

BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN VOL. 40 880—884 (1967)

Untersuchung der freien Fettsäuren,^{*1} der freien Sterine,^{*2} der
Sterinester^{*2} und der Glyzeride^{*2} im Regenwurm
(*Lumbricus Spencer*)

Yoko NAYA und Munio KOTAKE

Forschungsinstitut für Lebensmittel Chemie und Institut für Organische Chemie der Städtischen Universität Osaka,
Osaka, Kita-ku

(Eingegangen am 6. September, 1966)

Aus den beiden Ätherextrakten von getrocknetem und frischem japanischen, gewöhnlichen Regenwurm (*Lumbricus Spencer*) wurden die freien, niedrigen und höhern Fettsäuren isoliert, und darin wurden neben gewöhnlichen, geradzahligen-gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, auch ungeradzahligen-gesättigte und isomere Verbindungen gefunden. Mit Hilfe der Gaschromatographie wurde das Fettsäuremethylestergemisch in seine Komponenten zerlegt und die Strukturzusammensetzungen jener Komponenten wurden mittels Mass- und NMR-Spektren identifiziert. In den freien Sterinen, die wir isoliert haben, wurden neben Cholesterin, auch Brassicasterin gefunden. Provitamin D oder $\Delta^{5,7}$ -Sterin wurde durch UV Absorption in rohen Sterinen nicht aus frischem Regenwurm, sondern aus getrocknetem Wurm (etwa 1.7%) entdeckt. Beim *Lumbricus Spencer* wurde Ergosterin, das beim *Lumbricus terrestris* (F. Bock und F. Wetter, *Z. Physiol. Chem.*, **256**, 55 (1938)) entdeckt wurde, nicht gefunden. Aus je getrocknetem und frischem Regenwurm wurden die Sterinester isoliert. Das Fettsäuregemisch, das man beim Verseifen der Sterinester gewinnt, besteht aus *n*-C₁₆, *n*-C₁₇ und *n*-C₁₈ Fettsäuren. Die Sterine aus den Sterinestern setzen sich aus Cholesterin und Brassicasterin zusammen. Die Glyzeride wurden aus je getrocknetem und frischem Regenwurm isoliert. Die Fettsäuren aus den Glyzeriden waren die gleichen Komponenten wie die freien Fettsäuren.

Vor langen Jahren haben Murayama,¹⁾ Aoyama und Lovern²⁾ kurz über die gewöhnlichen, geradzahligen Sorten aus freien Fettsäuren des Regenwurms und aus seinem Verseifungsfett berichtet (*n*-C₁₀—*n*-C₂₂, geradzahlig). Cholesterin¹⁻⁴⁾ (0.0922% von frischem Regenwurm) und Ergosterin⁴⁾ (22.8% der rohen Sterine des *Lumbrici-*

terrestris) aus dem Regenwurm sind schon isoliert worden. Über die Sterinester und die Glyzeride aus Regenwurm ist noch nicht berichtet worden.

Schon mehrfach sind die Analysen von ungeradzahligen, gesättigten Naturfettsäuren, die im Fett der verschiedenen Fische⁵⁻⁸⁾ vorkommen,

4) F. Bock und F. Wetter, *Z. physiol. Chem.*, **256**, 33 (1938).

5) W. T. Roubal, *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **40**, 213 (1963).

6) E. H. Gruger, Jr., R. W. Nelson und M. E. Stansby, *ebenda*, **41**, 662 (1964).

7) H. Ito und K. Fukuzumi, *Abura Kagaku* (Japan), **12**, 273 (1963).

8) H. P. Kaufmann und T. H. Khoe, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **66**, 590 (1964).

*1 Y. Naya und M. Kotake, *Nippon Kagaku Zasshi* (*J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*), **87**, 482 (1966).

*2 Y. Naya und M. Kotake, *ebenda*, **87**, 876 (1966).

1) Y. Murayama und S. Aoyama, *J. Pharm. Soc. Japan*, **46**, 221 (1921).

2) J. A. Lovern, *Biochem. J.*, **34**, 709 (1940).

