

## NORMALE UND VERZWEIGTE ALKANE IN CHLOROPLASTENPRÄPARATEN UND BLÄTTERN VON *ANTIRRHINUM MAJUS*

PAUL-GERHARD GÜLZ

Botanisches Institut der Universität zu Köln

(Received 19 October 1967)

**Zusammenfassung**—Aus Chloroplastenpräparaten und Blättern von *Antirrhinum majus* wurde ein Alkangemisch isoliert, das über Molekularsiebe in eine normale und eine verzweigte Alkanfraktion aufgetrennt werden konnte. Mit Hilfe der Gaschromatographie und der Massenspektrometrie gelang es, die einzelnen Komponenten als eine Reihe von langkettigen normalen und verzweigten Alkanen zu identifizieren. Es wurden alle *n*-Alkane der Kettenlänge  $C_{16}$ – $C_{35}$  gefunden. In den Chloroplastenpräparaten bestehen sie zu 22 Prozent aus *n*-Heptacosan, zu 14 Prozent aus *n*-Nonacosan, zu 21 Prozent aus *n*-Hentriacontan und zu 21 Prozent aus *n*-Tritriacontan. In den Blättern dominieren *n*-Hentriacontan mit 25 Prozent und *n*-Tritriacontan mit 36 Prozent. Von den verzweigten Alkanen wurden die Kohlenwasserstoffe mit einer Kettenlänge von  $C_{25}$ – $C_{35}$  näher identifiziert. Wie bei den normalen Alkanen überwiegen auch hier die Komponenten mit ungerader Kohlenstoffzahl. Bei den Chloroplastenpräparaten bestehen die verzweigten Alkane aus 19 Prozent Nonacosan, 25 Prozent Hentriacontan und 25 Prozent Tritriacontan. In den Blättern setzen sich die Hauptkomponenten wie folgt zusammen: 14 Prozent Nonacosan, 24 Prozent Hentriacontan und 31 Prozent Tritriacontan. Die untersuchten verzweigten Alkane sind bei gleicher Kohlenstoffzahl sowohl als 2-Methyl- wie auch als 3-Methyl-Verzweigungen in etwa gleicher Konzentration anzutreffen. Eine Ausnahme bilden 2-Methyl-octacosan und 2-Methyl-triacontan, von denen 3-Methyl-Isomere nicht gefunden wurden. In den Chloroplastenpräparaten sind die Alkane zu 0,20 Prozent enthalten. Ihre Zusammensetzung weist keine qualitativen Unterschiede zu den aus Blättern isolierten Alkanen (0,18 Prozent) auf.

**Abstract**—Alkanes have been isolated from chloroplast preparations and leaves of *Antirrhinum majus*. They were fractionated by the use of molecular sieves into normal and branched alkanes. The individual components have been identified as a series of long-chain normal and branched alkanes by the use of gas chromatography and mass spectrometry. All normal alkanes of a chain length of  $C_{16}$  to  $C_{35}$  were obtained. The chloroplast preparations contained 22 per cent *n*-heptacosane, 14 per cent *n*-nonacosane, 21 per cent *n*-hentriacontane and 21 per cent *n*-tritriacontane. In the leaves, *n*-hentriacontane (25 per cent) and *n*-tritriacontane (36 per cent) were the most predominant compounds. Branched alkanes from  $C_{25}$  to  $C_{35}$  were investigated in more detail. Compounds with odd numbers of carbon atoms were found to predominate. In the chloroplast preparations the branched alkanes consisted of nonacosane (19 per cent), hentriacontane (25 per cent) and tritriacontane (25 per cent). In the leaves the major components were nonacosane (14 per cent), hentriacontane (24 per cent) and tritriacontane (31 per cent). Surprisingly, both the 2-methyl- and 3-methyl isomers with the same number of carbon were found in equal amounts in the branched-chain alkanes studied in this work. However, no 3-methyl isomers of the 2-methyl-octacosane and 2-methyl-triacontane could be detected. 0.20 per cent alkanes were present in the chloroplast preparations and about 0.18 per cent alkanes in the leaves. No qualitative differences were found in the composition of alkanes from chloroplast preparations or leaves.

### EINLEITUNG

DIE in den Pflanzenblättern vorkommenden Alkane sind hauptsächlich in der Kutikula lokalisiert. Ein geringer Teil wurde aber auch im Blattinnern nachgewiesen.<sup>1</sup> Im Rahmen der Untersuchungen über Chloroplastenlipide konnten in Chloroplastenpräparaten, die in wässrigen Medien isoliert wurden, Alkane nachgewiesen werden. Über die Isolierung und

<sup>1</sup>P. E. KOLATTUKUDY, *Biochemistry* 4, 1844 (1965); *Biochemistry* 5, 2265 (1966); G. EGLINTON und R. J. HAMILTON, *Science* 156, 1322 (1967); G. EGLINTON und R. J. HAMILTON, *Science* 156, 1322 (1967).

