

## Inhaltstoffe der Frauenmilch, VI

Nicht methylenunterbrochene *cis,cis*-Octadecadiensäuren

Minor Constituents of Human Milk, VI

Non Methylene Interrupted *cis,cis*-Octadecadienoic Acids

Uwe Murawski, Heinz Egge, Paul György \* und Fritz Zilliken

Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn

(Z. Naturforsch. 29 c, 1–8 [1974]; eingegangen am 5. Juli 1973)

Human Milk, Octadecadienoic Acids, Hydroxylation, Trimethylsilylation

The non methylene interrupted *cis,cis*-octadecadienoic acids from human milk fat were prepared by thin layer chromatography on  $\text{AgNO}_3$  impregnated silicagel plates. The position of double bonds was determined by hydroxylation of the double bonds with  $\text{OsO}_4$  followed by silylation. The corresponding O-trimethylsilylether derivatives of the fatty acid methyl esters were analyzed by gaschromatography mass spectrometry. 14 isomers of the following series could be identified:  $\text{C}_{18:2} \Delta 9.(12.13.14.15.16.17)$ ;  $\text{C}_{18:2} \Delta(6.7.8.9).12$ ;  $\text{C}_{18:2} \Delta(10.11.12.).15 (\Delta 8.15)$ ;  $\text{C}_{18:2} \Delta 5.9$ ;  $\Delta 6.10$ ;  $\Delta 10.14$ ;  $(\Delta 12.16)$ . Possible biosynthetic pathways are discussed.

In natürlich vorkommenden Dien- und Polyenfettsäuren sind die Doppelbindungen normalerweise im Divinylmethanrhythmus angeordnet<sup>1</sup>. Daneben kommen in Frauenmilch, wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, auch isomere Monoen- und Dienfettsäuren vor<sup>2</sup>. Nach den massenspektrometrischen Untersuchungen an Derivaten synthetischer isomerer Octadecadiensäuren<sup>3</sup> stellten wir fest, daß die Anordnung der Doppelbindungen in den isomeren Octadecadiensäuren in Frauenmilch nicht ausschließlich dem Divinylmethanrhythmus gehorcht<sup>4, 5</sup>. Nicht methylenunterbrochene Octadecadiensäuren aus Fungi, Bakterien, Pflanzen und Säugern sind bereits beschrieben worden<sup>6–13</sup>. Über die physiologische Bedeutung dieser positionsisomeren Fettsäuren ist noch nichts bekannt. Einige Forschungsergebnisse der letzten Zeit an künstlichen und natürlichen Membranen lassen jedoch darauf schließen, daß die Lage der Doppelbindungen in den Lipiden einen Einfluß auf physikalische Parameter und damit auch auf die physiologischen Eigenschaften von biologischen Membranen hat<sup>14, 15</sup>. Die Lage der Doppelbindungen in Monoenfettsäuren ist von Bedeutung für die weitere Desaturierung<sup>16</sup>, und sie hat einen Einfluß auf die Hydrolyse von Triglyceriden durch Pankreas Lipase<sup>17</sup>.

## Methodik

Die Präparation von Frauenmilchfett und die Anreicherung der ungesättigten Fettsäuren als Methylester durch Harnstofffraktionierung wurde bereits beschrieben<sup>18, 19</sup>. Die  $\text{C}_{18}$ -Fettsäuremethylester wurden durch präparative Gaschromatographie abgetrennt. Mengen von je 50 mg Fettsäuremethylester wurden direkt auf eine Glassäule 2 m × 15 mm I.D. mit 15% SE 30 auf Chromosorb Q injiziert. Gerät: Carlo Erba GV; Trägergas  $\text{N}_2$  150 ml/min; Temperatur: Ofen 200 °C isotherm, Verdampferblock 280 °C, Detektor FID 280 °C, Auslaß 230 °C.

Die getrennten Komponenten wurden über einen fest eingestellten Split 1:50 in U-förmige Glasrohre, gefüllt mit Glaswolle und Methylenchlorid, unter  $\text{N}_2$  gesammelt. Für die  $\text{C}_{18}$ -Fettsäuremethylester betrug die Wiederfindungsrate ca. 90%.

Die Trennung nach Zahl und Lage der Doppelbindungen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten, die mit 35% Silbernitrat imprägniert waren<sup>11, 20, 21</sup>. Herstellung der Silbernitratplatten: 14 g  $\text{AgNO}_3$  werden in 72 ml Aqua dest. gelöst. Dazu werden langsam unter Rühren 40 g Kieselgel (Machery + Nagel, G-HR + 5% Gips) gegeben und gerührt, bis ein homogener Brei entstanden ist. Sofort mit einem Streichgerät aus Kunststoff (Schichtdicke 1 mm) auf eine fettfreie Platte 20 × 40 cm auftragen. Die Platten werden 1/2 Stunde bei 110 °C aktiviert und in einer Trockenbox aufbewahrt. Nach zweimaligem Entwickeln mit Benzol als Laufmittel in der Längsrichtung wird das rechts und links der Probe aufgesetzte Test-

Sonderdruckanforderungen an Professor Dr. H. Egge,  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, D-5300 Bonn,  
Nußallee 11.