3) A. de Waele, *Bull. Sci. acad. roy. Belg.*, (5), **16**, 592 (1930).

beschrieben worden, aber sie sind bisher meistens nur gaschromatographisch bearbeitet worden.

Unsere gewonnenen Einblicke in die Komponenten des Regenwurms, in die Fettsäure- und Sterine-Zusammensetzungen, die durch Gaschromatographie, Mass- und NMR-Spektren bewiesen worden sind, sind in Tabelle 3, 4 und 5 gegeben.

Die Ausbeute der Lipoide vom Ätherextrakt aus getrocknetem und frischem Regenwurm sollen in Tabelle 1 dargestellt werden.

TABELLE 1. DIE AUSBEUTE DER LIPOIDE VOM
ÄTHEREXTRAKT AUS GETROCKNETEM UND
FRISCHEM REGENWURM

Lipoide	Ausbeute (Gewicht %)	
	T*	F**
freie Fettsäuren	8	6
freie Sterine	9	7
Sterinester	0.015	0.045
Glyzeride	0.16	0.28

* getrockneter Wurm, ** frischer W.

Beschreibung der Versuche und Ergebnisse

Für die Säulen wurde pulverisierte Kieselsäure "100 mesh" der Fa. Mallinckrodt, U. S. A. und Celite "545" und für die präparative Kieselgel-Dünnenschichtchromatographie wurde Kieselgel G nach Stahl für Dünnenschichtchromatographie der Fa. Merck AG. Darmstadt, verwendet.

Die präparative Gaschromatographie für die Fettsäuremethylester wurde mit einem GC-2C-Apparat der Fa. Shimadzu, Japan, ausgeführt. Kolonnendimension: Länge 3 m, Innendurchmesser 4 mm; Stationäre Phase: Silicon Öl und Diäthylenglykol; Temperatur: 70°C für die niedrigen, 190°C für die höheren Verbindungen; Drücke: 0.6 Kg/cm² und 1.2 Kg/cm² bzw.; Detektor: Filament-Hitzdrahtdetektor; Trägergas: N₂.

Die analytische Gaschromatographie für die Fettsäuremethylester wurde mit einem Hitachi Perkin-Elmer F-6-Apparat ausgeführt. Golay Kolonnendimension: Länge 45 m, Innendurchmesser 0.25 mm; Stationäre Phase: HB 2000 (Ucon Öl 50) für die niedrigen, Q-45 (Apiezon L) für die höheren Verbindungen; Temperatur: 70°C und 200°C bzw.; Drücke: 1 Kg/cm² und 2 Kg/cm² bzw.; Detektor: H₂-Ionisierungsdetektor; Trägergas: N₂.

Für die Sterine wurde die Gaschromatographie mit einem GC-2C-Apparat der Fa. Shimadzu, Japan, ausgeführt. Kolonnendimension: Länge 2.1 m, Innendurchmesser: 4 mm; Stationäre Phase: SE-30 (Polymerische Methylsilicon); Temperatur: 250°C; Drücke: 3 Kg/cm²; Detektor: Hilament-Hitzdrahtdetektor; Trägergas: He.

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Monoskop, der Fa. Yanagimoto, Japan, bestimmt und sind unkorrigiert.

Die Aufnahme der Protonenresonanzspektren erfolgte mit einem Varian Kernresonanzspektrographen A-60. Als interner Standard diente Tetramethylsilan in CCl₄.

Die Mass-Spektren wurden mit einem RMU-6-

Apparat der Fa. Hitachi, Japan, ausgeführt; Ionenbeschleunigungs-Spannung 2 KV, Elektronenenergie 80 V, Ionenquellen-Temperatur 250°C, Einlassteil-Temperatur 150°C.

Freie Fettsäuren. Die freien Fettsäuregemische werden aus getrocknetem Regenwurm (10 Kg) mit Äther extrahiert und dann durch zylindrische Aufsätze eingedampft. Ausb. 137 g.

