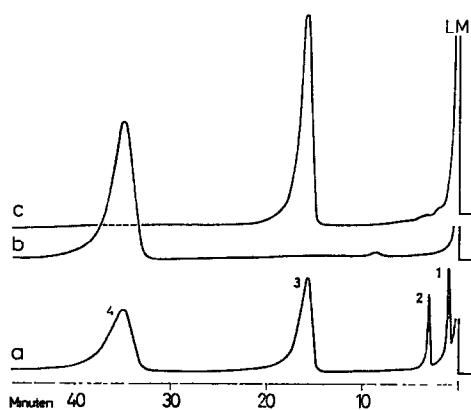


ABB. 2. GASCHROMATOGRAMME DER DICARBONSÄUREN-MONOMETHYLESTER, REOPLEX-400-SÄULE BEI 165° SÄULENTEMPERATUR UND 60 ML/MIN ARGONDURCHFLUßGESCHWINDIGKEIT.

(a) Testgemisch: 1=Glutarsäuredimethylester, 2=Pimelinsäuredimethylester, 3=Glutarsäure-Monomethylester, 4=Pimelinsäure-Monomethylester; (b) Spaltprodukt aus dem Hexadecatriensäuremethylester; (c) Spaltprodukt aus dem Eicosatetraensäuremethylester.

(b) *Papier- und Dünnschichtchromatographie.* Die Monocarbonsäuren wurden als Ammoniumsalze papierchromatographisch untersucht. Papier: Schleicher & Schüll, Nr. 2043 bM. Die Laufstrecke betrug 30 cm. Als Laufmittel wurde 1 n Ammoniak in 85%igem Äthanol verwendet (Wagner und Pohl,<sup>18</sup> Seher<sup>36</sup>). Die Anfärbung erfolgte mit wenig angesäuerter 1%iger Bromkresolgrünlösung. Die Ammoniumsalze erscheinen als blaue Flecken auf gelbem Untergrund. Die mittleren  $R_f$ -Werte betrugen für Essigsäure 0,58, für Propionsäure 0,67, für Buttersäure 0,70 und für Capronsäure 0,74.

Die Dicarbonsäuren wurden als Säuren an Cellulose- und an Kieselgel/Kieselgur (15:35)-Dünnschichtplatten chromatographiert. Die Laufstrecke betrug 18 cm. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Benzol/Methanol/Eisessig im Verhältnis 55:8:2. Die Platten wurden mit Bromkresolgrün-Bleiacetat-Lösung nach Munier und Macheboeuf<sup>37</sup> besprührt. Die Dicarbonsäuren erscheinen als gelbe Flecken auf blau-grauem Untergrund. Als mittlere  $R_f$ -Werte ergaben sich an Kieselgel/Kieselgur-Platten für Oxalsäure 0,06, für Malonsäure 0,22, für Glutarsäure 0,58, für Pimelinsäure 0,70, für Suberinsäure 0,74, für Azelainsäure 0,77.

*Anerkennung*—Herrn Prof. Dr. W. Menke danke ich für wertvolle Hinweise bei der Diskussion der Ergebnisse. Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

<sup>36</sup> A. SEHER, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **58**, 401 (1956).

<sup>37</sup> R. MUNIER und M. MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 380 (1952).