elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Blütenöle – Chemische Analyse, Biosynthese und Betrachtungen zur Entstehung von Ölblumen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Herrn Dipl.-Chem. Lars Seipold
geb. am 01.01.1973 in Köln

Gutachter:
1. Prof. Dr. L. Wessjohann (Halle)
2. Prof. Dr. W. Boland (Jena)
3. Prof. Dr. P. Nuhn (Halle)

Halle (Saale), den 04.05.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006792
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006792]

Aus der Wahrheit Feuerspiegel
Lächelt *sie* den Forscher an.
Zu der Tugend steilem Hügel
Leitet *sie* des Dulders Bahn.
Auf des Glaubens Sonnenberge
Sieht man *ihre* Fahnen wehn,
Durch den Riß gesprengter Särge
Sie im Chor der Engel stehn.

Friedrich von Schiller, 1785

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ACCase	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACP	*Acyl-Carrier-Protein*
ATP	Adenosintriphosphat
CI	*Chemical Ionization*
CID	*Collisionally Activated Dissociation*
CoA	Coenzym A
DAG	Diacylglycerin
DMDS	Dimethyldisulfid
e.e.	*enantiomeric excess*
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAME	*Fatty Acid Methyl Ester*
FAS	*Fatty Acid Synthase*
GC	Gaschromatographie
GPAT	Acyl-CoA(ACP):*sn*-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase
I.D.	Innendurchmesser
KAS	Ketoacyl-ACP-Synthase
LPAAT	Acyl-CoA(ACP):*sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase
MAG	Monoacylglycerin
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
MTBSTFA	*N*-Methyl-*N*-(*tert*.-butyldimethylsilyl)trifluoracetamid
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (gemessen)
$m/z_{calc.}$	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (berechnet)
n.b.	nicht beobachtet
nsLTP	*nonspecific lipid transfer protein*
psi	*pounds per square inch* (1 psi = 0.0689 bar)
RT	*retention time*
s.	siehe
s.u.	siehe unten
TAG	Triacylglycerin
TIC	*Total Ion Chromatogram*
TBDMS	*tert*.-Butyldimethylsilyl
TCTFE	1,1,2-Trichlor-1,2,2-trifluorethan
TMS	Trimethylsilyl
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TOF	*Time-of-flight*
Vol %	Volumenprozent
VLCFA	*very long chain fatty acid*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Aufgabenstellung 1

1.1 Ölblumen und bekannte Verbindungen aus Blütenölen 1
1.2 Aufgabenstellung 2

2 Hydroxyfettsäuren und biosynthetisch oder strukturell verwandte Verbindungen 3

2.1 3-Hydroxyfettsäuren 3
2.1.1 Biosynthese von Fettsäuren 3
2.1.2 Abbau von Fettsäuren (β-Oxidation) 6
2.1.3 Akkumulation von 3-Hydroxyfettsäuren 8
2.1.4 3-Hydroxyfettsäuren in artifiziellen Systemen 8
2.2 Kutikulare Hydroxyfettsäuren und verwandte Verbindungen 8
2.3 Suberin 14
2.4 Weitere pflanzliche Hydroxyfettsäuren 14

3 Glycerolipide 15

4 Analytische Methoden 17

4.1 Gaschromatographie in Kopplung mit Massenspektrometrie 17
4.2 ESI-Massenspektrometrie 18
4.3 Tandem-Massenspektrometrie 18

5 Ergebnisteil 19

5.1 Blütenöle aus (3*R*)-3-Acyloxyfettsäuren 19
5.1.1 Das Blütenöl von *Angelonia pubescens* (Scrophulariaceae) 19
5.1.2 Das Blütenöl von *Nierembergia scoparia* (Solanaceae) 30
5.1.3 Das Blütenöl von *Krameria lanceolata* (Krameriaceae) 33
5.2 Blütenöle aus Acylglycerinen mit (3*R*)-3-Acetoxyacylresten 39
5.2.1 Das Blütenöl von *Diascia barberae* (Scrophulariaceae) 39
5.2.2 Das Blütenöl von *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) 50
5.3 Blütenöl aus (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren und Acylglycerinen 53
5.3.1 Das Blütenöl von *Trimezia martinicensis* (Iridaceae) 53
5.4 Blütenöl aus Acylglycerinen mit nicht funktionalisierten Acylresten 54
5.4.1 Das Blütenöl von *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) 54
5.5 Blütenöl mit acetylierten Dihydroxyfettsäuren 59
5.5.1 Das Blütenöl von *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae) 59
5.6 Blütenöl aus Acylglycerinen mit acetylierten Dihydroxyacylresten 72
5.6.1 Das Blütenöl von *Sigmatostalix huebneri* (Orchidaceae) 72
5.7 Zusammenfassung, Vergleich von Blütenölkompositionen und Überlegungen zur Entstehung von Blütenölen und Ölblumen 76

5.7.1 Verschiedene Typen von Blütenölen....76
5.7.2 Neue Erkenntnisse zu Bestandteilen von Blütenölen....77
5.7.3 Vergleich der Blütenölzusammensetzungen, Betrachtungen zur Biosynthese von Blütenölen und zur Entstehung der Ölblumen....78
5.8 Quintessenz....84

6 Experimentalteil....85

6.1 Verwendete Geräte und experimentelle Bedingungen....85
6.1.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie....85
6.1.2 ESI-Massenspektrometrie....88
6.1.3 Andere Geräte....88
6.2 Probennahme und Pflanzenmaterial....89
6.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) zur sauren Methanolyse....89
6.4 AAV zur Trimethylsilylierung....90
6.5 Darstellung von 3-Ketopalmitinsäuremethylester....90
6.6 Darstellung von (3*R*)-3-Hydroxypalmitinsäuremethylester....91
6.7 AAV zur Racemisierung von 3-Hydroxyfettsäuren....91
6.8 Darstellung von racemischer 3-Hydroxypalmitinsäure....92
6.9 Darstellung von kurzkettigen Carbonsäurechloriden....92
6.10 Acylierung der 3-Hydroxypalmitinsäure....92
6.11 AAV zur Methylierung mit Diazomethan....92
6.12 AAV zur Darstellung von Fettsäurepyrrolididen....93
6.13 AAV zur Darstellung von Fettsäuremethylestern mit Trimethylsulfoniumhydroxid....93
6.14 AAV zur Darstellung von Dimethyldisulfidaddukten ungesättigter Fettsäuren....93

7 Literaturverzeichnis....94

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Ölblumen und bekannte Verbindungen aus Blütenölen

1969 wurde von S. Vogel erstmalig die Existenz von Ölblumen beschrieben [1]. Diese produzieren und sekretieren nichtflüchtige Lipide als florale Lockmittel für Bestäuber. Im Gegensatz zu den flüchtigen Blütendüften werden die nichtflüchtigen Lipide als Blütenöle bezeichnet. In der Folgezeit wurden von seiner Arbeitsgruppe umfangreiche Untersuchungen zum Vorkommen und den Bestäubern von Ölblumen in den Familien Scrophulariaceae, Iridaceae, Malpighiaceae, Krameriaceae, Orchidaceae, Primulaceae und Cucurbitaceae durchgeführt. Insbesondere bei verschiedenen Scrophulariaceen und Primulaceen wurden auch Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der Sekrete vorgenommen [2,3]. Als Hauptbestandteile wurden für beide Pflanzenfamilien Diacylglycerine mit einem Acetyl- und einem langkettigen 3-Acetoxyacylrest nachgewiesen. Als Bestandteile der Blütenöle von Cucurbitaceen wurden Ketofettsäuren vermutet, deren Strukturen jedoch nicht gesichert bestimmt werden konnten [4].