Die niedrigen Fettsäuregemische (0.29 g) werden zunächst aus dem Ätherextrakt nach der Methode von Friedmann⁹⁾ wasser dampfdestilliert und dann aus dem Wasserdampfdestillat nach der Elsdenischen Methode¹⁰⁾ gewonnen und mit Diazomethan-Ätherlösung methyliert.

Zur Trennung der höheren Fettsäuren wird der Rückstand der Wasserdampfdestillation ausgeäthert. Der Ätherextrakt wird mit Natriumsulfatanhydrid getrocknet, filtriert und eingedampft. Dieser neue Rückstand, etwa 125 g, wird jetzt auf einer Säule von Kieselsäure-Celite (5 : 1, Gewicht 800 g) mit Benzol/n-Hexan (9 : 1 Vol) in seine verschiedenen Bestandteile aufgetrennt. Die zuerst austretende Fraktion wird noch einmal mittels Dünnenschichtchromatographie (1 mm Dicke) gereinigt. Mit pH Reagenz Methylrot tritt Rottfärbung auf. Die höheren Fettsäuregemische werden mit Diazomethan-Ätherlösung methyliert und mit Hilfe der Dünnenschichtchromatographie mit Benzol/n-Hexan (3 : 7 Vol) gereinigt. Ausb. 11.6 g.

Frischer Regenwurm (10 Kg) wird wie getrockneter Wurm behandelt. Aus dem Ätherextrakt, 67 g, wird das niedrige Fettsäuregemisch (0.12 g) und das höhere Fettsäuremethylestergemisch (4.68 g) gewonnen.

Die Gemische von je niedrigen und höheren Fettsäuremethylestern sind durch die analytische Gaschromatographie bearbeitet.

Die ungesättigten Fettsäuremethylester werden als Additionsverbindungen¹¹⁻¹³⁾ des Quecksilberacetats vom gesättigten Fettsäuremethylestergemisch in die verschiedenen Gruppen von ungesättigten Fettsäuren getrennt. Die einzelnen Fraktionen werden durch eine Säule^{14,15)} von Kieselsäure, die mit Silber-Nitrat vorbehandelt wurde, gereinigt und dann analysiert.

In den Fettsäuremethylestern, die man bei der katalytischen Hydrierung des oben genannten Fettsäuremethylestergemisch gewinnt, können auch kleine Mengen von C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₅ und C₂₆-säuren durch Massenspektrengraphie nachgewiesen werden.

Die einzelnen Komponenten, die mit präparativer Gaschromatographie getrennt wurden, werden durch Mass- und NMR-Spektren identifiziert. Als Vergleich werden auch das Spektrum der isolierten Fettsäuremethylester und der authentischen Verbindungen aufgenommen.

Der Stellung der Doppelbindung der ungesättigten C₁₈ und C₂₀ Fettsäuren ist unsicher. Aber ihre Massenspektren deuten an, dass es sich um C₁₈ und C₂₀ Fettsäuren mit Doppelbindungen am neunten C-Atom handelt (Oleinsäure und Gadoleinsäure bzw.).

- 9) T. E. Friedmann, *J. Biol. Chem.*, **123**, 161 (1937).
- 10) S. R. Elsden, *Biochem. J.*, **40**, 252 (1946).
- 11) A. W. Ralston *et al.*, *Oil & Soap*, **14**, 5 (1937).
- 12) E. Jantzen und H. Andreas, *Ber.*, **92**, 1427 (1959); **94**, 628 (1960).
- 13) H. K. Mangold und R. Kammerer, *Chem. & Ind. (London)*, **1961**, 1032.
- 14) B. de Vries, *ebenda*, **1962**, 1049.
- 15) L. J. Morris, *ebenda*, **1962**, 1238.

