

ZUR ANALYTIK VON POLYEN-FETTSÄUREN

II. EINE STANDARDISIERTE MIKROMETHODE ZUR TRENNUNG UND
OXIDATIVEN SPALTUNG VON POLYEN-FETTSÄUREN MIT HILFE VON
DÜNNSCHICHT- UND GASCHROMATOGRAPHIE

P. POHL, H. GLASL UND H. WAGNER

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, 8 München 2 (B.R.D.)

(Eingegangen am 25. Februar 1969)

SUMMARY

Analysis of polyene fatty acids. II. A standardized micromethod for the separation and oxidative cleavage of polyene fatty acids by thin-layer chromatography and gas chromatography

A simple standardised micromethod is described for the separation of polyene fatty acids and the elucidation of their structures.

Fatty acid methyl esters are separated by thin-layer chromatography of their mercury adducts and oxidatively cleaved into mono- and dicarboxylic acids by potassium permanganate in glacial acetic acid. Identification of their methylated cleavage products is achieved by programmed gas chromatography. The method needs no elaborate apparatus and the time required is short.

EINLEITUNG

Die Isolierung von ungesättigten Fettsäuren im Mikromassstab stellt heute kein grosses Problem mehr dar. Man benutzt hierfür in der Regel die präparative Gaschromatographie und die Dünnschichtchromatographie. Dagegen bereitet die Strukturaufklärung der einzelnen Fettsäuren im Mikromassstab immer noch grosse Schwierigkeiten. Meistens verwendet man hierfür die Methode der oxidativen Spaltung mit KMnO_4 bzw. KMnO_4 und NaJO_4^{1-3} oder die Ozonolyse⁴⁻⁶. Eine ausführliche Übersicht hierüber geben die Arbeiten von STEIN⁷ und PRIVETT UND NICKELL⁸.

Von den angegebenen Methoden erwies sich bei unseren Versuchen die Ozonolyse aber als wenig geeignet, da wir stets eine Vielzahl von nicht identifizierbaren Spaltprodukten erhielten. Versuche mit den bisher gebräuchlicheren Verfahren der oxidativen Spaltung mit KMnO_4 und NaJO_4 in verschiedenen Lösungsmitteln ergaben ebenfalls zahlreiche unbekannte Bruchstücke, die einen relativ hohen Anteil der Spaltprodukte ausmachten und beim Arbeiten im Mikromassstab nicht identifiziert werden konnten. Man konnte deshalb nicht mit Sicherheit auf das Vorkommen isomerer Fettsäuren schließen.

Wir berichten daher im Folgenden über eine einfache Mikromethode, bei der unter Verwendung von KMnO_4 in Eisessig die Versuchsbedingungen soweit standardisiert wurden, dass bei der oxidativen Spaltung nur noch die für die jeweilige Doppelbindungs-Anordnung charakteristischen Mono- und Dicarbonsäuren gebildet werden. Diese Methode gestattet es, in Verbindung mit einer früher⁹ von uns beschriebenen und hier verbesserten dünnenschichtchromatographischen Auftrennung der Quecksilberaddukte, Polyen-Fettsäuregemische in Mengen von weniger als 10 mg in die Einzelfettsäuren aufzutrennen und die Struktur dieser Fettsäuren zu bestimmen. Sie erfordert nur geringen apparativen und zeitlichen Aufwand.

METHODIK

Da bei der Analyse von Fettsäuren aus pflanzlichem Material als erschwerender Faktor noch der Farbstoffgehalt von Pflanzen hinzukommt, wählten wir als Modell für die Auftrennung der ungesättigten Fettsäuren die Meeresalge *Halimeda Tuna* (Ellis et Solander) Lamour, (Chlorophyta). Sie hat einen hohen Farbstoffgehalt und enthält zudem als höchst-ungesättigte aller Polyen-Fettsäuren die $\text{C}_{22}(6=)$ -Fettsäure. Über die Fettsäuren dieser Alge ist bereits von uns berichtet worden^{10,11}.