\* Philadelphia General Hospital, Philadelphia, USA



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht:  
Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

gemisch mit Dichlorfluorescein (0,1-prozentige methanolische Lösung) besprüht und die Fraktionen unter UV-Beleuchtung markiert. Die getrennten Fettsäuremethylester wurden abgekratzt, mit Dichlormethan extrahiert und im Hochvakuum destilliert. Die Fraktionen der *cis,cis*-nichtmethyleneunterbrochenen Fettsäuremethylester wurden mit  $\text{OsO}_4$  hydroxyliert<sup>22</sup>, mit MSTFA (Macherey + Nagel, Düren) in ihre Tetra-O-triphenylsilyl-Äther überführt und gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht (LKB 9000). Die gaschromatographischen Bedingungen werden in den Legenden zu den Abbildungen angegeben. Massenspektrometrische Bedingungen: Temperatur der Ionenquelle  $250\text{ }^\circ\text{C}$ ; Ionisierungsenergie 20 eV; Fallstrom  $60\text{ }\mu\text{A}$ ; Beschleunigungsspannung 3,5 KV; Magnetscan etwa 10 sec im Massenbereich  $m/e = 10 - 700$ . Die Registrierung der Gaschromatogramme erfolgte über den Totalionenstrom.

## Ergebnisse und Diskussion

Durch Dünnschichtchromatographie wurden die Fettsäuremethylester in vier Fraktionen aufgetrennt, wie in Abb. 1 wiedergegeben.

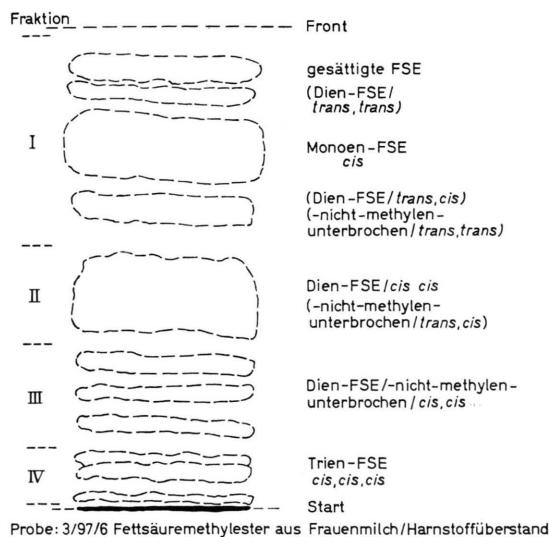


Abb. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung der Fettsäuremethylester auf mit Silbernitrat imprägniertem Kieselgel. Laufmittel: Benzol.

Die erhaltenen Estergemische wurden auf Kapillarsäule (DEGA S.C.O.T.) untersucht. Fraktion I enthält die Octadecan- und Octadecensäuremethylester, Fraktion II enthält als Hauptmenge Linolsäuremethylester, während Fraktion III und IV Estergemische von isomeren Dien- und Triensäuremethylestern sind. Das Gaschromatogramm der Fraktion IV ist in Abb. 2 wiedergegeben.

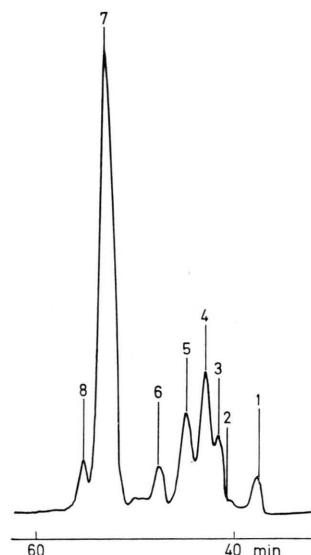


Abb. 2. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester von Fraktion IV. Peak 1, nicht identifiziert; Peak 2–6, isomere Octadecadiensäuremethylester; Peak 7, Octadecatriensäuremethylester; Peak 8, Octadecatrien- und Octadecatetraensäuremethylester. Gaschromatographische Bedingungen: Gerät: LKB 9000; Säule 100 Fuß  $\times$  0,02 inches S.C.O.T. (Perkin Elmer); Phase: Diäthylenglycoladipat (DEGA); Trägergas: He; Flow: etwa 4 ml/min; Temperatur: Ofen  $170\text{ }^\circ\text{C}$ ; Injektionsblock  $290\text{ }^\circ\text{C}$ ; Separator  $280\text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Massenspektren der Peaks Nr. 2, 3, 4, 5 und 6 zeigen einen Molekülpeak vom  $m/e = 294$  und andere für Octadecadiensäuremethylester charakteristische Fragmente. Peak Nr. 7 wird durch einen Oktadecatriensäuremethylester hervorgerufen, während Peak Nr. 8 zwei Molekülpeaks, nämlich  $m/e = 292$  und  $m/e = 290$ , zeigt, so daß es sich hier um ein Mischspektrum von Octadecatrien- und Octadecatetraensäuremethylester handelt. IR-spektrometrisch war im Harnstoffüberstand der Frauenmilchfettsäuremethylester keine „*trans*-Bande“ nachweisbar ( $958\text{ cm}^{-1}$ , gemessen als Film auf NaCl-Platte), ebensowenig wie in Fraktion IV. Fraktion III enthält nach der Intensität der „*trans*-Bande“ etwa 5% *trans*-Doppelbindungen. Da *cis,trans*-Octadecadiensäuremethylester aufgrund ihres höheren  $R_f$ -Wertes in Fraktion II zu finden wären, muß dieser *trans*-Gehalt von einem *cis,cis,trans*- (oder *cis,trans,cis*- oder *trans,cis,cis*-) Octadecatriensäuremethylester oder von dem noch später zu beschreibenden Oxydationsprodukt des Linolsäuremethylesters, einem 9-Hydroperoxy-10-*trans*, 12-*cis*-Octadecadiensäure-