Neben den Arbeiten von S. Vogel finden sich in der Literatur nur vereinzelt Angaben zu Zusammensetzungen von Blütenölen. So beschreiben S. B. Vinson *et al.* das Auftreten von ungewöhnlich polaren Fettsäuren im Sekret von *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae), die Strukturen konnten jedoch nicht aufgeklärt werden [5]. Im Öl von *Oncidium pubes* (Orchidaceae) werden von G. Reis *et al*. als Hauptbestandteile Diacylglycerine mit einem Acetyl- und einem 3-Acetoxyacyl- oder einer ungesättigten Acylrest angegeben [6,7]. B. B. Simpson *et al.* beschreiben 3-Acetoxyfettsäuren mit den Kettenlängen C_{16}, C_{18} und C_{20} als Hauptbestandteile von *Krameria*-Blütenölen [8-10].

Weitere Ölblumen existieren in den Familien Solanaceae und möglicherweise Melastomataceae [11-13]. Verläßliche Angaben über Bestandteile ihrer Sekrete lagen bislang nicht vor.

Blütenöle werden über Drüsen sekretiert, die nach einem Vorschlag von S. Vogel *Elaiophore* genannt werden. Es wird zwischen zwei anatomisch unterschiedlichen Varianten, den Epithel- und Trichom-Elaiophoren unterschieden. Bei Erstgenannten sind ganze Abschnitte der Epidermis (Oberhaut) bestimmter Blütenteile sekretionsfähig. Das Öl sammelt sich als Bläschen unter der Kutikula an. Trichom-Elaiophore bestehen aus Drüsenhaaren, deren Köpfchen das Sekret absondern. Hier platzt die Kutikula oft ohne Einwirkung der Bestäuber auf, so dass sich das Öl in Form von Tröpfchen auf den Trichomspitzen oder als Film zwischen den Härchen ansammeln kann [2-4].

Durch die Darbietung ihrer Sekrete binden die Ölblumen spezialisierte Bestäuber an sich, um ihre eigene Vermehrung sicher zu stellen. Bei den Bestäubern handelt es sich ausschließlich um Bienen, die an die Blütenmorphologie angepaßte Beinwerkzeuge zur Aufnahme des Öls besitzen [2-5,11,14-18].

Die biologische Bedeutung der Blütenöle für die Bestäuber ist bis heute nicht vollständig geklärt. So wurde zwar u.a. von S. Vogel nachgewiesen, dass Blütenöle zur Ernährung der Bestäuberlarven eingesetzt werden, es ist aber umstritten, ob sie auch zur Nestimprägnierung Verwendung finden [19]. Veränderte Dufourdrüsen bei ölsammelnden Bienen und Beobachtungen zum Ölsammelverhalten (vgl. auch [3]) weisen darauf hin.

Die Entstehung und Entwicklung von Ölblumen ist bislang kaum untersucht, basierend auf taxonomischen Untersuchungen wird jedoch angenommen, dass Ölblumen mehrmals unabhängig voneinander entstanden sind. Es wird sogar innerhalb der Pflanzenfamilien Iridaceae und Solanaceae eine mehrfach parallel erfolgte Ausbildung von Elaiophoren angenommen [2,13].

1.2 Aufgabenstellung

Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich der Inhaltsstoffe von Blütenölen aus unterschiedlichen Pflanzenfamilien. Es sollte geprüft werden, ob sich die pflanzliche Diversität auch in unterschiedlich zusammengesetzten Blütenölen widerspiegelt. Durch einen Vergleich der Substanzen könnte, unter Berücksichtigung von biosynthetischen Aspekten, auf einen gemeinsamen oder unterschiedlichen metabolischen Ursprung dieses floralen Lockmittels geschlossen werden. Möglicherweise ließen sich Erkenntnisse darüber gewinnen, warum sich Ölblumen mehrfach unabhängig voneinander entwickeln konnten.

Zur Durchführung dieser Aufgaben waren praktikable Analyseverfahren zu entwickeln, die möglichst ohne zeitaufwändige Substanzisolierungen auskommen sollten.

2 Hydroxyfettsäuren und biosynthetisch oder strukturell verwandte Verbindungen

In diesem Kapitel wird eine Auswahl von in der Literatur beschriebenen Hydroxyfettsäuren und biosynthetisch oder strukturell verwandten Verbindungen vorgestellt. Sofern bekannt und für die Diskussion bei Bestandteilen aus Blütenölen von Bedeutung, wird auf die Biosynthesen eingegangen.

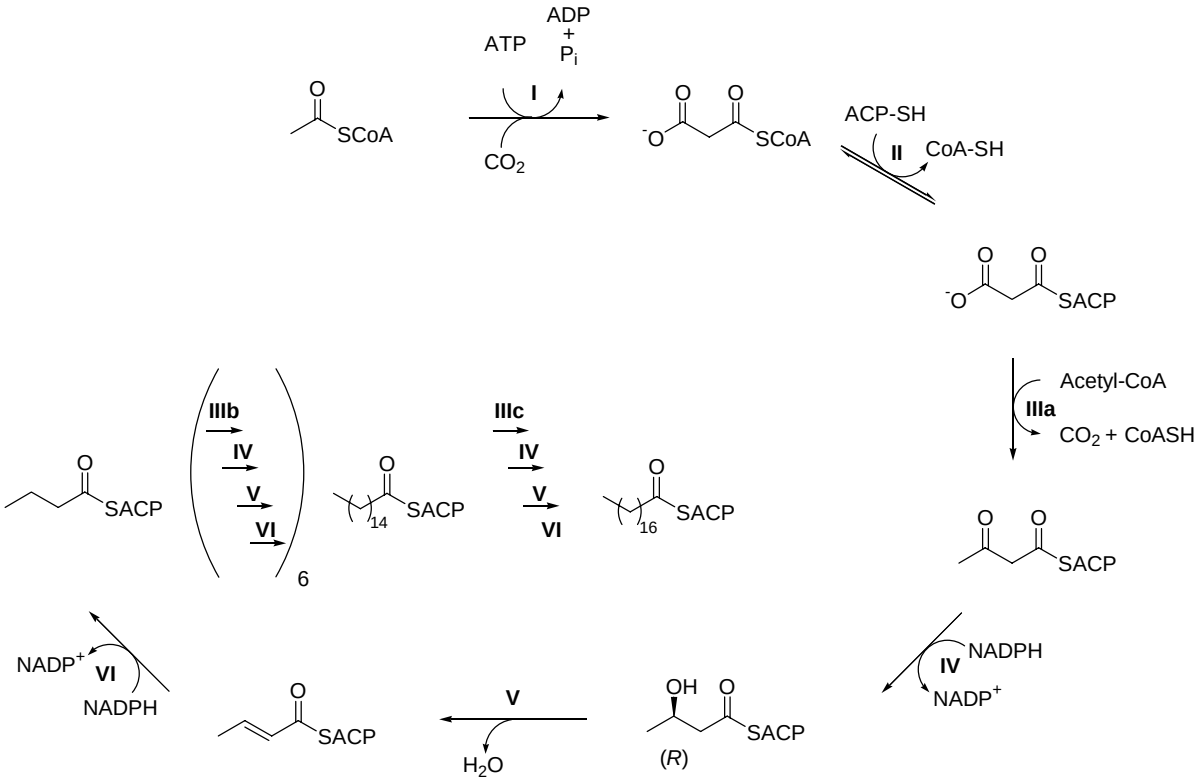
2.1 3-Hydroxyfettsäuren

3-Hydroxyfettsäuren treten als Zwischenprodukte der Fettsäurebiosynthese (s. **Abschnitt 2.1.1**) und des Fettsäurekatabolismus (s. **Abschnitt 2.1.2**) bei Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen auf. 3-Hydroxyfettsäuren als Sekundärmetabolite und in artifiziellen Systemen werden in **Abschnitt 2.1.3** und **Abschnitt 2.1.4** betrachtet.