Die Gesamtlipoide wurden auf die übliche Weise mit Chloroform-Methanol (2:1) extrahiert und mit methanolischer 1 N KOH verseift. Die Entfernung der Farbstoffe gelang auf einfache Weise durch Ausschütteln der mit Wasser verdünnten verseiften Lipoid-Extrakte mit Äther bis zur Farblosigkeit des Äthers. Dann wurden nach dem Ansäuern die Fettsäuren mit Petroläther ausgeschüttelt, methyliert und auf bekannte Weise in ihre Quecksilber(II)-Acetat-Addukte überführt. Die Auftrennung der Addukte erfolgte wie bisher dünnenschichtchromatographisch auf Kieselgel-Kieselgur (3:7) Platten im Laufmittel Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100:0.5:15.7) unter zusätzlicher Verwendung des Laufmittels Petroläther-Äther (2:1) zur Entfernung der gesättigten Fettsäure-Ester.

Die Anfärbung der aufgetrennten Addukte wurde gegenüber unserer früheren Methode verändert und vor allem hinsichtlich der Empfindlichkeit wesentlich verbessert. Sie erfolgt jetzt mit $\text{HCl-Na}_2\text{S}$. Diese Anfärbung hat außerdem den Vorteil, dass sie den weiteren Analysengang in keiner Weise stört (siehe Fig. 1).

Die einzelnen Fettsäure-Methylester wurden dann wie bisher aus den Addukt-zonen regeneriert und mit Hilfe von Gaschromatographie und Mikrohydrierung identifiziert. Die von uns entwickelte oxidative Spaltung der regenerierten Einzelester wurde mit KMnO_4 in Eisessig im Reagenzglas durchgeführt. Sie lieferte die für die jeweilige Doppelbindungslage charakteristischen Mono- und Dicarbonsäuren. Diese Spaltprodukte wurden nach Methylierung direkt durch programmierte Gaschromatographie identifiziert.

Bei der oxidativen Spaltung kann die Malonsäure nicht erfasst werden, da sie vollständig oxidiert wird. Diese Erfahrung machen wir auch bei anderen Methoden der oxidativen Spaltung. Sie stellt aber keinen Nachteil dar. Die Malonsäure tritt als Spaltprodukt bei denjenigen Fettsäuren auf, deren Doppelbindungen im sogenannten "Divinylmethanrhythmus" angeordnet sind ($\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{R}_2$). Diese Konfiguration tritt bei der Mehrzahl aller Fettsäuren auf. Jede Abweichung von dieser Anordnung würde sich entweder durch eine spezifische U.V.-Absorption (bei der Anordnung $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{R}_2$; konju-

gierte Doppelbindungen) oder durch das Auftreten von grösseren Spaltprodukten als Malonsäure bemerkbar machen.

Wegen seiner grossen Flüchtigkeit ist es u.U. schwierig, bei den Spaltprodukten den Propionsäure-Methylester gaschromatographisch zu erfassen, da er im Gaschromatogramm unmittelbar nach den Lösungsmitteln Äther und Methanol erscheint. In diesen Fällen lässt sich die Struktur aus dem zugehörigen Dicarbonsäure-Methylester ableiten.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Isolierung der Fettsäuren

Um bei der GLC der Fettsäure-Ester-Spaltprodukte das Auftreten nicht identifizierbarer Peaks zu vermeiden, müssen hochgereinigte Lösungsmittel verwendet werden. Die Lösungsmittel Äther, Chloroform, Methanol und Petroläther wurden daher vor Gebrauch über eine 120 cm-Kolonne destilliert. Die Schiffe der Schütteltrichter mussten außerdem mit Silikon-Hochvakuum-Fett eingefettet werden.

Ca. 100 g Algen-Frischmaterial wurden gefriergetrocknet (Trockengewicht 17 g), im Multimix zerkleinert und dreimal 6 Std. mit je 150 ml Chloroform-Methanol (2:1) unter Stickstoff und unter Schütteln bei Zimmertemperatur extrahiert. Dann wurde nochmals 6 Std. am Rückfluss unter Stickstoff ausgezogen. Die vereinigten Extrakte (Gesamtlipide) wurde am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 45° vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mit 100 ml methanolischer 1 N KOH (80 ml Methanol + 20 ml 5 N KOH) 90 Min. unter Stickstoff verseift. Dann wurde mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt und nach 2 Std. Stehen bei Zimmertemperatur zur Entfernung des Unverseifbaren und der störenden Farbstoffe solange mit Äther im Schütteltrichter extrahiert, bis der Äther farblos blieb. Nach schwachem Ansäuern mit 25 %-iger HCl wurden die Fettsäuren durch zweimalige Extraktion mit Petroläther (Sdp. 35–45°) isoliert und die vereinigten Petrolätherauszüge solange mit Wasser gewaschen, bis sie farblos waren. Bei diesen Ausschüttelungen mit Wasser traten regelmässig zwischen den beiden Phasen Farbstoff-Schlieren auf, die sich außerdem an den Wänden des Schüttelrichters entlangzogen. Um sie quantitativ zu entfernen, war es ratsam, nach jeder Ausschüttelung die Unterphase zu entfernen und die Petrolätherphase in einen sauberen Schütteltrichter abzudekantieren.