methylester oder dem entsprechenden 9-cis,11-trans,13-Hydroperoxy-Octadecadiensäuremethylester hervorgerufen werden. Obwohl in Fraktion III und IV gaschromatographisch trennbare Octadecadiensäuremethylester vorhanden waren, war es nicht möglich aus den Retentionszeiten und den Massenspektren die Lage der Doppelbindungen zu bestimmen<sup>23</sup>. Dies gelang erst nach Überführung der Ester in die entsprechenden Polyhydroxy-O-TMS-Verbindungen. Die Abb. 3 zeigt die gaschromatographische Trennung der derivatisierten Methylester aus Fraktion I. Die identifizierten Komponenten sind in Tab. I aufgeführt.

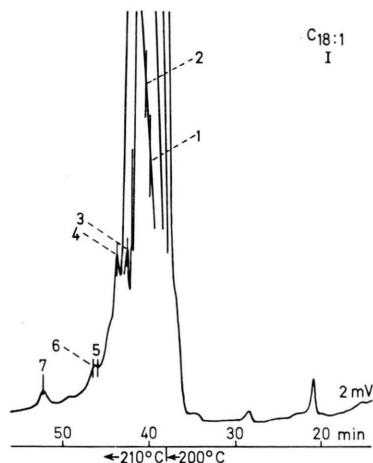


Abb. 3. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Fraktion I nach Derivatisierung. Die mit Nummern gekennzeichneten Peaks sind in Tab. I aufgeführt. Gaschromatographische Bedingungen: Gerät: LKB 9000; Säule: 50 Fuß × 0,02 inches S.C.O.T. (Perkin Elmer); Phase: Silicongummi SE 30; Trägergas: He; Flow: etwa 4 ml/min; Temperatur: Ofen-Stufenprogramm 200–230 °C, Injektionsblock 290 °C, Separator 280 °C.

Tab. I. Massenspektrometrisch identifizierte Komponenten aus Fraktion I. (Die Hauptbestandteile sind *kursiv* gesetzt.)

Peak Nr. (Abb. 3)	Komponenten
1	9.10-Di-OTMS-Octadecansäure-
2	9.10-Di-OTMS-Octadecansäure-
3 Mischspektrum	10.11-, 11.12-, 12.13-, 13.14-Di-OTMS-Octadecansäure-
4 Mischspektrum	10.11-, 11.12-, 12.13-, 13.14-Di-OTMS-Octadecansäure-
5 Mischspektrum	13.14-, 14.15-Di-OTMS-Octadecansäure-
6 Mischspektrum	14.15-Di-OTMS-Octadecansäure-methylester + nicht identifizierte Komponente

Auffallend ist, daß bei den Octadecensäuren aus Frauenmilch über die OTMS-Derivate keine Doppelbindung zwischen C-9 und dem Carboxylende gefunden werden konnte, im Gegensatz zu den Ergebnissen der van Rudloff-Spaltung<sup>2</sup>.

Die methylenunterbrochenen Octadecadiensäuremethylester können ebenfalls gaschromatographisch als Tetra-O-trimethylsilyläther getrennt werden, wie das Gaschromatogramm der Fraktion II zeigt.

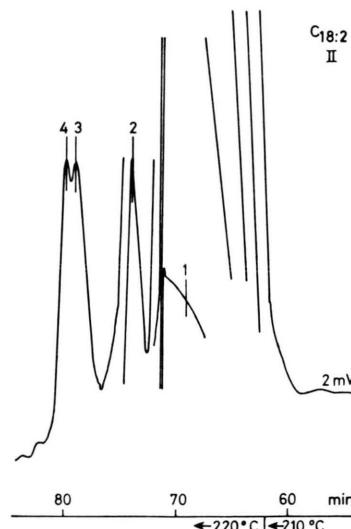


Abb. 4. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Fraktion II nach Derivatisierung. Die mit Nummern gekennzeichneten Peaks sind in Tab. II aufgeführt. GC-Bedingungen wie in Legende zu Abb. 3.

Tab. II. Massenspektrometrisch identifizierte Komponenten aus Fraktion II.