2.1.1 Biosynthese von Fettsäuren

Obwohl die bei der *de novo* Fettsäurebiosynthese gebildeten Intermediate bei den verschiedenen Organismen identisch sind, unterscheiden sich die Enzymausstattungen deutlich. So existieren zwei Arten von Fettsäure-Synthasen (FAS, *Fatty Acid Synthase*). Typ I besteht aus einer oder maximal zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, die alle Reaktionen der Fettsäurebiosynthese katalysieren. Die FAS der Säugetiere ist aus zwei gleichen (α_2), die der Hefen aus je sechs von zwei unterschiedlichen Polypeptidketten ($\alpha_6\beta_6$) zusammengesetzt. Bei Pflanzen liegt, analog zu *E. coli*, ein Typ II Enzym vor; die verschiedenen Reaktionen werden von individuellen Proteinen katalysiert. Im Einzelnen handelt es sich um Malonyl-CoA:ACP-Transacylase, drei β-Ketoacyl-ACP-Synthasen, β-Ketoacyl-ACP-Reduktase, β-Hydroxyacyl-ACP-Dehydrase und β-Enoyl-ACP-Reduktase (s. auch **Schema 2-1**). Ebenfalls zur FAS gezählt wird der Cofaktor *Acyl-Carrier-Protein* (ACP). Zusätzlich ist die Acetyl-CoA-Carboxylase ein essentiell zur Fettsäurebiosynthese benötigtes Enzym [20-25].

Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von C_{18} werden bei Pflanzen in den Plastiden synthetisiert [20,23,25]. Analoge Enzymausstattungen bei plastidischer und bakterieller Fettsäurebiosynthese werden mit der Endosymbiontenhypothese begründet, nach der die Plastiden ihren Ursprung in einem photosynthetisch aktiven, bakteriellen Symbionten finden [25].



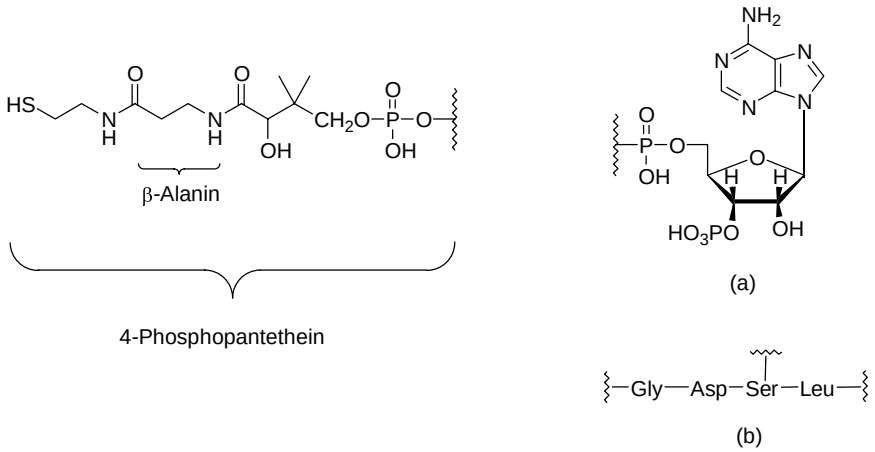
Schema 2-1: ***De novo*** **Fettsäurebiosynthese. I**: Acetyl-CoA-Carboxylase, **II**: Malonyl-CoA:ACP-Transacylase, **IIIa**: β-Ketoacyl-ACP-Synthase III, **IIIb**: β-Ketoacyl-ACP-Synthase I, **IVc**: β-Ketoacyl-ACP-Synthase II, **IV**: β-Ketoacyl-ACP-Reduktase, **V**: β-Hydroxyacyl-ACP-Dehydrase, **VI:** β-Enoyl-ACP-Reduktase.

Fettsäuren entstehen durch iterative Kettenverlängerung, wobei Malonyl-CoA als C_2-Baustein Verwendung findet (**Schema 2-1**). Malonyl-CoA wird unter Katalyse von **Acetyl-CoA-Carboxylase** (ACCase) erhalten und in den Plastiden nahezu ausschließlich zur Fettsäurebiosynthese genutzt.

Von der ACCase existieren ähnlich wie von der FAS zwei unterschiedliche Typen. Bakterielle ACCase besteht aus vier separaten Untereinheiten (Typ II): *Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein* (BCCP), Biotin-Carboxylase und einer α-, sowie β-Untereinheit der BCCP:Acetyl-CoA-Transcarboxylase. Die ACCase von Pilzen und Säugetieren (Typ I) besteht hingegen aus einem multifunktionellen Polypeptid. Die meisten Pflanzen besitzen beide Typen von ACCasen. Entsprechend der Endosymbiontenhypothese ist die plastidische ACCase vom prokaryotischen Typ. Bei der cytosolischen ACCase handelt es sich um ein multifunktionelles Polypeptid [25]. Ausnahmen bilden die Gräser (Poaceae); hier liegt sowohl in den Plastiden, als auch im Cytosol eine homodimere (Typ I) ACCase vor [25].

Der Malonylrest wird durch **Malonyl-CoA:ACP-Transacylase** von Coenzym A (CoA) auf ACP übertragen. Der letztgenannten Cofaktor ist ein Protein mit einem verhältnismäßig

geringem Molekulargewicht um 9 kDa. Die Fettsäure wird sowohl beim CoA, als auch beim ACP über die endständige Thiolgruppe einer 4-Phosphopantethein-Einheit gebunden (**Schema 2-2**). Pflanzen besitzen mehrere ACP-Isoformen mit gewebespezifischen Expressionsmustern [23].



Schema 2-2: Coenzym A und ATP. Sowohl (a) Coenzym A, als auch (b) ACP besitzen eine 4-Phosphopantethein-Einheit (bei (b) über die Hydroxy-Gruppe der Serin-Seitenkette gebunden).

Die **β-Ketoacyl-ACP-Synthasen** (KAS) katalysieren die eigentliche Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verknüpfung in einer Kondensationsreaktion. In Pflanzen wurden bislang drei Isoformen nachgewiesen, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. In der ersten Kondensationsreaktion wird Acetyl-CoA mit Malonyl-ACP unter Katalyse von KAS III verknüpft. KAS III wurde erstmals 1992 in Spinat nachgewiesen. KAS I besitzt die höchste Aktivität mit C_4-C_{14} Acyl-ACPs. KAS II akzeptiert *in vitro* längerkettige Acyl-ACP Derivate (C_{10}-C_{16}) und katalysiert *in vivo* die Kettenverlängerung von Palmitoyl-ACP zu Stearoyl-ACP [23,25].

Reduktion der resultierenden 3-Ketoverbindung durch die **β-Ketoacyl-ACP-Reduktase** führt stereoselektiv zum D-β-Hydroxyacyl-ACP [22], nach den neueren Cahn-Ingold-Prelog Regeln als (3*R*)-3-Hydroxyacyl-ACP zu bezeichnen.