TABELLE 2. DIE UNTERSCHIEDE DES MUSTERKoeffIZIENTEN FÜR DIE M-SPITZE ZWISCHEN ISOLIERTEN-ISOMEREN, GERADKETTIGEN UND AUTHENTISCHEN-GERADKETTIGEN FETTSÄUREMETHYLESTER

<i>m/e</i>	<i>isoC₁₅*</i> — <i>nC₁₅</i>	<i>isoC₁₆*</i> — <i>nC₁₆</i>	<i>isoC₁₇*</i> — <i>nC₁₇</i>	<i>nC₁₆*</i> — <i>nC₁₆</i>	<i>nC₁₇*</i> — <i>nC₁₇</i>
M—65	1.9	1.0	1.2	0.3	0.1
M—15	2.5	1.2	1.7	0.1	0.2
M—14	0	0	0	0	0
M—13	0	0	0	0.2	0
M—2	0	0.4	0.3	—0.1	0.4
M—1	0.7	0.2	0	0.6	0.3
M	0	0	0	0	0
M+1	0.7	—1.0	—0.8	0.4	0.2
M+2	0.1	—0.2	0	0.1	0.3
M+3	0.1	0	0	—0.3	0.3

* isolierte Verbindung aus dem Regenwurm

Die Mass-Spektren der isomeren Fettsäuren und der geradkettigen Fettsäuren sind ganz ähnlich, ausser den Spitzen bei dem Mass *m/e*=M—65=(CH₃OH+H₂O+CH₃)¹⁶) und bei dem Mass M—15=M—CH₃. In Tabelle 2 werden die Unterschiede des Musterkoeffizienten für die M-Spitze der Mass-Spektren zwischen isolierten-isomeren, geradkettigen und authentischen-geradkettigen Fettsäuremethylester angegeben. Es ist aus der Tabelle 2 ersichtlich, dass die isomeren Verbindungen höhere Spitzen bei dem Mass M—65 und M—15 zeigen als in den Mass-Spektren der entsprechenden authentischen-geradkettigen Fettsäuremethylester beobachtet werden kann. Die grossen Unterschiede des Musterkoeffizienten bei *m/e*=M—1 und M+1 sind vielleicht dem ungenügenden Zerteilungs-grad zuzuschreiben.

Das bei 60 MHz aufgenommene Protonenresonanzspektrum einer isolierten Komponente, die man als eine isomere Fettsäure im Massenspektrum erkennen, zeigt ein Methylproton am Ester δ =3.64 ppm (3H) und eine am Alkylmethylproton auftretende Dublette δ =0.88 ppm (*J*=5.0, 6H).

Freie Sterine. Aus der Kieselsäure-Celite Säule, nach dem Eluieren von freien Fettsäuren, kommen, wenn sie mit Chloroform/Essigester (9:1 Vol) bearbeitet wird, die freien Sterine heraus. Die Fraktion, die eine positive Liebermann-Farbenprobe zeigt, kristallisiert sich beim Eindampfen. Ausb. 13 g (getrockneter Wurm) und 4.7 g (frischer W.).

Die Brechnung, die durch Anwendung der UV Absorption am λ_{max} 282 m μ ¹⁷) vorgenommen wurde, ergab, dass der Gehalt von *4^{5,7}*-Sterin aus getrocknetem Wurm 1.67% der rohen Sterine ist. Es wurde jedoch keine *4^{5,7}*-Sterin aus frischem Wurm gefunden.

Die rohen Sterine 2.1 g wurden mit 10 ccm Acetanhydrid und 7 ccm absol. Pyridin bei 50°C acetyliert. Ausb. 1.35 g. Schmp. 129—131°C. $[\alpha]_D^{20}=-47^\circ$ (*c* 0.2, CHCl₃). Das rohe Acetat wird nach der Methode von Windaus und Hauth¹⁸) bromiert. Nach 48 Stdn. saugt das ausgefallene Produkt ab. Ausb. 0.37 g Schmp. 196—197°C d. Zur Zerlegung des Bromides wurde das Produkt in 5 ccm Äther gelöst und bei Raumtemperatur

unter Röhren mit 1 ccm Essigsäure und 0.1 g Zinkstaub versetzt und einige Tropfen Wasser zugegeben, dann mit Äther extrahiert, wobei das Acetat in Äther übergeht. Ausb. 0.1 g Schmp. 152—153°C. $[\alpha]_D^{24}=-64^\circ$ (*c* 0.8, CHCl₃). Das Acetat wird mit 10% Kaliumhydroxid-Methanolösung 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Das Verseifungsprodukt liefert aus Methanol farblose Kristalle. Schmp. 146—147.5°C $[\alpha]_D^{25}=-62^\circ$ (*c* 0.4, CHCl₃). Das Benzoat: Schmp. 166—167°C $[\alpha]_D^{25}=-38^\circ$ (*c* 0.6, CHCl₃).