Peak Nr. (nach Abb. 4)	Komponente
1	9.10.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
2	9.10.12.13, 10.11.13.14-, 11.12.14.15-, 12.13.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
3	9.10.12.13-9.10.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-, + unidentifizierte Komponente
4	9.10.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-methylester, + unidentifizierte Komponente

Da die Abstände der Glycolgruppen in den C-Ketten alle gleich sind, haben die Isomeren sehr ähnliche Retentionszeiten. Das Trennproblem wird weiterhin erschwert durch den großen Anteil an 9.10.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylester. Zum Nachweis der Isomeren muß die Säule mit der

Hauptkomponente stark überlastet werden, was die Auswertung der Massenspektren erschwert. Zwei Faktoren beeinflussen die Retentionszeit: 1. Die Entfernung der TMS-Glycolgruppen voneinander und 2. der Abstand der ersten TMS-Glycolgruppe von der Carboxylgruppe. Die Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylester laufen um so langsamer, je weiter die TMS-Glycolgruppen auseinander liegen, d.h. das Tetra-OTMS-Derivat der  $C_{18:2} \Delta 9.17$  hat eine längere Retentionszeit als das der  $C_{18:2} \Delta 9.16$  oder  $C_{18:2} \Delta 9.15$  usw. Bei gleichem Abstand der TMS-Glycolgruppen voneinander wirkt ein kürzerer Abstand der ersten OTMS-Gruppe von der Carboxyl-estergruppe beschleunigend. Dadurch kommt es bei komplexen Isomerengemischen zu Überschneidungen, wie es auch bei der gaschromatographischen Analyse von isomeren Octadecadiensäuremethylestern ohne Derivatisierung beschrieben wird<sup>24</sup>. Günstigere Trennverhältnisse liegen bei den nicht methylenunterbrochenen Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylestern vor, wie Abb. 5 zeigt.

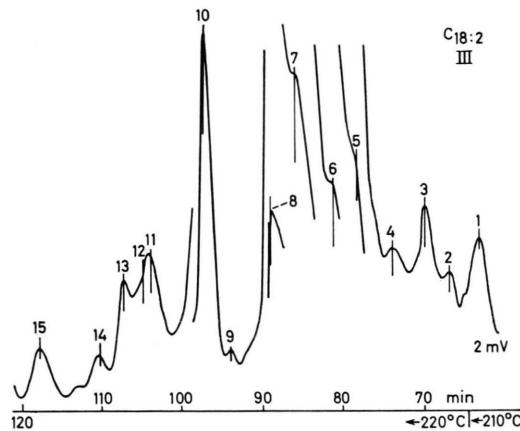


Abb. 5. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Fraktion III nach Derivatisierung. Die mit Nummern gekennzeichneten Peaks sind in Tab. III aufgeführt. GC-Bedingungen wie in Legende zu Abb. 3.

Da durch die große Menge an 9.10.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylester die Säule überlastet war, wurde die Probe erneut 1:50 verdünnt analysiert, wobei nur die Hauptkomponenten auftreten.

Bei Peak Nr. 6 zeigt das Massenspektrum, daß es sich offenbar um das Autoxidationsprodukt von  $C_{18:2} \Delta 9.12$  handelt, wobei entweder an C-9 oder an C-13 eine Oxidation unter Verschiebung einer Doppelbindung nach C-10.11 oder nach C-12.11 erfolgte. Die nachfolgende Oxidation mit  $OsO_4$  ergab einen

Tab. III. Massenspektrometrisch identifizierte Komponenten aus Fraktion III.

Peak Nr. (nach Abb. 5)	Komponente
1	nicht identifiziert
2	nicht identifiziert
3	nicht identifiziert
4	5.6.9.10-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
5	6.7.10.11-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
6	8.9.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
7	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
8	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
9	8.9.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
10	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
11	9.10.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
12	10.11.14.15-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
13	11.12.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
14 (Mischspektrum)	9.10.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
15 (Mischspektrum)	8.9.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.11.12.13-Penta-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.16.17-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylester
	+ nicht identifizierte Komponente

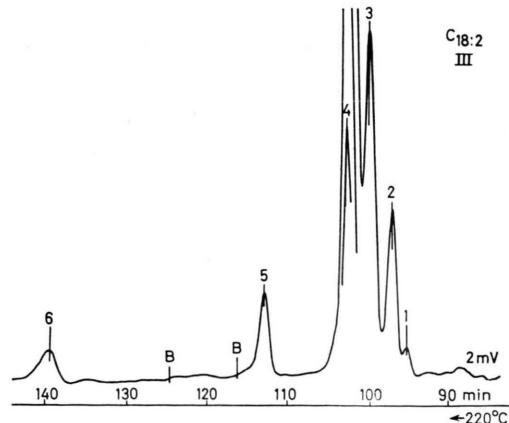


Abb. 6. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Fraktion III, 1:50 verdünnt injiziert. Die mit Nummern gekennzeichneten Peaks sind in Tab. IV aufgeführt. GC-Bedingungen wie in Legende zu Abb. 3.

Tab. IV. Massenspektrometrisch identifizierte Komponenten aus Fraktion III (1:50 verdünnt).

Peak Nr. (nach Abb. 6)	Komponente
1	5.6.9.10-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	6.7.10.11-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
2	8.9.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
3	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
4	9.10.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
5	11.12.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
6	9.10.11.12.13-Penta-OTMS-Octadecansäuremethylester

9.10.11.12.13-Penta-OTMS-Octadecansäuremethylester. Es ist der uns bisher erste bekannte Fall, daß man ein Autoxidationsprodukt einer Fettsäure bei intakter C-Kette zuordnen konnte<sup>25-27</sup>. Nach<sup>27</sup> ist für die Bildung von Hydroperoxiden eine 1,4-Pentadienstruktur erforderlich, so daß bei nicht methylenunterbrochenen Octadecadiensäuren keine Oxidationsprodukte zu erwarten sind, und bisher auch nicht gefunden wurden. In der Fraktion IV ist die Mengenverteilung sehr viel günstiger, so daß hier eine gute Trennung als OTMS-Derivate erreicht werden konnte.