Zusammensetzung der Alkane aus Chloroplastenpräparaten und Blättern von *Antirrhinum majus* soll in dieser Arbeit berichtet werden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Isolierung der Alkane

Die verwendeten Chloroplastenpräparate werden durch fraktioniertes Zentrifugieren und über Rohrzuckerdichtegradienten gewonnen. Mit Methanol und Äther werden aus diesen Präparaten die Lipide extrahiert.<sup>2</sup> Die ätherlöslichen Lipide trägt man auf eine Kieselsäuresäule auf und eluiert die Alkane mit *n*-Heptan/Äther (98:2). Sie betragen 0,8 Prozent der Chloroplastenlipide. Aus Blättern werden die Alkane analog in einer Ausbeute von 1,8 Prozent der Lipide extrahiert. Die weitere Auftrennung der Alkanfraktion in normale und verzweigte Kohlenwasserstoffe gelingt mit Molekularsieben. Die Alkane werden in iso-Octan gelöst und langsam auf eine evakuierte Molekularsiebsäule aufgetropft.<sup>3</sup> Im iso-Octan-Eluat erhält man auf diese Weise nur die verzweigten Kohlenwasserstoffe. Sie machen etwa 26 Prozent der gesamten Alkane bei Chloroplastenpräparaten und 21 Prozent bei Blättern aus. Die *n*-Alkane werden in den Molekularsieben festgehalten und können mit *n*-Pentan oder *n*-Heptan aus ihnen herausgewaschen werden. Die von diesen Fraktionen aufgenommenen i.r.-Spektren enthalten die Absorptions-banden von normalen der overzweigten Alkanen.<sup>4</sup> Eine Auftrennung über Harnstoffaddukte war wenig erfolgreich, da auch verzweigte Alkane Addukte bilden. Über die Molekularsiebe wurde dagegen eine nahezu quantitative Auftrennung in normale und verzweigte Alkane erreicht. Die Ausbeuten der aus Chloroplastenpräparaten und aus Blättern isolierten Alkane sind in Tabelle 1 aufgeführt.

TABELLE 1. ALKANGEHALT DER CHLOROPLASTENPRÄPARATE UND BLÄTTER VON *Antirrhinum majus*

	Chloroplasten		Blätter	
	g	%	g	%
Getrocknete Blätter			140,0	
Getr. Chloroplasten	22,7			
Lipide	6,167	27,2	13,9	9,9
Gesamte Alkane	0,046	0,20	0,253	0,18
Verzweigte Alkane	0,012	0,05	0,052	0,04
Normale Alkane	0,034	0,15	0,201	0,14

### *n*-Alkane

Gaschromatographisch läßt sich die aus den Molekularsieben desorbierte Alkanfraktion in eine homologe Reihe von langkettigen *n*-Alkanen der Kettenlänge C<sub>16</sub>–C<sub>35</sub> auftrennen. Sowohl bei den aus Chloroplastenpräparaten als auch bei den aus Blättern gewonnenen *n*-Alkanen überwiegen Kohlenwasserstoffe mit ungerader Kohlenstoffzahl. Einzelheiten sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Die den einzelnen Banden zugrunde liegenden *n*-Alkane

<sup>2</sup> W. KREUTZ und W. MENKE, *Z. Naturforsch.* 15b, 402 (1960).

<sup>3</sup> J. G. O'CONNOR und M. S. NORRIS, *Anal. Chem.* 32, 701 (1960).

<sup>4</sup> W. BRÜGEL, *Einführung in die Ultrarotspektroskopie*, Verlag Dr. Dietrich Steinkopf, Darmstadt (1962); L. J. BELLAMY, *Ultrarot-Spektren und chemische Konstitution*, Verlag Dr. Dietrich Steinkopf, Darmstadt (1955).

wurden eindeutig durch Vergleichssubstanzen und Massenspektren charakterisiert. Die bei Kohlenwasserstoffen durch Spaltung der C—C Bindungen auftretenden Bruchstücke der Formel  $C_nH_{2n+1}$  sind bei allen hier massenspektrometrisch untersuchten Alkanen von  $C_{25}$ — $C_{35}$  als Maxima beobachtet worden.<sup>5</sup> Das Molekulargewicht der einzelnen Alkane ergibt sich jeweils direkt aus  $m/e$  des Moleküliions  $M^+$ , dessen Intensität höher als die der benachbarten Bruchstücke liegt. Als Beispiel für die Massenspektren der  $n$ -Alkane ist in Abbildung 1a das Spektrum des  $n$ -Tritriacontan abgebildet.