Die farblose Petrolätherphase wurde in einen Erlenmeyerkolben filtriert, im Stickstoffstrom bei 50° zur Trockne eingeengt, die Fettsäuren in 20 ml Äther aufgenommen, in ein Reagenzglas überführt und nach der Mikromethode von SCHLENK UND GELLERMANN¹² durch Einleiten von Diazomethan methyliert. Eine Probe der Methylester wurde gaschromatographisch untersucht, um die Zusammensetzung der Gesamt fettsäuren zu bestimmen. Bei der GLC wurde mit zwei verschiedenen Trennphasen gearbeitet, da bei der Vielzahl an ungesättigten Fettsäureestern auf einer einzigen Phase keine vollständige Auf trennung erfolgte.

Dünnschichtchromatographische Trennung der Quecksilber(II)-Acetat-Addukte und Isolierung der Einzelester

Darstellung der Addukte. Die Fettsäure-Methylester (170 mg) wurden nach der Methode von JANTZEN UND ANDREAS¹³ in ihre Quecksilberaddukte überführt. Dazu wurden die Ester in 80 ml einer Mischung von 7.0 g Quecksilber(II)-Acetat, 125 ml

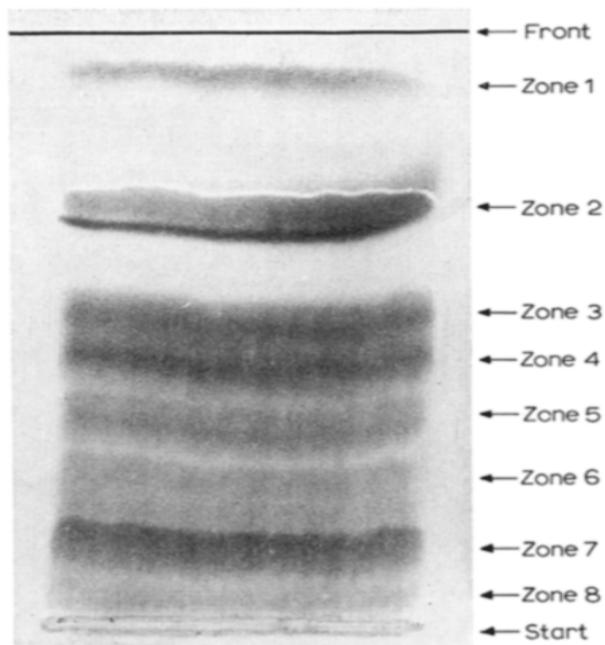


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm der Quecksilber(II)-Acetat-Addukte von *Halimeda Tuna*. Zone 1, $C_{18}(1 =)$; Zone 2, $C_{18}(2 =)$; Zone 3, $C_{18}(3 =)$; Zone 4, $C_{16}(3 =)$; Zone 5, $C_{20}(4 =)$; Zone 6, $C_{18}(4 =)$; Zone 7, $C_{20}(5 =)$; Zone 8, $C_{22}(6 =)$.

Methanol, 1.25 ml Wasser und 0.5 ml Eisessig gelöst und 48 Std. im Dunkeln aufbewahrt. Dann wurde das Lösungsmittel bei 27° im Vakuum-Rotationsverdampfer oder im Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand mit 50 ml Chloroform aufgenommen, in einen Schütteltrichter filtriert, die Chloroform-Lösung zweimal mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 sicc. getrocknet. Dieses Na_2SO_4 sicc. war vorher zur Entfernung aller organischen Verunreinigungen mit Chloroform extrahiert worden.

Dünnschichtplatten. Platten (12×20 cm) wurden mit einer Suspension von 3 g Kieselgel G "Merck" und 7 g Kieselgur G "Merck" in 18 ml Wasser bestrichen und 90 Min. bei 60° getrocknet. Schichtdicke, 250μ . Anschliessend stellten wir die Platten zur Entfernung aller lipophilen Verunreinigungen in eine Dünnschicht-Kammer mit Äther und liessen das Lösungsmittel bis zum oberen Plattenrand durchlaufen.