Das folgende Enzym, die **β-Hydroxyacyl-ACP-Dehydrase**, setzt stereospezifisch (3*R*)-3-Hydroxyacyl-ACP Verbindungen zu den *trans*-2-Enoyl-ACP Derivaten um [22].

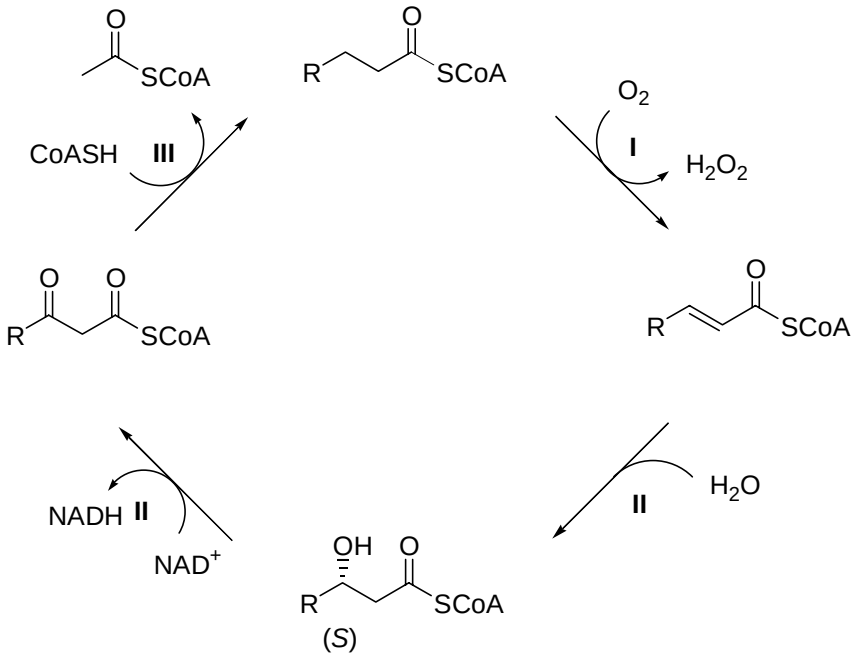
Die *trans*-2-Enoyl-ACP-Derivate werden schließlich durch die **β-Enoyl-ACP-Reduktase** reduziert und können in einen weiteren Zyklus der Kettenverlängerung eintreten [23].

Die *de novo* Fettsäurebiosynthese endet für gewöhnlich bei Kettenlängen von C_{16} oder C_{18}. Die häufigsten Reaktionen, welche zum Abbruch führen, sind (1) die Hydrolyse der Acyl-ACP-Bindung durch eine Acyl-ACP-Thioesterase, (2) der direkte Transfer der Acyl-Einheit von ACP auf ein Glycerolipid, katalysiert durch eine Acyltransferase oder (3) die Einführung einer Doppelbindung durch Stearoyl-ACP-Desaturase, was zum ACP-Derivat der Ölsäure (18:1(*Z*9)) führt, welches durch eine spezielle Thioesterase sofort hydrolysiert wird.
Die durch die Hydrolyse gebildeten Fettsäuren werden nach einem bislang nicht bekannten Mechanismus aus den Plastiden exportiert [25].

2.1.2 Abbau von Fettsäuren (β-Oxidation)

Der Abbau von Fettsäuren erfolgt in der Regel über die β-Oxidation, bei der sie entsprechend ihrer biosynthetischen Herkunft in C_2-Einheiten zerlegt werden [26]. Wie die *de novo* Fettsäurebiosynthese kann auch die β-Oxidation durch unterschiedliche Enzymsysteme katalysiert werden. So unterscheiden sich mitochondriale, peroxisomale und bakterielle β-Oxidation zum einen durch die Enzymorganisation und zum zweiten durch die Ausbeute an Adenosintriphosphat (ATP) [27,28]. Bei Tieren tritt sowohl mitochondriale, als auch peroxisomale β-Oxidation auf. Hier werden durch peroxisomale β-Oxidation überwiegend sehr langkettige Fettsäuren ($> C_{18}$) verkürzt. Die verbleibenden Acylreste können anschließend in den Mitochondrien vollständig abgebaut werden [28]. Bei Pflanzen findet die β-Oxidation in Peroxisomen statt, eine mitochondriale Lokalisation wird diskutiert [27,29].

Für die peroxisomale β-Oxidation können freie Fettsäuren ohne Transportsystem in die entsprechenden Organellen diffundieren [30]. Die erste Reaktion des eigentlichen Abbaucyclus ist die Oxidation von Acyl-CoA durch eine **Acyl-CoA-Oxidase** unter Bildung von *trans*-Enoyl-CoA (s. **Schema 2-3**). Bei dieser Reaktion werden die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, so dass Wasserstoffperoxid entsteht, welches anschließend durch Katalase wieder disproportioniert wird. Während bei diesem Cyclus chemische Energie in Wärme umgewandelt wird, werden die Elektronen bei der mitochondrialen β-Oxidation zunächst auf Flavinadenindinucleotid übertragen. Die chemische Energie, die durch die Oxidation des Acylrests gewonnen wird, kann somit über den Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung zur Synthese von ATP genutzt werden.
Die nächsten zwei Schritte der plastidischen β-Oxidation werden durch ein multifunktionelles Enzym mit **Enoyl-CoA-Hydratase-Aktivität** und **(3*S*)-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität** katalysiert. Dabei wird zunächst L-β-Hydroxyacyl-CoA ((3*S*)-3-Hydroxyacyl-CoA) und dann 3-Ketoacyl-CoA erhalten. Im letzten Schritt eines



Schema 2-3: Peroxisomale β-Oxidation. **I**: Acyl-CoA-Oxidase, **II**: Multifunktionelles Protein (Enoyl-CoA-Hydratase-Aktivität), **II**: Multifunktionelles Protein ((3*S*)-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität), **III**: β-Ketoacyl-CoA-Thiolase.

Umlaufs wird 3-Ketoacyl-CoA durch eine **3-Ketoacyl-CoA-Thiolase** in Acetyl-CoA und ein in der Summe um eine C_2-Einheit verkürztes Acyl-CoA gespalten, welches erneut in den Cyclus eintreten kann.

Die β-Oxidation ist bei Pflanzen essentiell für das Wachstum von Keimlingen aus ölreichen Saaten. Sie findet hier in den Glyoxysomen, einer speziellen Art von Peroxysomen statt; über den Glyoxylatweg wird Oxalacetat erzeugt, welches in der Gluconeogenese eingesetzt wird [28,31]. Die β-Oxidation tritt nicht nur bei Keimlingen, sondern auch in zahlreichen pflanzlichen Geweben, wie Blättern, Wurzeln und dem Blütenstand auf, wie Genexpressionsstudien gezeigt haben. Obwohl es bislang nicht bewiesen ist, wird angenommen, dass die β-Oxidation zum Abbau von toxischen, kurzkettigen Fettsäuren und zur Verwertung von Acyl-CoA-Molekülen aus dem Membranlipid-Umsatz benötigt wird [29]. Außerdem ist die β-Oxidation in der Biosynthese von Metaboliten, wie z.B. Jasmonsäure involviert.

Eine Besonderheit bezüglich der Stereochemie weißt die β-Oxidation bei dem Bodenbakterium *Stenotrophomonas maltophilia* auf. Es ist in der Lage, verschiedene langkettige Fettsäuren in die (3*R*)-3-Hydroxyfettsäuren abzubauen [32,33].