TABELLE 2. PROZENTUALE ZUSAMMENSETZUNG DER NORMALEN UND VERZWEIGTEN ALKANE AUS CHLOROPLASTENPRÄPARATEN UND BLÄTTERN VON *Antirrhinum majus*

Kohlenstoffzahl (C)	Chloroplasten		Blätter	
	% $n$ -Alkane	% verz.-Alkane	% $n$ -Alkane	% verz.-Alkane
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	0,2	+	0,1	+
19	0,3	+	0,1	+
20	0,2	+	0,1	+
21	0,4	+	0,1	+
22	0,5	+	0,2	+
23	0,9	+	0,3	+
24	0,9	+	0,3	+
25	4,6	0,6	2,1	0,5
26	2,5	0,4	1,3	0,4
27	22	2,1	11	1,3
28	3,4	2,2	2,0	1,4
29	14	19	9,4	14
30	3,0	6,0	2,4	4,8
31	21	25	25	24
32	5,1	9,8	7,1	9,9
33	21	25	36	31
34	0,8	6,1	2,1	9,2
35	+	3,3	1,1	3,9

Die zugrunde liegenden Gaschromatogramme wurden mit einem Pye-Argon-Gaschromatographen auf einer 10% SE 30 Säule bei 230° aufgenommen. (+ = Spur)

In früheren Arbeiten von Chibnall<sup>6</sup> waren in Pflanzenwachsen aus Blättern einzelne Alkane ausschließlich mit ungerader Kettenlänge beschrieben worden. Der Einsatz der Gaschromatographie auf diesem Gebiet führte zu der Erkenntnis, daß in allen Pflanzenwachsen eine Reihe von homologen normalen Alkanen vorkommen, bei denen allerdings die Komponenten mit ungerader Kohlenstoffzahl überwiegen.<sup>7</sup> Die qualitative und quantitative Zusammensetzung ist jedoch bei jeder Pflanzenart verschieden. Bei Blättern von *Antirrhinum majus* z. B. kommen  $n$ -Alkane der Kettenlänge  $C_{16}$ — $C_{35}$  vor. Mit etwa

<sup>5</sup> R. RHYHAGE und E. STENHAGEN, *J. Lipid Res.* 1, 361 (1960); G. SPITELLER, *Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen*, Verlag Chemie (1966).

<sup>6</sup> A. C. CHIBNALL, ST. H. PIPER, A. POLLARD, E. F. WILLIAMS und P. N. SAHAI, *Biochem. J.* 28, 2189 (1934).

<sup>7</sup> J. D. WALDRON, D. S. GOWERS, A. C. CHIBNALL und ST. H. PIPER, *Biochem. J.* 78, 435 (1961); Z. H. KRANZ, J. A. LAMBERTON, K. E. MURRAY und A. H. REDCLIFFE, *Australian J. Chem.* 13, 498 (1960); 14, 264 (1961); G. EGLINTON, R. J. HAMILTON, R. A. RAPHAEL und A. G. GONZALES, *Nature* 193, 739 (1962); R. O. WEENIK, *Biochem. J.* 82, 523 (1962); J. ORÓ, D. W. NOONER und S. A. WIKSTRÖM, *Science* 147, 870 (1965); B. NAGY, V. MODZELESKI und SISTER M. T. J. MURPHY, *Phytochem.* 4, 945 (1965).

gleichen Anteilen von ca. 20 Prozent sind die *n*-Alkane  $C_{27}$ ,  $C_{31}$  und  $C_{33}$  gefunden worden. Spinatblätter<sup>8</sup> enthalten *n*-Alkane von  $C_{16}$ – $C_{33}$  mit 60 Prozent *n*-Hentriacontan. In Tabakblättern<sup>9–11</sup> sind *n*-Alkane der Kettenlänge  $C_{25}$ – $C_{34}$  nachgewiesen worden, *n*-Hentriacontan