Auftragsmenge. Die Chloroform-Lösung der Addukte (ca. 700 mg) wurde im Stickstoffstrom auf etwa 7 ml eingeengt und mit einem weichen Pinsel strichförmig auf die Platten aufgetragen. Pro Platte lassen sich etwa 4–15 mg Addukte entsprechend 1–3 mg Fettsäure-Ester auftragen. Bei der oben angegebenen Konzentration von 700 mg/7 ml genügt einmaliges Auftragen der Addukte auf die Platte.

Laufmittel. (I) Petroläther (Sdp. 35–45°)–Äther (2:1). Die Addukte wurden zur quantitativen Entfernung aller gesättigten Fettsäure-Ester zweimal mit diesem Laufmittel chromatographiert und dazwischen vollständig im kalten Luftstrom getrocknet. Laufzeit, 50 Min. für 17 cm.

(II) Isobutanol p.a. (Merck)–Ameisensäure (98–100%, Merck)–Wasser (100:0.5:15.7). Diese Lösungsmittel wurden im Schütteltrichter bis zur vollständigen Mischung geschüttelt. Laufzeit, 4 Std. 30 Min. für 15 cm.

Für die Chromatographie der Addukte hat sich folgende Arbeitsweise bewährt: Die Platten werden 1 cm unter dem oberen Rand (17 cm über dem Start) mit einer Nadel quer gerillt und dann zweimal bis zu dieser Grenze mit dem Laufmittel (I) chro-

matographiert. Dann wurde eine zweite Querrille 3 cm unter dem oberen Rand angebracht und mit Laufmittel II bis zu dieser Grenze chromatographiert. Auf diese Weise wurde verhindert, dass sich die Addukte mit den gesättigten Fettsäure-Estern an der Front von Laufmittel I mischten.

Anfärben der Addukte. Die Platten wurden nach der Chromatographie im kalten Luftstrom getrocknet. Dann wurden sie zuerst mit 10%-iger HCl (in Wasser-Methanol, 1:1) und nach kurzem Trocknen im kalten Luftstrom mit einer 10%-igen Na₂S-Lösung (in Wasser-Methanol, 1:1) besprüht. Die Addukte traten als dunkelbraune Zonen auf weissem Untergrund hervor (siehe Fig. 1).

Isolierung und Identifizierung der Einzelester. Die einzelnen angefärbten Adduktzonen von 1-2 Platten wurden der Platte entnommen, in je ein Reagenzglas überführt, mit 6 ml Methanol und 0.8 ml HCl 37% p.a. versetzt und unter mehrmaligem Schütteln 1 Std. im Dunkeln aufbewahrt. Es empfiehlt sich, das Dünnschichtmaterial im Reagenzglas mit einem Glasstab fein zu verreiben. Die überstehende Lösung wurde dann nach dem Absetzen in einen 250 ml-Schütteltrichter filtriert und der Rückstand noch zweimal mit je 5 ml Methanol extrahiert. Die überstehenden Lösungen wurden ebenfalls in den Schütteltrichter filtriert. Dann wurde das Filter mit Petroläther (Sdp. 35-45°) nachgewaschen. Nach Zugabe von 60 ml Wasser wurde zweimal mit Petroläther extrahiert. Die vereinigten Petroläther-Lösungen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, dann in einen Erlenmeyerkolben filtriert, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 50° auf 2 ml eingeengt und in ein kleines Reagenzglas überführt.

Ein Teil der so erhaltenen Einzelester wurde gaschromatographisch untersucht, ein weiterer Teil hydriert und ebenfalls gaschromatographiert.

Oxidative Spaltung der Einzelester (siehe Fig. 2)