Brassicasterinacetat: Ber.¹⁹) Schmp. 152°C. $[\alpha]_D=-64^\circ$. Brassicasterin: Ber.^{19,20}) Schmp. 146°C. $[\alpha]_D=-61^\circ$. Brassicasterinbenzoat: Ber.²¹) Schmp. 163°C. $[\alpha]_D=-35^\circ$.

Aus der Mutterlauge vom Bromid des Brassicasterinacetats fällt durch Zusatz von Äthanol das Bromid des Cholesterinacetats aus. Ausb. 2.1 g. Schmp. 116—117°C. Cholesterinacetat: Wie vorstehend durch Zerlegung vom Bromid des Cholesterinacetats. Schmp. 116—117°C. $[\alpha]_D^{25}=-45^\circ$ (*c* 0.6, CHCl₃). Ber.²⁰) Schmp. 116°C $[\alpha]_D=-44^\circ$. Cholesterin: Wie vorstehend durch Verseifung von Cholesterinacetat. Schmp. 149°C $[\alpha]_D^{25}=-38^\circ$ (*c*=0.4, CHCl₃). Ber.²⁰) Schmp. 147°C $[\alpha]_D=-38^\circ$. Cholesterinbenzoat Schmp. 146—147°C $[\alpha]_D^{25}=-17^\circ$ (*c* 0.6, CHCl₃). Ber.²⁰) Schmp. 147°C $[\alpha]_D=-17^\circ$.

Nach gaschromatographischer Analyse im Vergleich mit den authentischen Sterinen wurde Brassicasterin (etwa 20%) neben Cholesterin (etwa 80%) in beiden freien Sterinen von getrocknetem und frischem Regenwurm entdeckt. Der Gehalt an Sterin ist mit der Prozentsatz-Methode des Flächeninhaltes der Gaschromatogramme geklärt worden.

Sterinester. Die erste Fraktion, aus der die freien Fettsäuren schon getrennt wurden, wird eingedampft und Aceton zugegeben, wobei die Sterinester ausfällt. Das Produkt wird abgesaugt und mit Aceton gewaschen. Es ist Dünnschicht-chromatographisch (Benzol/n-Hexan 3:7 Vol) rein, und mit dem Sprühregen der Schwefelsäure tritt Violettfärbung auf. Ausb. 20 mg (getrockneter Wurm), 30 mg (frischer W.). Schmp. 80—83°C.

19) E. Fernholz und H. E. Stavely, *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 142 (1939).

20) T. Matsumoto und T. Tamura, *Nippon Kagaku Zassi* (*J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*), **76**, 952 (1955).

21) W. Bergmann und R. C. Ottke, *J. Org. Chem.*, **14**, 1085 (1949).

16) F. W. McLafferty, "Mass Spectrometry of Organic Ions," Academic Press, New York (1963), S. 412.

17) M. Glover, J. Glover und R. A. Morton, *Biochem. J.*, **51**, 1 (1952).

18) A. Windaus und A. Hauth, *Ber.*, **39**, 4378 (1906).

IR-Spektrum ist mit den Aufnahmen der Ester verglichen worden. Die Sterinester werden mit 10% Kaliumhydroxid-Äthanollösung 1 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach üblichem Aufarbeiten werden Sterine und Fettsäuren erhalten. Die erhaltenen Fettsäuren werden mit Diazomethan-Ätherlösung methyliert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (1 mm Dicke) mit Benzol/*n*-Hexan (3 : 7 Vol) gereinigt. Die Gaschromatographie der Fettsäuremethylester aus den Sterinestern von je getrocknetem und frischem Wurm sind mit *n*-C₁₆, *n*-C₁₇ und *n*-C₁₈ Fettsäuremethylester identisch. Im Gaschromatogramm der erhaltenen Sterine aus den Sterinestern von je getrocknetem und frischem Wurm sind Cholesterin und Brassicasterin zu erkennen.