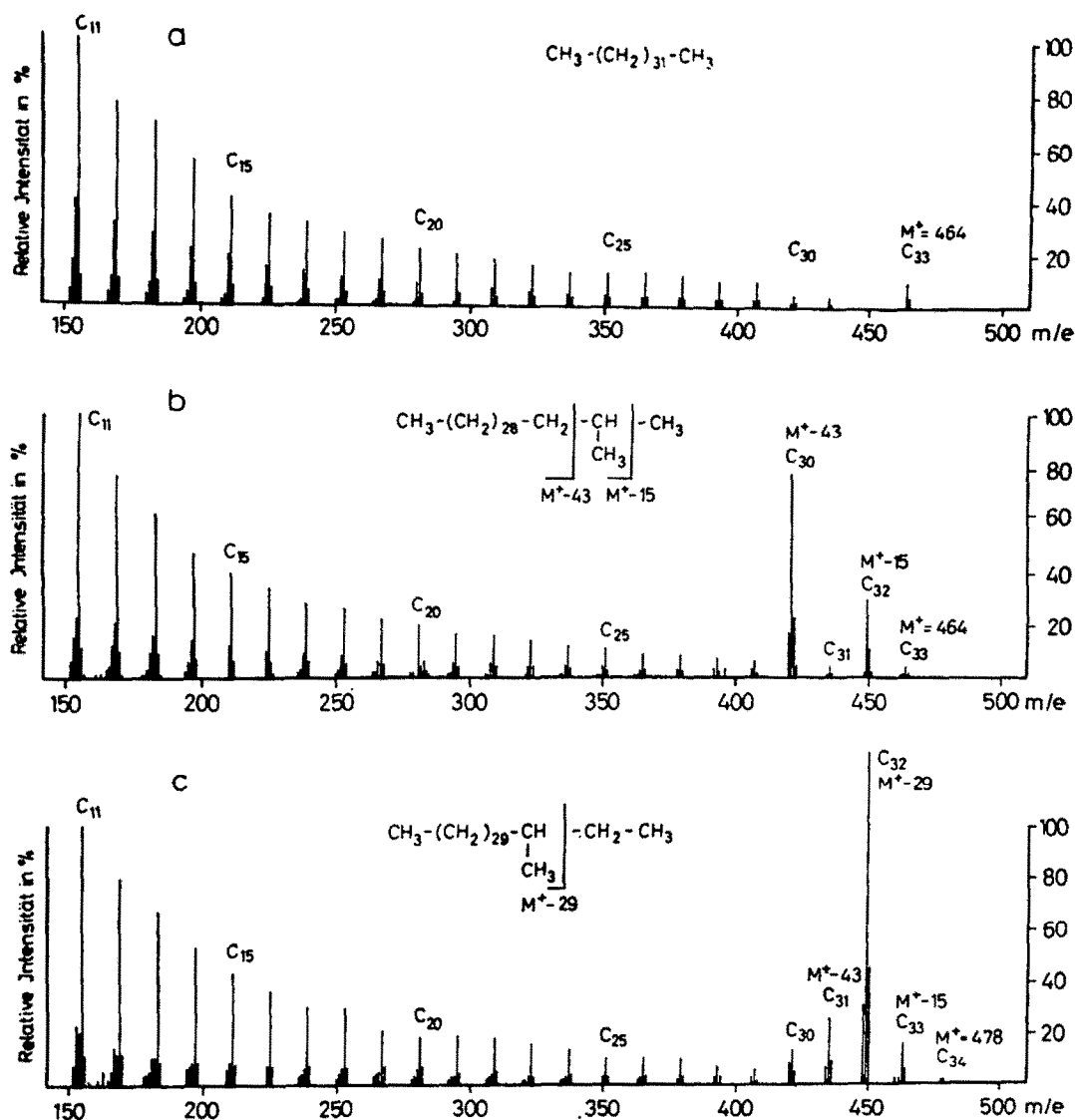


ABB. 1. MASSENSPEKTREN DES (a) *n*-TRITRIACONTAN, (b) 2-METHYL-DOTRIACONTAN UND (c) 3-METHYL-TRITRIACONTAN AUS CHLOROPLASTENPRÄPARATEN VON *Antirrhinum majus*.

Die relativen Intensitäten der Massenzahlen sind bezogen auf  $m/e$  155=100%. Die Spektren wurden mit einem LKB-9000-Gaschromatograph-Massenspektrometer aufgenommen.

<sup>8</sup> P.-G. GÜLZ, unveröffentlicht.

<sup>9</sup> W. CARRUTHERS und R. A. W. JOHNSTONE, *Nature* **184**, 1131 (1959).

<sup>10</sup> A. J. KOSAK und J. S. SWINEHART, *J. Org. Chem.* **25**, 222 (1960).

<sup>11</sup> J. D. MOLD, R. K. STEVENS, R. E. MEANS und J. M. RUTH, *Biochemistry* **2**, 605 (1963).

beträgt dort *ca.* 50 Prozent und *n*-Tritriacontan *ca.* 20 Prozent der *n*-Alkane. Die Zusammensetzung der Alkane variiert weiterhin mit dem Entwicklungsstadium und den Anzuchtbedingungen der Pflanzen.