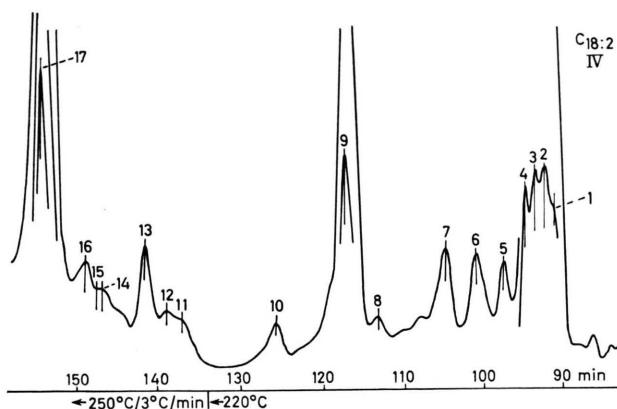


Abb. 7. Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus Fraktion IV nach Derivatisierung. Die mit Nummern gekennzeichneten Peaks sind in Tab. V aufgeführt. GC-Bedingungen wie in der Legende zu Abb. 3.

Die Interpretation der Massenspektren der Poly-OTMS-Octadecansäuremethylester war nach den grundlegenden Untersuchungen an synthetischen Substanzen einfach \*. Das Fragmentierungsschema

Tab. V. Massenspektrometrisch identifizierte Komponenten aus Fraktion IV.

Peak Nr. (nach Abb. 7)	Komponente
1	8.9.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
2	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	8.9.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
3	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
4	6.7.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	7.8.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
5	6.7.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.14.15-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
6	10.11.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.15.16-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
7	9.10.16.17-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
	6.7.9.10.12.13-Hexa-OTMS-Octadecansäure-
8	6.7.9.10.12.13-Hexa-OTMS-Octadecansäure-
	9.10.17.18-Tetra-OTMS-Octadecansäure-
9	8.9.11.12.14.15-Hexa-OTMS-Octadecansäure
10	nicht identifiziert
11	9.10.12.13.15.16-Hexa-OTMS-Octadecansäuremethylester
12	
13	
14/15	
16	
17	

ist grundsätzlich bei allen Typen von OTMS-Octadecansäuremethylester ähnlich, aber die Intensität der gebildeten Bruchstücke ist von der Lage der Doppelbindung abhängig.

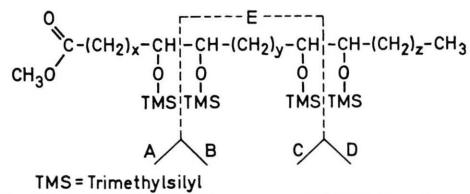


Abb. 8. Fragmentierungsschema von OTMS-Octadecansäuremethylestern.

In den Massenspektren von methylenunterbrochenen OTMS-Octadecansäuremethylestern wird der Basispeak, abhängig von der Entfernung der ersten

\* Die Massenspektren der nicht methylenunterbrochenen Octadecadiensäurenmethylester als OTMS-Derivat können in tabellarischer Form angefordert werden.

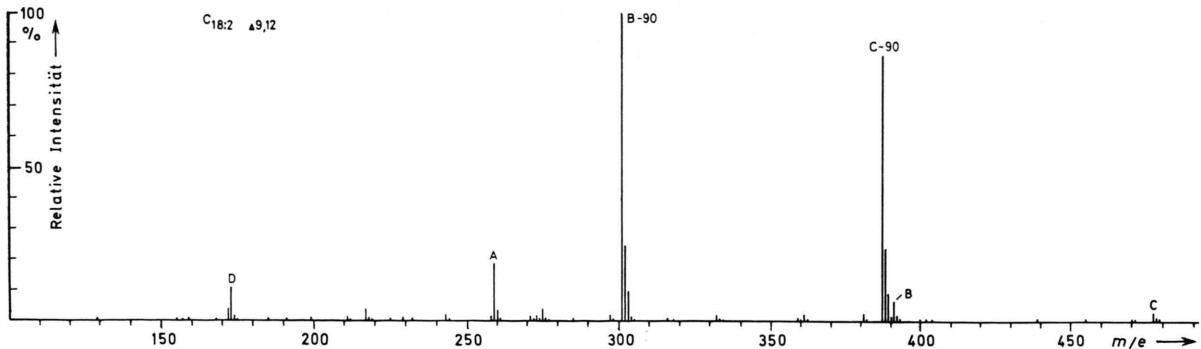


Abb. 9. Massenspektrum des 9.10.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylesters (Peak Nr. 4/Fraktion III). Nicht vorhanden sind in diesem Massenspektrum die Fragmente  $m/e = 129$  und  $m/e = 191$ , die nicht direkt in das Fragmentierungsschema passen, deren Auftreten und Intensität aber abhängig sind vom Abstand der beiden TMS-Glycolgruppen.