Etwa 0.2-1 mg Fettsäure-Methylester wurden bei Zimmertemperatur in einem 10 ml-Röhrchen mit Schliffstopfen und einem kleinen Magnetrührer mit 0.05 ml Eisessig p.a. gemischt. Dann wurden im Verlauf von 10 Min. unter ständigem Rühren vorsichtig 5 mg gepulvertes KMnO₄ p.a. in kleinen Anteilen von etwa 0.3 mg zugegeben. Nach Entfärben mit einem Tropfen H₂O₂ (15%) wurde das Röhrchen in ein NaCl-Eis-Bad gestellt und 0.3 ml Methanol sowie 0.3 ml Äther zugefügt. In diese Lösung wurde, ohne dass der Magnetrührer entfernt wurde, unter weiterer Kühlung solange Diazomethan eingeleitet, bis sich die Lösung braun färbte (nach etwa 20 Min.). Nach Zugabe von 1 ml Petroläther und 3 ml Wasser wurde der Rührer entfernt, die Mischung kräftig umgeschüttelt und bei -20° aufbewahrt, bis die Unterphase gefroren war (ca. 20 Min.). Die klare Oberphase wurde abgegossen (2-3 ml), 0.2 ml Methanol zugegeben, im Stickstoffstrom unter NaCl-Eis-Kühlung vorsichtig auf ca. 0.2 ml eingeengt und direkt gaschromatographiert.

Gaschromatographie

Modell Packard; Gasdurchfluss, 65 ml Argon/Min.; Einspritzmenge, 0.01 mg.

Gesamt-Ester und regenerierte Einzel-Ester

Säulenmaterial:

(a) 15% EGSS-X (Polyaethylenglykolsuccinat + Silikon) auf Gas-Chrom P (100-120 mesh); Säule, 2 m × 5 mm; Säulentemperatur, 185°; Einlasstemperatur, 210°; Detektortemperatur, 215°; Retentionszeit von Stearinsäure-Methylester, 10 Min. 30 Sec.