### *Verzweigte Alkane*

Das Gaschromatogramm der verzweigten Kohlenwasserstoffe aus Chloroplastenpräparaten und Blättern weist wie die *n*-Alkane eine Reihe von langkettigen Alkanen der Kettenlänge  $C_{25}$ – $C_{35}$  auf. Die verzweigten Alkane mit einer Kettenlänge von  $C_{16}$ – $C_{24}$  sind nur in Spuren vorhanden. Vorherrschend sind wieder Alkane mit ungerader Kohlenstoffzahl. In Chloroplastenpräparaten sind Nonacosan mit 19 Prozent, Hentriacontan mit 25 Prozent und Tritriacontan mit 25 Prozent anzutreffen. Auch in den Blättern überwiegen diese ungeradzahlig verzweigten Alkane. Einzelheiten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Mit Hilfe des LKB-9000 Gaschromatograph-Massenspektrometers war es möglich, die im Gemisch vorliegenden verzweigten Alkane näher zu charakterisieren.<sup>5</sup> Wie bei den *n*-Alkanen sind die durch Spaltung der C–C Bindungen auftretenden Bruchstücke der Formel  $C_nH_{2n+1}$  als Maxima anzutreffen. Die Intensität dieser Massenionen nimmt ebenfalls mit zunehmender Massenzahl ab und das Molekulargewicht ergibt sich aus dem Molekülion, dessen Intensität jedoch gegenüber den *n*-Alkanen herabgesetzt ist. Aufschluß über die Art der Verzweigung ist durch das Auftreten von stabilisierten sekundären und tertiären Ionen zu erhalten, die sich durch einen Anstieg in der Intensität der entsprechenden Bruchstückbanden hervorheben (Abb. 1b und 1c). Am Beispiel des Massenspektrums in Abb. 1b ist die Intensität der Bruchstücke  $M^+-15$  und  $M^+-43$  gegenüber dem Massenspektrum des *n*-Tritriacontan sehr stark angestiegen. Sie entspricht einer Abspaltung der Methyl- und Isopropylgruppe. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich bei dem Massenspektrum der Abb. 1b um ein 2-Methyl-dotriacontan handelt. Bei dem Massenspektrum der Abb. 1c ist die Intensität des Bruchstückes  $M^+-29$  sehr stark angestiegen. Dies weist auf eine bevorzugte Abspaltung einer Äthylgruppe hin. Dem Massenspektrum der Abb. 1c liegt demnach ein 3-Methyl-tritriacontan zugrunde.

Nicht alle Methyl-Isomere der gleichen Kohlenstoffzahl konnten gaschromatographisch voneinander getrennt werden. Wie in Abb. 2a und 2b erhält man dann Massenspektren, bei denen sowohl die Massenzahlen  $M^+-15$  und  $M^+-43$  als auch  $M^+-29$  durch eine hohe Intensität auffallen. Diesen Spektren liegt ein Gemisch von 2-Methyl- und 3-Methylverzweigten Alkanen der gleichen Kettenlänge zugrunde. Das Massenspektrum in Abb. 2a zeigt ein Gemisch von 2-Methyl-dotriacontan und 3-Methyl-dotriacontan sowie in Abb. 2b ein Gemisch von 2-Methyl-tritriacontan und 3-Methyl-tritriacontan. Das Vorkommen weiterer 2-Methyl- und 3-Methyl-Alkane in Chloroplastenpräparaten und Blättern von *A. majus* ist der Tabelle 3 und 4 zu entnehmen.

Die Massenspektren wurden bei Alkanen der Kettenlänge  $C_{25}$ – $C_{32}$  jeweils bei der Bandenspitze der Gaschromatogramme aufgenommen. Bei den Alkanen der Kettenlänge  $C_{32}$ – $C_{35}$  trat eine Aufspaltung der gaschromatographischen Banden auf. Die entsprechenden Massenspektren wurden daher sowohl von dem äußeren aufsteigenden als auch absteigenden Teil der Doppelbande aufgenommen. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten kann gesagt werden, daß in den verzweigten Alkanfraktionen aus Chloroplastenpräparaten wie auch aus Blättern von *A. majus* 2-Methyl- und 3-Methyl-Alkane der Kettenlänge  $C_{25}$  bis  $C_{35}$  vorkommen. Eine Ausnahme bilden Alkane der Kettenlänge  $C_{29}$  und  $C_{31}$ , bei denen nur die 2-Methyl-Verzweigung nachgewiesen werden konnte. Das 2-Methyl-Isomere überwiegt auch bei  $C_{25}$  und  $C_{27}$ , während  $C_{28}$ ,  $C_{30}$ ,  $C_{32}$ ,  $C_{33}$ ,  $C_{34}$  und  $C_{35}$  in etwa gleicher Konzentration

als 2-Methyl- und 3-Methyl-Alkane anzutreffen sind. Das Vorhandensein von anderen Verzweigungsstellen wurde nicht beobachtet.