2.1.3 Akkumulation von 3-Hydroxyfettsäuren

Eine Akkumulation von gebundenen (*3R*)-3-Hydroxyfettsäuren wird besonders in Endotoxinen (Lipopolysacchariden) Gram-negativer Bakterien beobachtet [34,35]. Bei Hefen der Spezies *Rhodoturula* sind (*3R*)-3-Hydroxyfettsäuren als Bestandteile extrazellulärer Glycolipide bekannt [36]. Das Potenzial von Hefen, 3-Ketosäuren stereoselektiv zu reduzieren, wird auch in der Bioorganischen Chemie ausgenutzt [37].
Eine keimhemmende und fungizide Wirkung von (3*R*)-3-Hydroxydecansäure (Myrmicacin) nutzen südamerikanische Blattschneiderameisen *Atta sexdens* aus [38]. Auch *Lactobacillus plantarum* MiLab 14 produziert 3-Hydroxyfettsäuren mit den Kettenlängen C_{10}, C_{12} und C_{14}, für die eine stark fungizide Wirkung nachgewiesen wurde [39].
3-Hydroxyfettsäuren als Bestandteile von höheren Pflanzen werden nur in Einzelfällen beschrieben. So ist (3*R*)-3-Hydroxypalmitinsäure als Acylseitenkette von Epassofilin aus *Eupatorium hyssopifolium* (Asteraceae) bekannt [40]. Bei *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) wurde Lupeol acyliert mit 3-OH 18:0, 3-OH 20:0, 3-OH 22:0, 3-OH 24:0 und 3-OH 26:0 gefunden [41].

2.1.4 3-Hydroxyfettsäuren in artifiziellen Systemen

In vitro Untersuchungen von R. D. Simoni *et al.* haben ergeben, dass die Struktur des ACPs die Produkte der FAS beeinflussen kann. So produziert die FAS von *E. coli* mit Acyl-ACP-Derivaten aus Spinat überwiegend 3-Hydroxyfettsäuren mit Kettenlängen von C_{10} bis C_{18} [42].

2.2 Kutikulare Hydroxyfettsäuren und verwandte Verbindungen

Bei Pflanzen tritt eine Akkumulation von gebundenen Hydroxyfettsäuren in der Kutikula auf. Diese bedeckt die oberirdischen Gewebe aller höheren Pflanzen und setzt sich aus einer polymeren Cutinmatrix und löslichen kutikularen Lipiden zusammen. Bei den löslichen Lipiden läßt sich zwischen intrakutikularen, in die Poren der Matrix eingebetteten und epikutikularen Wachsen unterscheiden. Letztgenannte kommen in Form eines dünnen Filmes oder als mikroskopische Aggregate (epikutikulare Wachskristalle) auf der Oberfläche vor [43].
Die Kutikula erfüllt zahlreiche für die Vitalität einer Pflanze erforderliche Funktionen. Sie bewahrt die Pflanze vor Austrocknung durch Wasserverlust und Schäden durch UV-Strahlung [44]. Die Wachse verhindern eine Benetzung durch (Regen-)wasser und schützen somit vor Verschmutzung bzw. einer Ansammlung pathogener Mikroorganismen [45]. Ferner wird angenommen, dass Oberflächenwachse eine wichtige Rolle bei der Abwehr von phytopathogenen Bakterien oder Pilzen besitzen [46]. Durch die Ausbildung spezieller Oberflächenstrukturen kann es zu Interaktionen mit Insekten kommen; so bilden verschiedene

Macaranga-Arten (Euphorbiaceae) epikutikulare Wachskristalle aus, auf der sich ohne abzurutschen nur symbiontische Ameisen bewegen können [47].

Die wichtigsten Monomereinheiten, aus denen Cutin gebildet wird, sind Monohydroxy-, Polyhydroxy- oder Epoxyfettsäuren der Kettenlängen C_{16} oder C_{18} [25,48]. Es wird angenommen, dass sie im endoplasmatischen Retikulum durch Cytochrom-P450-Oxygenasen aus den Coenzym A-Derivaten von Palmitinsäure und Ölsäure (18:1(*Z*9)) generiert werden [49-51]. Ein häufiger Vertreter aus der C_{16}-Familie ist 10,16-Dihydroxypalmitinsäure; in der C_{18}-Familie kommen oftmals 9,10-Epoxy-18-hydroxystearinsäure und 9,10,18-Trihydroxy-stearinsäure in größeren Mengen vor. Eine detaillierte Aufzählung findet sich bei T. Walton [48].

Eine Technik zur annähernd vollständigen Trennung von epikutikularen und intrakutikularen Wachsen wurde erst kürzlich entwickelt, so dass zahlreiche durchgeführte chemische Analysen auf Proben mit Anteilen beider Wachsarten beruhen [43]. Die Bestandteile der löslichen kutikularen Lipide variieren von Spezies zu Spezies, grundlegende Komponenten sind jedoch langkettige Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren, primäre und sekundäre Alkohole, Ketone, Aldehyde und Ester mit durchschnittlich zwischen 20 und 34 Kohlenstoffatomen. Weitere häufig in der Literatur beschriebene Wachskomponenten sind Triterpenoide [25,44].

Die Biosynthese der sehr langkettigen aliphatischen Komponenten ($> C_{18}$) ist in den epidermalen Zellen lokalisiert, Precursoren sind Palmitin- oder Stearinsäure aus der plastidischen *de novo* Fettsäurebiosynthese. Die Kettenverlängerung findet in einer dazu analogen Reaktionssequenz statt, allerdings katalysiert durch Fettsäureelongasen. Dies sind nicht-plastidische, membrangebundene Enzyme, von denen angenommen wird, dass sie in Multienzym-Komplexen organisiert sind. Zahlreiche Hinweise deuten auf eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (ER) hin. Verschiedene Effekte unterschiedlicher Inhibitoren und die Analyse von Mutanten mit Defekten in der Synthese sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFA, *very long chain fatty acid*) haben gezeigt, dass verschiedene Elongasen mit einer hohen Spezifität für bestimmte Kettenlängen beteiligt sind, wobei die Spezifität auf das kondensierende Enzym zurückgeführt wird [44]. Über die beiden Reduktasen (β-Ketoacyl-CoA(ACP)-Reduktase, β-Enoyl-CoA(ACP)-Reduktase) und die Dehydratase aus pflanzlichen Fettsäureelongasen ist nur sehr wenig bekannt. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden kürzlich Gensequenzen für die Reduktasen identifiziert. Datenbankanalysen ergaben bei *Arabidopsis* mehrere Sequenzhomologe [44]. Ebenfalls nicht geklärt ist die Bedeutung von ACP bei der Fettsäureelongation [52].

Nach Beendigung der Kettenverlängerung wird oftmals einer von zwei unterschiedlichen Reaktionspfaden beschritten. Auf einem **reduktiven Pfad** wird die Acyl-CoA-Einheit durch ein einzelnes Enzym (Acyl-CoA-Reduktase) zum primären Alkohol reduziert, wie bei Erbsen (*Pisum sativum*) nachgewiesen wurde. Unter Einwirkung einer Acyl-CoA:Fettsäurealkohol-

Acyltransferase können dann Ester erhalten werden [44]. Auf einem zweiten Weg, dem **Decarbonylierungs-Pfad** wird Acyl-CoA zunächst zum Aldehyd reduziert und anschließend zum Alkan decarbonyliert. Die Alkane können zu sekundären Alkoholen hydroxyliert und diese dann zu den Ketonen oxidiert werden [44,53,54].