Glyzeride. Die Mutterlauge der Sterinester wird eingedampft. Der Rückstand wird mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (1 mm Dicke) mit Benzol/*n*-Hexan (3 : 7 Vol) gereinigt, und der gereinigte Rückstand kann nach Dünnschichtchromatogramm²²⁾ als Glyzeride vermutet werden. Die gleich Vermutung wird durch IR-Spektrum erzielt. Ausb. 0.22 g (getrockneter Wurm), 0.19 g (frischer W.).

Die Glyzeride werden mit 10% Kaliumhydroxid-Äthanollösung 1 Std. unter Rückfluss verseift und dann setzt man 2n Schwefelsäure zu, bis die Lösung auf Kongopapier deutlich sauer reagiert. Nach gewöhnlicher Aufarbeitung erhält man Fettsäuren und wässrige

TABELLE 3. DIE NIEDRIGEN FETTSÄURE-KOMPONENTEN VON GETROCKNETEM UND FRISCHEM REGENWURM

Fettsäure Kette Länge C-Atom Nr.	Gehalt von Fettsäure %*	
	T**	F***
2	1.0	0.8
unbekannt	1.8	—
<i>n</i> -3	1.4	7.3
<i>iso</i> -4	1.2	0.7
unbekannt	3.9	—
<i>n</i> -4	4.3	39
Methyläthyl-Essigsäure	Spuren	Spuren
<i>iso</i> -5	45	15
unbekannt	Spuren	—
<i>n</i> -5	7.0	Spuren
<i>iso</i> -6	2.1	14
<i>n</i> -6	15	7.0
<i>n</i> -7	16	16
<i>n</i> -8	Spuren	Spuren

* Prozentsatz ermittelt durch den Flächeninhalt der Gaschromatogramme der Fettsäuremethylester

** getrockneter Wurm, *** frischer W.

TABELLE 4. DIE HÖHERN FETTSÄURE-KOMPONENTEN DER FREIEN FETTSÄUREN, AUS DEN STERINESTERN UND AUS DEN GLYZERIDEN VON GETROCKNETEM UND FRISCHEM REGENWURM

Fettsäure Kette Länge C-Atom Nr.	Doppel- bindung Nr./Moleköl	Gehalt von Fettsäure %*					
		freie T**	Fettsäuren F***	Sterinestern		Glyzeride	
				T**	F***	T**	F***
<i>n</i> -12	0	Spuren	Spuren			0.4	Spuren
<i>n</i> -13	0	Spuren	Spuren			0.4	Spuren
unbekannt-14	0	—	—			0.5	Spuren
<i>n</i> -14	0	Spuren	0.8			1.0	1.0
<i>iso</i> -15	0	2.3	1.2			2.6	1.9
<i>n</i> -15	0	1.9	1.1			2.2	1.4
<i>iso</i> -16	0	3.9	0.8			2.8	2.9
<i>n</i> -16	0	8.1	6.7	4.7	26	8.3	10
verzweigte-17	1 (?)	Spuren	3.0			Spuren	Spuren
<i>iso</i> -17	0	7.7	4.1			6.0	7.7
<i>n</i> -17	0	6.8	3.4	8.2	17	5.9	7.7
<i>n</i> -18	1	21	12			22	24
<i>n</i> -18	0	17	15	87	57	20	25
verzweigte-19	1 (?)	7.3	5.8			2.4	2.4
unbekannt-19	1 (?)	4.2	—			2.4	2.4
<i>n</i> -19	0	1.3	Spuren			0.6	1.4
unbekannt-20	1 (?)	Spuren	Spuren			—	1.0
<i>n</i> -20	1	15	34			17	11
<i>n</i> -20	0	Spuren	8.7			0.8	Spuren
<i>n</i> -21	1 (?)					0.6	—
<i>n</i> -22	1					1.4	—
<i>n</i> -22	0					1.4	—

* Prozentsatz ermittelt durch den Flächeninhalt der Gaschromatogramme der Fettsäuremethylester