Neben normalen Alkanen wurden erst 1959 verzweigte Alkane in Blättern nachgewiesen.<sup>9</sup> Sie betragen sogar 30–46 Prozent der gesamten Alkane bei Tabakblättern.<sup>9–11</sup> Im Vergleich dazu ergeben die hier beschriebenen Untersuchungen an *A. majus* Blättern 21 Prozent verzweigte Alkane. Weiterhin ergaben die Arbeiten über Tabakblätter, daß 2-Methyl-Verzweigungen bei Alkanen mit ungerader Kohlenstoffzahl und 3-Methyl-Verzweigungen bei Alkanen mit gerader Kohlenstoffzahl anzutreffen sind.<sup>11</sup> Die Untersuchungen an *A. majus* bestätigen

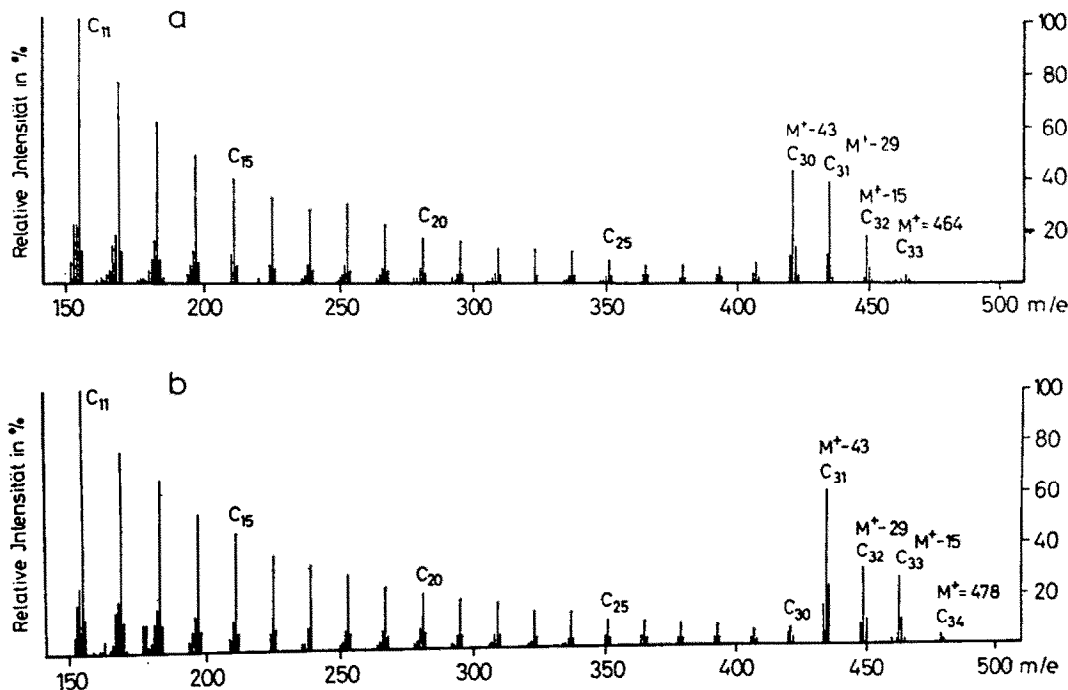


ABB. 2. MASSENSPEKTRUM VON (a) 2-METHYL-DOTRIACONTAN UND 3-METHYL-DOTRIACONTAN, (b) 2-METHYL-TRITRIACONTAN UND 3-METHYL-TRITRIACONTAN AUS CHLOROPLASTENPRÄPARATEN VON *Antirrhinum majus*.

Die relativen Intensitäten sind bezogen auf  $m/e$  155=100%. Die Spektren wurden mit einem LKB-9000-Gaschromatograph-Massenspektrometer aufgenommen.

diese strenge Unterteilung nicht. Bei den Alkanen aus Chloroplastenpräparaten und Blättern sind vielmehr 2-Methyl- und 3-Methyl-Verzweigungen bei fast jeder Kettenlänge nachzuweisen. Andere oder mehrfache Verzweigungen<sup>12</sup> sind bei den hier beschriebenen Alkangemischen nicht beobachtet worden.

Die Untersuchungen von Kolattukudy<sup>1</sup> zur Biosynthese von Alkanen bei *Brassica oleracea* unter Verwendung von markiertem Acetat und Palmitat ergaben, daß nach Entfernung der Kutikulawachse ein Teil der Alkane im Blattinnern zu lokalisieren ist. Bereits Zill und Harmon<sup>13</sup> erwähnen Kohlenwasserstoffe in Chloroplastenlipiden, sehen sie jedoch als

<sup>12</sup> P. JAROLIMEK, V. WOLLRAB, M. STREIBL und F. ŠORM, *Chem. & Ind.* 237 (1964); V. WOLLRAB, M. STREIBL und F. ŠORM, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* 30, 1670 (1965).