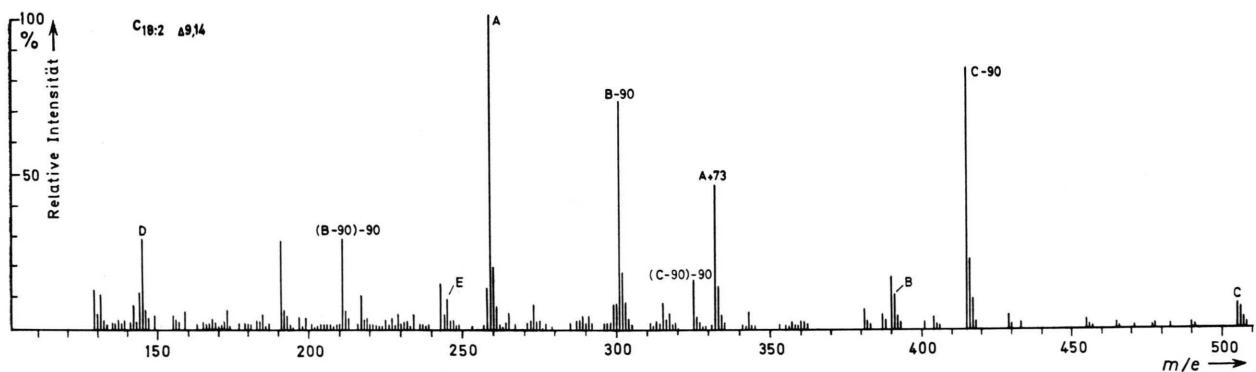


Abb. 10. Massenspektrum des 9.10.14.15-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylesters.

Doppelbindung vom Carboxylenende, von dem Fragment (B-90) (Abspaltung von TMSOH) bzw. (C-90) gebildet. Alle anderen Fragmente wie A, A + 73, (Anlagerung von TMS an den Carbonyl-Sauerstoff von A), B, C, D und Folgebruchstücke sind vorhanden.

Beim Übergang von 9.10.13.14-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylester auf 9.10.14.15-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylester wechselt der Ba-

sispeak von (B-90) auf das Fragment A über, da offenbar durch die drei Methylengruppen zwischen den ursprünglichen Doppelbindungen die Stabilität des Bruchstücks (B-90) bzw. (C-90) stark herabgesetzt wird, erkennbar an der relativen Erhöhung der entsprechenden (B-180) bzw. (C-180) Bruchstücke. Infolge der Erhöhung des Bruchstücks A werden natürlich auch die von A abhängigen Fragmente größer. Die oben erwähnten Fragmente  $m/e = 129$

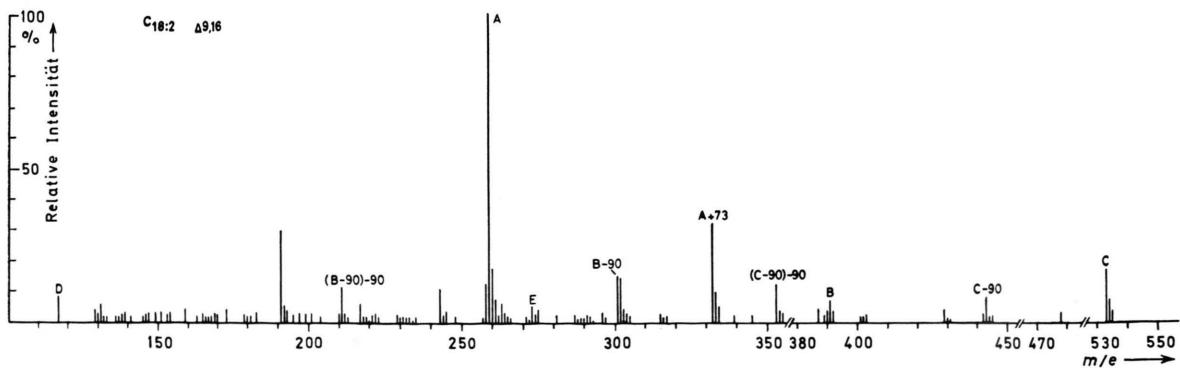


Abb. 11. Massenspektrum des 9.10.16.17-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylesters.

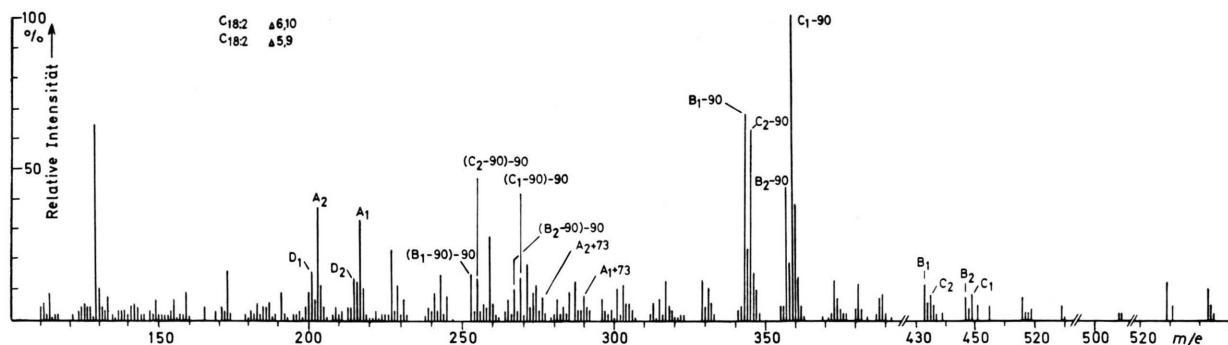


Abb. 12. Massenspektren des 5.6.9.10- und des 6.7.10.11-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylestern.

und  $m/e = 191$  sind hier deutlich erhöht. Wenn noch zwei weitere Methylengruppen zwischen den ursprünglichen Doppelbindungen eintreten, wird dieser Trend noch verstärkt: Die Stabilität der Bruchstücke (B-90) und (C-90) sinkt weiter, während das Fragment A dazu relativ größer wird und Basispeak bleibt.