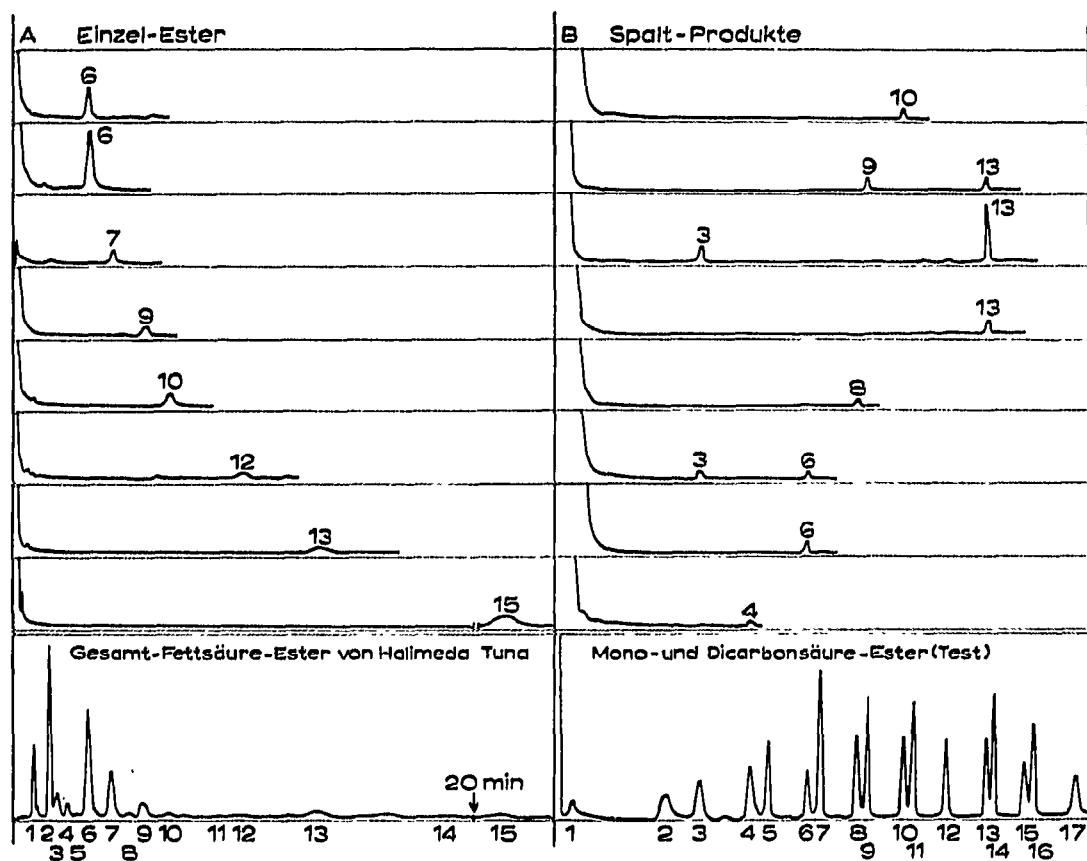


Fig. 2. Gaschromatogramme der wichtigsten Einzel-Ester, ihrer Spaltprodukte und der Gesamt-ester von *Halimeda Tuna*. (A) Fettsäure-Methylester von *Halimeda Tuna* (Gaschromatographic auf EGSS-X). 1 = C₁₄, 2 = C₁₆, 3 = C₁₈(1 =), 4 = C₁₆(2 =), 5 = C₁₈, 6 = C₁₆(3 =) + C₁₈(1 =), 7 = C₁₈(2 =), 8 = C₂₀, 9 = C₁₈(3 =), 10 = C₁₈(4 =), 11 = C₂₀(3 =), 12 = C₂₀(4 =), 13 = C₂₀(5 =), 14 = C₂₂(4 =), 15 = C₂₂(6 =). Strukturen, C₁₆(3 =): Δ7, 10, 13; C₁₈(1 =): Δ9; C₁₈(2 =): Δ9, 12; C₁₈(3 =): Δ9, 12, 15. (B) Mono- und Dicarbonsäure-Methylester (Test) (Gaschromatographic auf Apiezon L). 1 = C₃-Monocarbonsäure (Propions.), 2 = C₃-Dicarbonsäure (Malons.), 3 = C₆-Monocarbonsäure (Caprons.), 4 = C₄-Dicarbonsäure (Bernsteins.), 5 = C₆-Monocarbonsäure (Oenanths.), 6 = C₆-Dicarbonsäure (Glutars.), 7 = C₈-Monocarbonsäure (Capryls.), 8 = C₆-Dicarbonsäure (Adipins.), 9 = C₆-Monocarbonsäure (Pelargons.), 10 = C₇-Dicarbonsäure (Pimelins.), 11 = C₁₀-Monocarbonsäure (Caprins.), 12 = C₈-Dicarbonsäure (Korks.), 13 = C₉-Dicarbonsäure (Azelains.), 14 = C₁₂-Monocarbonsäure (Laurins.), 15 = C₁₀-Dicarbonsäure (Sebacins.), 16 = C₁₈-Monocarbonsäure (Tridecans.), 17 = C₁₁-Dicarbonsäure (Undecandis.). Strukturen, C₁₈(4 =): Δ6, 9, 12, 15; C₂₀(4 =): Δ5, 8, 11, 14; C₂₀(5 =): Δ5, 8, 11, 14, 17; C₂₂(6 =): Δ4, 7, 10, 13, 16, 19.

(b) 20% Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45–60 mesh); Säule, 3 m × 4 mm; Säulentemperatur, 190°; Einlasstemperatur, 215°; Detektortemperatur, 220°.

(a) und (b) Papiervorschub, 1 in./5 Min.; Empfindlichkeit, Schreiber 10⁻⁷, Detektor 3 × 10⁻⁸ bei 500 V.

Mono- und Dicarbonsäure-Ester aus der oxidativen Spaltung (siehe Fig. 2)

Säulenmaterial:

(a) 20% Reoplex 400 auf Chromosorb WS (45–60 mesh); Säule, 3 m × 4 mm; Säulentemperatur, programmiert von 50–190°, linear; Zuwachsrate, 3°/Min. Beginn der Programmierung bei Beginn des Luftpeaks.

(b) 10% Apiezon L auf Anakrom A (70–80 mesh) (Fertigsäule der Fa. Packard); Säule, 3 m × 5 mm; Säulentemperatur, programmiert von 40–180°, linear; Zu-

wachsrat, $2^{\circ}/\text{Min}$. Beginn der Programmierung genau 5 Min. nach Beginn des Luftpeaks.

(a) und (b) Papiervorschub, 1 in./5 Min.; Empfindlichkeit, Schreiber 10^{-7} ; Detektor 3×10^{-8} und höher bei 750 V.

Die Injektionsnadeln sind vor Gebrauch mit Methanol, nicht mit Chloroform zu reinigen.