Außer durch Hydroxylierung können Sauerstoff-enthaltende funktionelle Gruppen auch in einer zur Polyketidbiosynthese analogen Reaktionsfolge in Bestandteile aus Wachsen eingeführt werden [55]. Verstanden werden soll unter dem Term „analog zur Polyketid-biosynthese“, dass vergleichbar zur Fettsäurebiosynthese eine Kettenverlängerung um C_2-

Verbindungstyp	Spezifizierungen	Species	Literatur
Alkan-2-ole (in Estern)	überwiegend C_{15} und C_{17}	*Papaver* species (Papaveraceae)	[56]
	C_9-C_{15}; ungerade C-Anzahl	*Eucalyptus* species (Myrtaceae)	[57]
	überwiegend C_{13} und C_{15}	*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus, *Agropyron dasystachyum*, *A. riparium*, *A. elongatum* (Poaceae)	[58-60]
	C_9	*Sorghum bicolor* (Poaceae)	[61]
	C_{23}-C_{33}; ungerade C-Anzahl	*Juniperus scopulorum* (Cupressaceae)	[62]
sekundäre Alkohole	Pentacosan-6-ol Heptacosan-8-ol Nonacosan-10-ol Hentriacontan-12-ol	*Papaver* species (Papaveraceae)	[56]
primäre Alkohole	*trans*-Docos-2-en-1-ol	*Triticum aestivum* (Poaceae)	[63]
Alkan-1,3-diole	C_{22}-C_{30}; gerade C-Anzahl prädominant	*Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae)	[64,65]
β-Alkandiole	C_{33}-C_{43}; ungerade C-Anzahl prädominant; überwiegend 8,10- oder 10,12-disubstituiert	*Myricaria germanica* (Tamaricaceae)	[66]
	Nonadecan-4,6-diol	*Helianthus annuus*[1] (Asteraceae)	[67]
Alkandiole	Docosan-1,3-diol Tetracosan-1,5-diol Hexacosan-1,7-diol Octacosan-1,9-diol Triacontan-1,11-diol	*Papaver* species (Papaveraceae)	[68]
	Dotriacontan-1,9-, -1,11- und -1,13-diol Tetratriacontan-1,11-diol	*Myricaria germanica* (Tamaricaceae)	[66]
	C_{28}-C_{32}; gerade C-Anzahl; 1,11-disubstituiert	*Osmunda regalis* (Osmundaceae)	[69]
3-Hydroxyaldehyde	C_{22}-C_{28}; überwiegend gerade C-Anzahl	*Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae)	[64]
β-Ketoalkohole	Nonadecan-, Heneicosan- und Tricosan-4-ol-6-on	*Helianthus annuus*[1] (Asteraceae)	[67]
Ketoalkohole (C_{26}-C_{36})	C_{26}-C_{36}; gerade C-Anzahl prädominant; überwiegend 1,7-, 1,9-, 1,11-, 1,13-, 1,15-, 1,17-, 1,19- und 1,21-disubstituiert	*Osmunda regalis* (Osmundaceae)	[45,69]
Ketoaldehyde (C_{28}-C_{36})	gerade C-Anzahl prädominant; überwiegend 1,7-, 1,9-, 1,11-, 1,13-, 1,15- oder 1,17-disubstituiert	*Osmunda regalis* (Osmundaceae)	[45,69]

β-Diketone	Hentriacontan-14,16-dion	*Agropyron dasystachyum, A. riparium, A. elongatum, Triticum aestivum* (Poaceae)	[58,59,63]
	Nonacosan-12,14-dion Hentriacontan-14,16-dion Tritriacontan-16,18-dion	*Eucalyptus* species (Myrtaceae)	[57]
	Nonacosan-10,12-, -12,14- und –14,16-dion Hentriacontan-12,14-, 14,16-dion Tritriacontan-12,14-, -14,16- und –16,18-dion	*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus (Poaceae)	[70]
	Nonadecan-4,6-dion Heneicosan-4,6- und -6,8-dion Tricosan-4,6- und -6,8-dion Pentacosan-4,6-, -6,8- und -10,12-dion Heptacosan-4,6-, -6,8-, und -10,12-dion Nonacosan-10,12- und -12,14-dion Hentriacontan-10,12-dion	*Helianthus annuus*[1] (Asteraceae)	[67]
δ-Lactone	C_{22}-C_{32}; überwiegend gerade Kohlenstoffanzahl	*Cerinthe minor* (Boraginaceae)	[71]
trans-Alk-2-ensäuren	22:1(*E*2) und 24:1(*E*2)	*Agropyron riparium, Triticum aestivum* (Poaceae)	[59,63]
Hydroxyfettsäuren	C_{28}-C_{36}; gerade C-Anzahl; Bestandteil von Estoliden; Hydroxyfunktion in Position (ω-17) oder (ω-19)	*Juniperus scopulorum* (Cupressaceae)	[62]
Diketofettsäuren	15,17-Dioxohexacosansäure	*Helianthus annuus*[1] (Asteraceae)	[67]

Tabelle 2-1: Verbindungen oder Verbindungsreihen mit polyketidanalogen Substitutionsmustern aus epikutikularen Wachsen (Auswahl).
[1] Aus Pollenwachs.

Einheiten durch Kondensation, Reduktion, Dehydrierung und erneute Reduktion erfolgt (s. **Schema 2-1**), wobei jedoch einer oder mehrere der drei letztgenannten Reaktionsschritte ausgelassen werden können. Hierdurch können während der Kettenverlängerung Keto- oder Hydroxyfunktionen, sowie Doppelbindungen in ein Polyketid eingebaut werden. Der Term soll explizit keine Assoziation zur Enzymorganisation herstellen. Mögliche Vertreter von Wachsbestandteilen aus einer polyketidanalogen Biosynthese sind in **Tabelle 2-1** zusammengefaßt.

Detailliert untersucht und bestätigt wurde die Hypothese anhand der Metabolisierung radioaktiv markierter Substrate zu β-Diketonen durch Gerste (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus, Poaceae) [55,58,70]. β-Diketone wurden außer bei zahlreichen Poaceen auch in den Wachsen von *Eucalyptus* species (Myrtaceae) und *Helianthus annuus* (Asteraceae) nachgewiesen (s. auch **Tabelle 2-1**). Biosynthetisch verwandt sind vermutlich die β-Alkandiole aus *H. annuus* und *Myricaria germanica* (Tamaricaceae), sowie die β-Ketoalkohole aus *H. annuus*. Es ist jedoch nicht untersucht, ob die Hydroxyfunktionen während der Kettenverlängerung oder durch nachträgliche Reduktion von Ketogruppen erhalten werden. In einem Fall (*H. annuus*) wurde bislang eine β-Diketocarbonsäure gefunden.