** getrockneter Wurm, *** frischer W.

TABELLE 5. DIE STERIN-KOMPONENTEN VON GETROCKNETEM UND FRISCHEM REGENWURM

Sterinart	Gehalt von Sterin %*			
	freie T**	Sterine F***		Sterinester T**
Cholesterin	80	80		70
Brassicasterin	20	20		30
Provitamin D****	1.7	—		40

* Prozentsatz ermittelt durch den Flächeninhalt der Gaschromatogramme der Sterine

** getrockneter Wurm, *** frischer W., **** Quantität durch UV Adsorption

Fraktion. Die gewonnenen Fettsäuren werden zunächst mit Diazomethan-Ätherlösung methyliert und dann auf die vorstehende Weise der Dünnenschichtchromatographie gereinigt und gaschromatographisch bearbeitet. Die wässrige Fraktion von Verseifungsglyzeride wird mit wässrigen Natriumbicarbonat genau neutralisiert, und in Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen. Nach Filtration der Lösung wird das Methanol abdestilliert. Der Rückstand gibt bei der Erhitzung flüchtige Bestandteile, die mit Kaliumbisulfat bei weiterer Erhöhung der Temperatur zu Acrolein werden. Wird ein Reagenzpapier mit wässrigen 5% Nitro-Prussidnatrium und 20% Pyperizin behandelt, so tritt bei Dampfbehandlung des Acrolein Blaufärbung auf, die nach Behandlung mit 2n Kalilauge rosa Farbe annimmt. Die Quantitätsbestimmung des Glyzerin wird nach der Methode von Malaprade²³⁾ als 21.8% von Glyzeride errechnet.

Resultate und Diskussion

Die Resultate sind in Tabellen 3, 4 und 5 gegeben.

Es hat sich ergeben, dass in den Fettsäuren, die durch Verseifung der Glyzeride von getrocknetem und frischem Regenwurm gewonnen werden, ungeradzahlige gesättigte und isomere Fettsäuren, neben gewöhnlichen geradzahligen gesättigten Verbindungen, enthalten sind. Die Fettsäuren

23) L. Malaprade, *Bull. Soc. Chim. France* (4e), **43**, 683 (1928); (5e) **1**, 833 (1934).

aus den Glyzeriden haben ähnliche Komponenten wie in den freien Fettsäuren von gleichen Wurm.

In Verseifungsfett der Sterinester kann bei entsprechenden Untersuchungen ungeradzahlige gesättigte Fettsäure gefunden werden.

Wir kommen zu folgendem Ergebnis. Ungeradzahlige gesättigte und isomere Fettsäuren sind ursprüngliche Bestandteile im *Lumbricus Spencer*, wobei diese genannten Säuren wie gewöhnliche geradzahlige Fettsäuren verwertet worden sind. Das gleiche Ergebnis, dass ungeradzahlige gesättigte Fettsäuren wie gewöhnliche Verbindungen bei einigen Tieren aufgesogen worden sind, haben Appel und andere Forscher^{24,25)} sohon berichtet.

Cholesterin und Brassicasterin können zu ähnlichen Prozenten in den Sterinen entdeckt werden, die aus sowohl Verseifungsprodukten der Sterinester als auch der freien Sterine des Regenwurms gefunden worden sind. Dies bedeutet, dass Brassicasterin wie Cholesterin nützlich und wichtig für den Wurm sein müssen. Auch dies wurde von Swell u. a.²⁶⁻²⁸⁾ bei einigen anderen Tieren beobachtet.

24) H. Appel, W. Keil, H. Böhm und G. Schiller, *Z. physiol. Chem.*, **266**, 158 (1940); **282**, 220 (1947).

25) H. Appel, W. Keil und G. Berger, *ebenda*, **257**, 1 (1939).

26) L. Swell *et al.*, *J. Nutrition*, **58**, 385 (1956).

27) R. G. Gould, *Circulation*, **10**, 589 (1954).

28) G. L. Curran und R. L. Costello, *Proc. Soc. Expl. Biol. & Med.*, **91**, 52 (1956).