<sup>13</sup> L. P. ZILL und E. A. HARMON, *Biochim. Biophys. Acta* 57, 573 (1962).

TABELLE 3. DIE INTENSITÄTEN DER MASSENZAHLEN  $M^{+15}$ ,  $M^{+29}$  UND  $M^{+43}$  BEZOGEN AUF  $m/e$  155 = 100% ALS NACHWEIS FÜR 2-METHYL- UND 3-METHYL-ALKANE

Massenspektrum (Nr.)	Kohlen- stoffzahl (C)	Molekular- gewicht ( $M^{+}$ )	Intensität der Massenzahlen		
			$M^{+15}$	$M^{+29}$	$M^{+43}$
1	25	352	25	36	53
	26	366			
2	27	380	35	14	96
3	28	394	36	58	30
4	29	408	55	5	127
5	30	422	31	78	65
6	31	436	47	4	106
7	32	450	27	45	58
8	33	464	30	4	78
9	33	464	18	40	43
10	34	478	26	31	60
11	34	478	16	128	26
12	35	492	26	5	66
13	35	492	23	19	56

Die Massenspektren wurden mit einem LKB-Gaschromatograph-Massenspektrometer von verzweigten Alkanen aus Chloroplastenpräparaten von *Antirrhinum majus* aufgenommen.

TABELLE 4. DIE INTENSITÄTEN DER MASSENZAHLEN  $M^{+15}$ ,  $M^{+29}$  UND  $M^{+43}$  BEZOGEN AUF  $m/e$  155 = 100% ALS NACHWEIS FÜR DAS VORLIEGEN VON 2-METHYL- UND 3-METHYL-ALKANEN

Massenspektrum (Nr.)	Kohlen- stoffzahl (C)	Molekular- gewicht ( $M^{+}$ )	Intensität der Massenzahlen		
			$M^{+15}$	$M^{+29}$	$M^{+43}$
1	25	352	41	12	101
	26	366			
2	27	380	45	10	112
3	28	394	49	44	121
4	29	408	57	4	153
5	30	422	40	53	96
6	31	436	38	3	91
7	32	450	39	34	91
8	32	450	18	124	28
9	33	464	36	4	87
10	33	464	23	33	51
11	34	478	25	53	58
12	34	478	12	143	15
13	35	492	27	10	71
14	35	492	18	52	49
	<i>n</i> -33	464	0	4	5

Die Massenspektren wurden mit einem LKB-9000-Gaschromatograph-Massenspektrometer von verzweigten Alkanen aus Blättern von *Antirrhinum majus* aufgenommen.

Verunreinigung an, die von anhaftenden Kutikulawachsen herrühren soll. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode zur Isolierung der Chloroplasten machen eine Verunreinigung durch anhaftende Wachse unwahrscheinlich. Diese Aufarbeitung führt zu Präparaten, die praktisch ausschließlich aus Lamellarsystemen bestehen.<sup>14</sup>

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Blätter von *Antirrhinum majus* der Sippe 50 dienten als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Alkanfraktionen aus Chloroplastenpräparaten und Blättern. Die Antirrhinumpflanzen wurden im Freiland gezogen und in den Monaten Juni–Juli nach dem Erblühen geerntet. Ein Teil der Blätter wurde gefriergetrocknet und aus ihm die Blattlipide extrahiert. Ein weiterer Teil diente zur Isolierung der Chloroplastenpräparate. Sie wurden durch fraktioniertes Zentrifugieren von den anderen Zellbestandteilen getrennt, zur weiteren Reinigung über Rohrzuckerdichtegradienten isoliert und anschließend zweimal mit kaltem destilliertem Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.<sup>2</sup> Am Beispiel der Chloroplastenpräparate sollen die folgenden Isolierungsschritte näher beschrieben werden.

##### Isolierung der Lipide

3,3 g gefriergetrocknete Chloroplasten extrahiert man mit etwa 1000 ml Methanol bis zur Farblosigkeit des Filtrats und anschließend mit 300 ml Äther. Die vereinigten Lipidlösungen werden in Vakuum eingedunstet, in Äther aufgenommen und durch eine Glasfritte G 3 filtriert. Die erneut im Vakuum eingedunstete Lipidlösung wird im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 0,94 g = 28,6 Prozent der Chloroplasten.