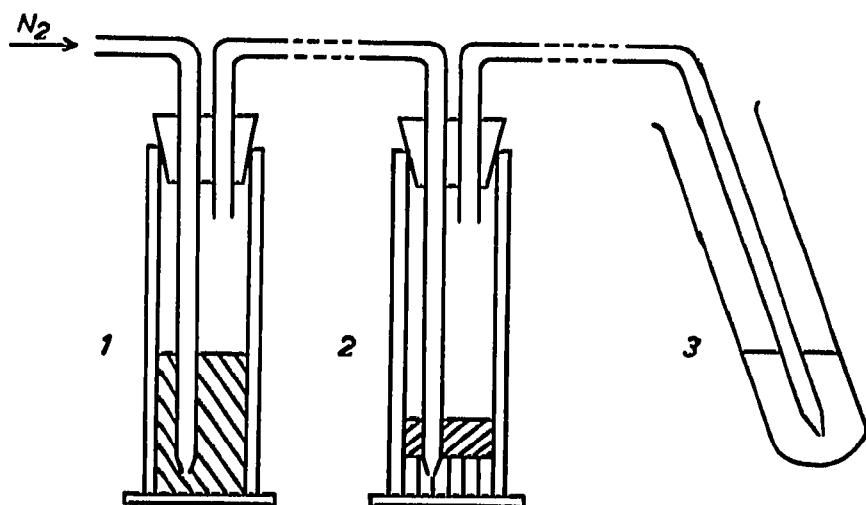


Fig. 3. Methylierungs-Apparatur. Für Beschreibung, siehe Text.

Methylierung

Die Methylierung erfolgte in Abwandlung der Mikromethode von SCHLENK UND GELLERMANN¹² mit Hilfe der in Fig. 3 wiedergegebenen Apparatur.

Zu diesem Zweck wurde Zylinder 1 (70 ml) mit 30 ml Äther und Zylinder 2 (70 ml) mit 3 ml KOH (60%), 3 ml Carbitol (Glykolmonoethyläther) und 4 ml Äther beschickt. Die zu methylierende Substanz befand sich in Äther gelöst in Reagenzglas 3. In Zylinder 2 wurde in kleinen Anteilen von 0.2–0.5 g festes MTSN (N-Methyl-N-toluylsulfonyl-4-nitrosamid) (Merck) zugegeben und ein schwacher Stickstoffstrom durch die 2 Zylinder zum Überleiten des sich in Zylinder 2 bildenden Diazomethans in das Reagenzglas 3 gepert. Mit dieser Anordnung lassen sich durch Auswechseln des Reagenzglases 3 und bei Bedarf durch neue Zugabe von MTSN in Zylinder 2 beliebig viele Proben in kurzer Zeit methylieren. Das Ende der Methylierung ist jeweils an der beginnenden Gelbfärbung des Lösungsmittels im Reagenzglas zu erkennen.

Hydrierung

Die Hydrierungen erfolgten in Aceton p.a. mit PtO₂ als Katalysator. Hydrierungszeit, 4 Std.

DANK

Unser Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine einfache, standardisierte Mikromethode für die Trennung und Strukturaufklärung von Polyen-Fettsäuren wird beschrieben. Die Fettsäuren werden dünn-schichtchromatographisch über die Quecksilber(II)-Acetat-Addukte ihrer Methylester getrennt und oxidativ mit KMnO₄ in Mono- und Dicarbonsäuren gespalten. Die Identifizierung der methylierten Spaltprodukte erfolgt durch programmierte Gaschromatographie. Diese Methode erfordert nur einen geringen apparativen und zeitlichen Aufwand.

LITERATUR

- 1 E. D. VON RUDLOFF, *Can. J. Chem.*, 34 (1956) 413.
- 2 A. P. TULLOCH UND B. M. CRAIG, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41 (1964) 322.
- 3 J. TINOCO UND P. G. MILJANICH, *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 548.
- 4 C. Y. HOPKINS UND M. J. CHISHOLM, *J. Chem. Soc.*, (1965) 907.
- 5 A. D. KEITH, *Comp. Biochem. Physiol.*, 17 (1966) 1127.
- 6 H. M. EDWARDS, JR., *Lipids*, 1 (1967) 1.
- 7 R. A. STEIN, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 42 (1965) 327.
- 8 O. S. PRIVETT UND E. C. NICKELL, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 43 (1966) 393.
- 9 H. WAGNER UND P. POHL, *Biochem. Z.*, 340 (1964) 337.
- 10 H. WAGNER UND P. POHL, *Biochem. Z.*, 341 (1965) 476.
- 11 P. POHL UND H. WAGNER, *Phytochemistry*, 7 (1968) 1565.
- 12 H. SCHLENK UND J. L. GELLERMANN, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 1412.
- 13 E. JANTZEN UND H. ANDREAS, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 1427.

J. Chromatog., 42 (1969) 75-82