Auch Mischspektren lassen, sich, sofern nicht zu viele Komponenten enthalten sind, eindeutig interpretieren (Abb. 12).

Bei diesem Mischspektrum handelt es sich um das Spektrum zweier OTMS-Octadecansäuremethylester, nämlich des 5.6.9.10- und des 6.7.10.11-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylestern. Da hier eine Äthylengruppe zwischen den TMS-Glycolgruppen liegt, tritt das Fragment  $m/e = 129$  auf, welches seine höchste Intensität bei den Tetra-OTMS-Derivaten der äthylenunterbrochenen Diensäuremethylestern erreicht. Der Basispeak ist jedoch bei dieser Gruppe von Methylestern das Fragment (B-90) bzw. (C-90).

Nach Auswertung aller Massenspektren konnten wir das Vorkommen folgender Octadecadiensäuren in Frauenmilch nachweisen.

Tab. VI. In Frauenmilch identifizierte Octadecadiensäuren.

Äthylen- Propylen- Butylen- Pentylen- Hexylen, unterbrochene Octadecadiensäuren aus Frauenmilch				
C <sub>18:2</sub>	Δ5,9	Δ7,12	Δ6,12	Δ9,16
	Δ6,10	Δ9,14	Δ9,15	(Δ8,15)
	Δ8,12	Δ10,15		
	Δ9,13			
	Δ10,14			
	Δ11,15			
	(Δ12,16)			

Bei der Analyse der isomeren Octadecadiensäuren ist auffallend, daß abweichend zu den Befunden bei den C<sub>18:1</sub>-Fettsäuren aus Frauenmilch<sup>2</sup> und Kuhmilch<sup>28</sup> kaum Isomere gefunden werden mit einer Doppelbindung zwischen C-9 und der Carboxylgruppe. Neben möglichen biologischen Ursachen sind hierfür wohl zunächst experimentelle Gründe anzuführen. Anhand der gefundenen  $R_f$ -Werte der Isomeren auf AgNO<sub>3</sub> imprägnierten Kieselgelplatten und der Retentionszeiten der Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylester auf einer SE-30-Säule, ist zu erwarten, daß solche Isomere, mit Ausnahme eines 2.3.9.10- oder 3.4.9.10-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylestern, sich ähnlich verhalten wie eine C<sub>18:2</sub> Δ9,12 und deren Derivate. Daher dürfte ihr massenspektrometrischer Nachweis wegen des großen Überschusses an 9.10.12.13-Tetra-OTMS-Octadecansäuremethylestern scheitern. Daneben ist bei der Hydroxylierung einer Doppelbindung in 2- oder 3-Stellung (als Fettsäureester) mit OsO<sub>4</sub> mit experimentellen Schwierigkeiten zu rechnen<sup>29</sup>.

Die Biogenese dieser positionisomeren Fettsäuren ist bisher nicht bekannt. Anhaltspunkte für mögliche Biosynthesewege ergeben sich, wenn man die von uns gefundenen Octadecadiensäuren anders ordnet:

C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:2</sub>
Δx,9/Δ9,x	Δx,12/Δ12,x	Δx,15	Δ6,x
Δ5,9	Δ9,12	Δ9,15	Δ6,10
Δ9,12	Δ8,12	Δ10,15	Δ6,12
Δ9,13	Δ7,12	Δ11,15	
Δ9,14	Δ6,12	Δ12,15	
Δ9,15	Δ12,15		
Δ9,16	Δ12,16		
Δ9,17			.

Für die Serie C<sub>18:2</sub>Δ9,x könnte über eine Δ9-Desaturase in vorhandene Δx-Octadecensäuren eine zweite Doppelbindung in Δ9 eingeführt werden<sup>16</sup>. Unter den restlichen Gruppen ist auffallend, daß, abgesehen von der C<sub>18:2</sub>Δ10,14 alle anderen Fettsäuren eine Doppelbindung an einer „normalen“ Stelle tragen. Unter diesen könnte die Serie der C<sub>18:2</sub>Δ6,x auf eine aktive Δ6-Desaturase zurückgeführt werden<sup>30</sup>. Schwierig ist die Erklärung für das Auftreten der Serie Δx,12 und Δx,15, da Δ12- und 15-Desaturasen nach den klassischen Arbeiten von Klenk<sup>31</sup> und Stumpf<sup>32</sup> Domänen des Pflanzenrei-

ches sind. Trotz dieser für die Pflanze beschriebenen Desaturasen konnten wir in linolsäurereichen Pflanzenölen wie Maiskeimöl und Sojalecithin\* keine solchen Isomeren finden<sup>33</sup>.