##### Isolierung der Alkanfraktion

6,127 g ätherlösliche Lipide werden mit Kieselsäure in einigen ml Heptan angerührt und auf eine Kieselsäuresäule mit 4 cm Durchmesser und 15 cm Länge aufgetragen. Die Kieselsäure nach Mallinckrodt aktiviert man bei 110°. Zur Extraktion der Alkane benötigt man 500 ml *n*-Heptan sowie 400 ml *n*-Heptan/Äther (98:2). Ausbeute: 0,046 g = 0,2 Prozent der Chloroplasten.

##### Auftrennung in normale und verzweigte Alkane 80 g

80 g Linde Molekularsiebe Typ 5 A als  $\frac{1}{8}$  in Stäbchen werden 6 Stunden bei 450° aktiviert, anschließend im Vakuum auf Zimmertemperatur abgekühlt und in eine Säule mit 2 cm Durchmesser und 30 cm Länge eingefüllt.<sup>3</sup> Diese Säule wird evakuiert und die in einigen ml iso-Octan gelösten Alkane (46 mg) tropft man auf die Säule und läßt sie über Nacht einwirken. Anschließend eluiert man mit 200 ml iso-Octan, engt das Eluat ein und gibt es erneut auf die Molekularsiebe. Mit iso-Octan eluiert man nur verzweigte Alkane. Ausbeute an verzweigten Alkanen: 12 mg = 26 Prozent des gesamten Alkangemisches.

Die in den Molekularsieben adsorbierten *n*-Alkane können durch intensive Extraktion über mehrere Tage mit *n*-Pentan und *n*-Heptan zurückgewonnen werden. Von den einzelnen Alkanfraktionen werden i.r.-Spektren aufgenommen. Die Alkane werden als Film auf NaCl aufgezogen. Gerät: Perkin-Elmer Infracord 137.

##### Identifizierung der einzelnen Alkane

Die gaschromatographische Trennung der Alkanfraktion erfolgte mit einem Pye-Argon-Gaschromatographen. Länge der Glassäule: 4 ft; Säulenfüllung: (a) 10 Prozent SE 30 auf Chromosorb 100–120 mesh, Säulentemperatur 230°, Gasdurchflußgeschwindigkeit 120 ml/min, Verdampfertemperatur 310°. Die mit dieser Säule erhaltenen Chromatogramme wurden zur quantitativen Bestimmung herangezogen. Die in Tabelle 2 angegebenen Prozentsätze sind die Mittelwerte aus je zwei parallelen Aufarbeitungen. (b) 10 Prozent SE 301 auf Celite,<sup>15</sup> Säulentemperatur 230°, Verdampfertemperatur 306°, Gasdurchflußgeschwindigkeit 150 ml/min. (c) 7 Prozent Apiezon L (leichtflüchtige Anteile bei 350° absublimiert)<sup>16</sup> auf Gaschrom P 100–120 mesh, Säulentemperatur 230°, Verdampfertemperatur 306°, Gasdurchflußgeschwindigkeit 120 ml/min. Zur Identifizierung wurden reine *n*-Alkane der Kettenlänge C<sub>16</sub>–C<sub>32</sub> herangezogen.

Die Aufnahme der Massenspektren wurde mit einem LKB-9000-Gaschromatograph-Massenspektrometer durchgeführt. Die Säule des Gaschromatographen war 2,7 m lang, mit 5 Prozent SE 30 beladen, Säulentemperatur 250°, Gasdurchflußgeschwindigkeit 30 ml He/min. Von den gaschromatographisch aufgetrennten Alkanen wurden die Massenspektren bei einer Elektronenenergie von 70 eV und einer Beschleunigungsspannung von 2,5 kV aufgenommen.

<sup>14</sup> H. NICKEL, Dissertation, Köln (1967).

<sup>15</sup> D. T. DOWNING, Z. H. KRANZ und K. E. MURRAY, *Australian J. Chem.* **13**, 80 (1960).

<sup>16</sup> V. WOLLRAB, M. STREIBL und F. ŠORM, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* **28**, 1904 (1963).



*Dank*—Herrn Dr. A. Linnarson bin ich für die Aufnahmen der Massenspektren mit dem LKB-9000-Gaschromatograph-Massenspektrometer in dem Versuchslaboratorium der Firma LKB, Stockholm, zu großem Dank verpflichtet. Authentische *n*-Alkane der Kettenlänge  $C_{16}$ – $C_{32}$  stellte freundlicherweise Herr Prof. Dr. Korte, Bonn, zur Verfügung. Herrn Prof. Dr. W. Menke danke ich für anregende Hinweise und Diskussion der Ergebnisse. Frä. Ulrika Lempert sei für ihre wertvolle Mitarbeit bei der Ausführung der Versuche gedankt. Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.