Wie ebenfalls am Beispiel der Gerste nachgewiesen wurde, ist die Biosynthese von Alkan-2-olen, die in den Wachsen in Form ihrer Ester auftreten, mit der der β-Diketone verknüpft. Erste Hinweise darauf ergaben eine organspezifische, sowie eine Aufklärung der Wachszusammensetzungen verschiedener *Eceriferum*-Mutationen [58,72]. Inhibitorstudien und Untersuchungen zum Einbau radioaktiv markierter Substrate (β-Ketopalmitoyl-CoA, 14:0 und 16:0, Pentadecan-2-on, Hetadecan-2-on, Pentadecan-2-ol und der CoA-Thioester racemischer Gemische aus 3-OH 14:0, 3-OH 16:0 und 3-OH 18:0) in β-Diketone und Alkan-2-ole ergaben, dass die Biosynthese beider Verbindungstypen über 3-Ketoacyl-CoA-Derivate erfolgt. Die Ester der Alkan-2-ole werden durch sukzessive Decarboxylierung, Reduktion der Ketofunktion zum Alkohol und Acylierung erhalten. 3-Hydroxyacyl-CoA-Derivate sind keine Intermediate in der Biosynthese der Alkan-2-ole [73,74].
Neben Alkan-2-olen mittlerer Kettenlänge (C_9 bis C_{17}) bei *Papaver* species (Papaveraceae), *Eucalyptus* species, *Hordeum vulgare* L. cv. Bonus und *Sorghum bicolor* (Gramineae) werden bei *Juniperus scopulorum* (Cupressaceae) Alkan-2-ole mit Kettenlängen von C_{23} bis C_{33} gefunden. Vorausgesetzt es handelt sich um ähnliche Biosynthesen, wäre hier eine β-Ketoacylsynthase mit einer anderen Kettenlängenspezifität als in den davor genannten Fällen erforderlich.

Für alle anderen Verbindungen aus **Tabelle 2-1** gibt es nach unserem Kenntnisstand keine publizierten Untersuchungen zur Biosynthese. Gleichwohl wird anhand der Substitutionsmuster eine Entstehung der Verbindungen entweder über Reaktionsfolgen analog einer Polyketidbiosynthese oder durch die Einwirkung von Hydroxylasen auf Acylverbindungen oder Alkane postuliert.

Mögliche, aus den Substitutionsmustern ableitbare, polyketidanaloge Biosynthesen für die in **Tabelle 2-1** angegebenen Verbindungen sollen hier kurz erläutert werden.

Die sekundären Alkohole und Alkandiole aus den *Papaver* species (s. **Tabelle 2-1**) können auf dem *reduktiven Pfad* bzw. *Decarbonylierungs-Pfad* aus den gleichen Vorläufern erhalten werden. Eine einfache Erklärung für die Entstehung aller Verbindungen ist, dass als Intermediat der Biosynthese der Thioester von 3-OH 22:0 auftritt, welcher durch Elongasen um bis zu fünf C_2-Einheiten kettenverlängert werden kann. Das Acyl-CoA oder ACP-Derivat von 3-OH 22:0 selbst kann durch Kondensation des Thioesters von 20:0 mit Malonyl-CoA(ACP) und anschließende Reduktion entstehen. In der Literatur, welche die Analyse der Verbindungen beschreibt, wird die Produktbildung über Hydroxylasen mit unterschiedlicher Selektivitäten erklärt [56,68]. Anhand der publizierten Daten erscheinen beide Reaktionswege möglich.

Ähnliche Diole mit einer Hydroxyfunktion an einem primären und einer an einem sekundären C-Atom werden bei *M. germanica* und *Osmunda regalis* (Osmundaceae) gefunden. Nach der oben postulierten Biosynthese würden hier 3-OH 20:0, 3-OH 22:0, 3-OH 24:0 und 3-OH 26:0

als Substrate für Elongasen auftreten. Diese Substrate könnten ihrerseits, wie oben beschrieben, aus 18:0, 20:0, 22:0 und 24:0 gebildet werden.

Die Bildung der Ketoalkohole und Ketoaldehyde bei *O. regalis* läßt sich analog den letzten Ausführungen erklären, wenn β-Ketoacyl-Thioester als Substrate für Elongasen angenommen werden.

Bei *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) und *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) wurden 1,3-Diole mit den Kettenlängen C_{22}-C_{30} und die entsprechenden 3-Hydroxyaldehyde (C_{22}-C_{28}) nachgewiesen. D.h. hier könnte eine Elongase fehlen, welche 3-Hydroxyacyl-Thioester als Intermediate akzeptiert. Statt dessen findet eine Reduktion zum Aldehyd oder Alkohol statt.

Hydroxylierte Wachsbestandteile, bei denen die Oxidationsstufe des Carboxyl-Kohlenstoffatoms erhalten ist, werden relativ selten gefunden. Bei *Cerinthe minor* (Boraginaceae) wird eine Reihe von δ-Lactonen gefunden; ein möglicher Biosyntheseweg besteht darin, dass ein Elongase vor der Lactonbildung genau einmal 3-Hydroxyfettsäuren als Substrat akzeptiert. Die *trans*-Alk-2-ensäuren aus *Agropyron riparium* und *Triticum aestivum* lassen sich ebenfalls als Polyketide auffassen. Das *trans*-Docos-2-en-1-ol aus *T. aestivum* könnte durch Reduktion von 22:1-(*E*2) entstehen. Die Hydroxyfettsäuren aus *Juniperus scopulorum* ließen sich auf Kettenverlängerungen von 3-OH 20:0 und 3-OH 22:0 zurückführen.

Auch wenn die hier postulierten Biosynthesen als hypothetisch anzusehen sind, macht die Anhäufung der Verbindungen mit funktionellen Gruppen ausschließlich an den durch die Elongationszyklen vorgesehenen Stellen eine polyketidanaloge Biosynthese wahrscheinlich.

Nach erfolgter Biosynthese müssen die Wachsbestandteile an die Zelloberfläche transportiert werden [25,44,75]. Die genauen Mechanismen für den Export sind nicht bekannt, es gibt jedoch experimentell untermauerte Modelle, die an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden können.

Zuerst müssen die Wachsbestandteile die Plasmamembran erreichen. In der Literatur werden hierfür zwei Möglichkeiten diskutiert. Zum einen könnten sie direkt aus einer hydrophoben Umgebung des ER in die Plasmamembran übergehen. Geschlossen wir dies u.a. daraus, dass es Stellen gibt, bei der sich ER und Plasmamebran bis auf 10 nm annähern [44]. Zum anderen könnten sie über Exocytose von im Golgi-Apparat erzeugten Vesikeln in die Cytoplasmamembran eingebracht werden [25,44].

In einem zweiten Schritt ist die Lipiddoppelschicht zu durchqueren. Der transmembrane „flip-flop“ von Wachskomponenten mit polarer Kopfgruppe erfolgt vermutlich spontan [44].

Schließlich müssen die Wachsbestandteile aus der Membran extrahiert und durch die hydrophobe Zellwand zur Kutikula transportiert werden. Hierzu wird eine Beteiligung nicht-spezifische Lipid-Transfer-Proteine (nsLTP) diskutiert. NsLTPs sind kleine Proteine (9 kDalton) mit 8 konservierten Cystein-Einheiten, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden, wobei eine hydrophobe Tasche entsteht [44,76,77].

2.3 Suberin

Bei Geweben mit Sekundärwachstum, einschließlich holzigen Stämmen, Wurzeln und unterirdischen Speicherorganen, sowie an Orten der Wundheilung wird Suberin gebildet [48]. Die polymere Matrix ist zwischen Plasmamembran und Zellwand lokalisiert und besitzt einen polyaliphatischen und einen polyphenolischen Teil, die vermutlich kovalent miteinander verknüpft sind. Die Monomere des aliphatischen Teils sind analog denen des Cutins, allerdings zeichnet sich in den letzten Jahren ab, das auch Glycerin als Monomereinheit eine entscheidende Bedeutung bei der Ausbildung des dreidimensionalen Polymernetzwerkes zukommt [78]. Phenolische Monomereinheiten sind z.B. Cumarinsäure (*o*-Hydroxy-zimtsäure), Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und Sinapinalkohol [78]. Analog zum Cutin sind auch in das Suberin lösliche Lipide eingelagert, die allerdings nur vereinzelt untersucht sind. Eine Übersicht findet sich auch hier bei T. J. Walton [48].