Sehr wahrscheinlich kommt es zu einem ständigen Wechsel zwischen Desaturierung, α-Oxidation, β-Oxidation und Kettenverlängerung. Diese Biosynthesewege für positionsisomere Fettsäuren müssen allerdings nicht auf die Mamma-Drüse beschränkt sein, wie Hay und Morrison kürzlich berichteten<sup>34</sup>, sondern sie können an allen Orten mit aktivem Lipidstoffwechsel stattfinden.

- \* Herrn Dr. Betzing, Nattermann Köln, danken wir für die Überlassung von reinem Sojalecithin. Diese Arbeit wurde durch Sachmittel der DFG und des Bundesforschungsministeriums unterstützt.
- <sup>1</sup> E. Klenk, Advances in Lipid Res. **3**, 1 [1965].
- <sup>2</sup> H. Egge, U. Murawski, R. Ryhage, F. Zilliken u. P. György, Z. analyt. Chem. **252**, 123 [1970].
- <sup>3</sup> U. Murawski, H. Egge u. F. Zilliken, Z. Naturforsch. **26 b**, 1241 [1971].
- <sup>4</sup> U. Murawski, H. Egge, P. György u. F. Zilliken, FEBS-Letters **18**, 290 [1971].
- <sup>5</sup> U. Murawski, H. Egge u. F. Zilliken, Z. analyt. Chem. **259**, 211 [1972].
- <sup>6</sup> M. O. Bagby, C. R. Smith Jr., T. K. Miwa, R. L. Lohmar u. I. A. Wolff, J. org. Chemistry **26**, 1261 [1961].
- <sup>7</sup> F. Davidoff u. E. D. Korn, Biochem. biophysic. Res. Commun. **9**, 54 [1962].
- <sup>8</sup> E. D. Korn, J. Lipid Res. **5**, 352 [1964].
- <sup>9</sup> T. Takagi, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **41**, 516 [1964].
- <sup>10</sup> R. W. Miller, M. E. Daxenbichler, F. R. Earle u. H. S. Gentry, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **41**, 167 [1964].
- <sup>11</sup> H. van der Wel u. K. de Jong, Fette, Seifen, Anstrichmittel **69**, 279 [1967].
- <sup>12</sup> G. Hoffman u. P. W. Beijboom, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **46**, 620 [1968].
- <sup>13</sup> A. J. Fulco, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **187**, 169 [1969].
- <sup>14</sup> H. Träubl, Naturwissenschaften **58**, 277 [1971].
- <sup>15</sup> A. Weiss, J. Spiess, E. Stuke u. G. Lagaly, Z. Naturforsch. **27 b**, 317 [1971].
- <sup>16</sup> M. I. Gurr, M. P. Robinson, A. T. James, L. J. Morris u. D. Howling, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **280**, 415 [1972].
- <sup>17</sup> W. H. Heimerman, R. T. Holman, D. T. Gordon, D. E. Kowalyshya u. R. G. Jensen, Lipids **8**, 45 [1973].
- <sup>18</sup> H. Egge, U. Murawski, R. Ryhage, F. Zilliken u. P. György, FEBS-Letters **11**, 113 [1970].
- <sup>19</sup> J. Cason, G. Sumrell, C. F. Allen, G. I. Gillies u. S. Elberg, J. biol. Chemistry **205**, 435 [1963].
- <sup>20</sup> B. de Vries u. G. Jurriens, Fette, Seifen, Anstrichmittel **65**, 725 [1963].
- <sup>21</sup> K. de Jong u. H. van der Wel, Nature [London] **202**, 553 [1964].
- <sup>22</sup> W. G. Niehaus, Jr. u. R. Ryhage, Analytic. Chem. **40**, 1840 [1968].
- <sup>23</sup> A. Zeman u. H. Scharman, Fette, Seifen, Anstrichmittel **75**, 32 [1973].
- <sup>24</sup> W. W. Christie, J. Chromatogr. [Amsterdam] **37**, 27 [1968].
- <sup>25</sup> A. Dolev, W. K. Rohwedder u. H. J. Dutton, Lipids **2**, 28 [1967].
- <sup>26</sup> A. Dolev, W. K. Rohwedder, T. L. Mounts u. H. J. Dutton, Lipids **2**, 33 [1967].
- <sup>27</sup> M. Hamberg u. B. Samuelson, J. biol. Chemistry **242**, 5328 [1967].
- <sup>28</sup> J. D. Hay u. W. R. Morrison, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **248**, 71 [1971].
- <sup>29</sup> U. Murawski, H. Egge u. F. Zilliken, unveröffentlicht.
- <sup>30</sup> N. Nicolaides, Hwei, C. Fu., M. N. A. Ansari u. G. R. Rice, Lipids **7**, 506 [1972].
- <sup>31</sup> E. Klenk, Current Trends in the Biochemistry of Lipids, ed. J. Ganguly u. R. M. S. Smellie, p. 41, Acad. Press.
- <sup>32</sup> H. Stumpf, ebenda p. 57.
- <sup>33</sup> U. Murawski, H. Egge u. F. Zilliken, unveröffentlicht.
- <sup>34</sup> J. D. Hay u. W. R. Morrison, Lipids **8**, 94 [1973].