2.4 Weitere pflanzliche Hydroxyfettsäuren

Eine der bekanntesten pflanzlichen Hydroxyfettsäuren ist Rizinolsäure ((12*R*)-OH 18:1(*Z*9)), die zu einem großen Anteil in dem Samen von *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), gebunden in Triacylglycerinen, vorkommt. Rizinolsäure besitzt kommerzielle Anwendungen unter anderem in Kosmetika, Pharmaka, Hydraulikölen und zur Herstellung von Polyurethanen [79]. Die Hydroxyfunktion wird durch Hydroxylierung an Position C-12 von Ölsäure (18:1(*Z*9)) eingeführt, die in Phospatidylcholin in *sn*-2-Position gebunden ist [80]. Die Reaktion wird durch ein Enyzm katalysiert, welches bekannten Δ12-Desaturasen aus dem endoplasmatischen Reticulum sehr stark ähnelt [81].
Acylglycerine mit Rizinolsäure und analogen Fettsäuren (Densipolsäure (12-OH 18:2(*Z*9,*Z*15), Lesquerolsäure (14-OH 20:1(*Z*11)), Auricolsäure (14-OH 20:2(*Z*11,*Z*17)) werden außerdem in den Samen verschiedener *Lesquerella*-Arten (Brassicaceae) gefunden [82-85]. Das Saatöl von *Cardamine impatiens* (Brassicaceae) enthält Acylglycerine mit vicinalen, monoacetylierten Dihydroxyfettsäureresten der Kettenlängen C_{18}, C_{20}, C_{22} und C_{24} [86].

Eine weitere Gruppe von pflanzlichen Mono- oder Dihydroxyfettsäuren kommt in den Harzglykosiden verschiedener Convolvulaceae (Windengewächse) vor. Hier sind zumeist Jalapinolsäure ((11*S*)-OH 16:0), Convolvulinolsäure ((11*S*)-OH 14:0), Ipurolsäure ((3*S*, 11*S*)-diOH 14:0) oder (3*S*, 11*S*)-diOH 16:0 mit der Säurefunktion und einer

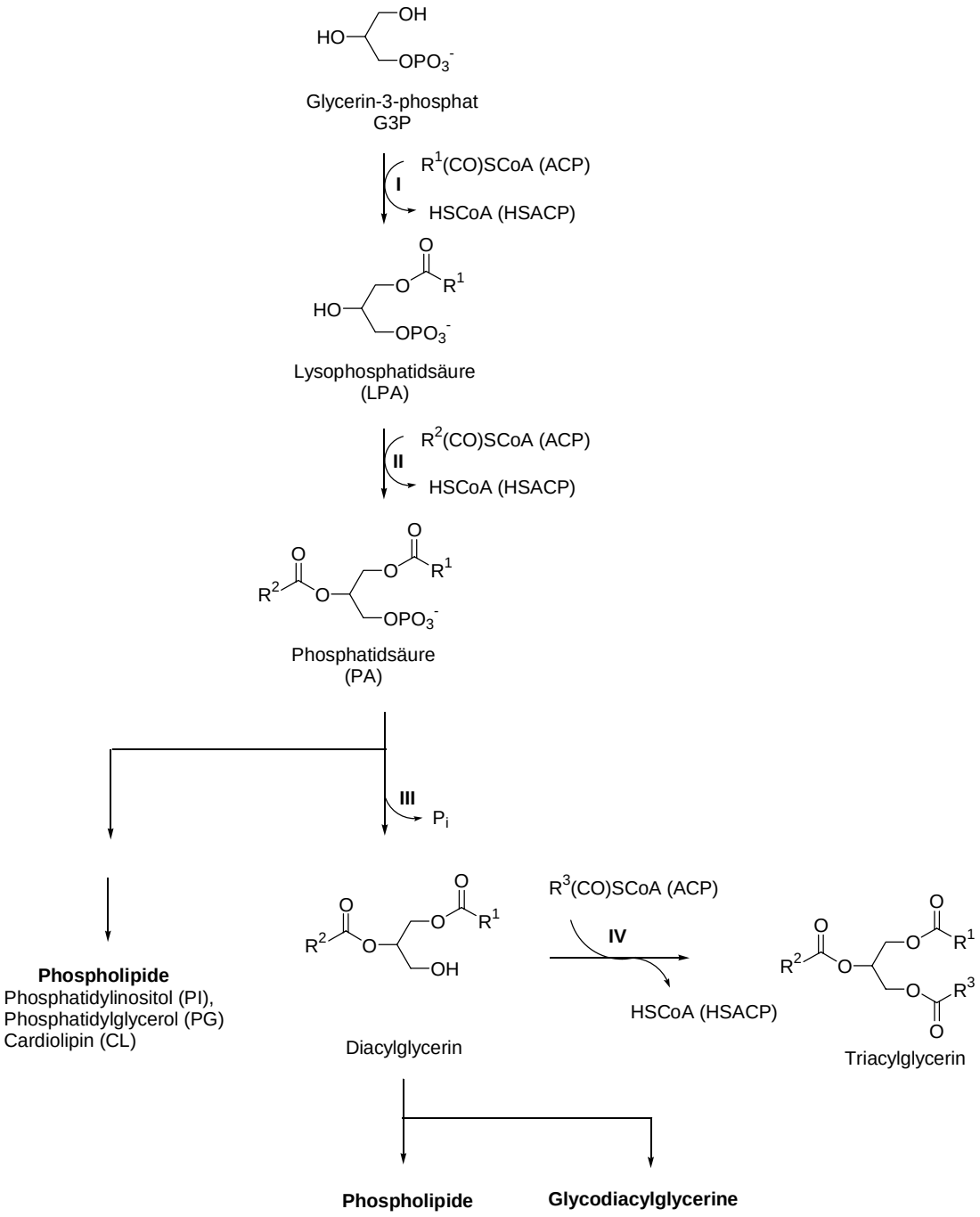
Hydroxyfunktion mit einem Oligosaccharid verknüpft [87-93]. Über die Biosynthese dieser Hydroxyfettsäuren gibt es nach unserem Kenntnisstand keine Untersuchungen.

Außer durch die schon erwähnten Reaktionen der Hydroxylierung, β-Oxidation oder einen polyketidanalogen Aufbau können sauerstoffhaltige Substituenten auch durch Lipoxygenasen oder α-Oxidation in Fettsäuren eingeführt werden [26,94]. Lipoxygenasen katalysieren die Einführung von Disauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer (1*Z*,4*Z*)-Pentadienstruktur. Die zunächst entstehenden Hydroperoxide werden zumeist entweder durch Hydroperoxid-Lyasen gespalten oder durch Hydroperoxid-Dehydrasen (auch Allenoxid-Synthasen) in Allenoxide überführt. Ein wichtiges Produkt des Lipoxygenase-Pfads ist z.B. das Phytohormon Jasmonsäure [94]. Durch α-Oxidation können Fettsäuren um C_1-Einheiten abgebaut werden [26].

3 Glycerolipide

Glycerolipide sind essentielle Membranbestandteile (z.B. Phospholipide und Glykolipide) und Energiespeicher (Triacylglycerine). Sie werden in pflanzlichen, wie auch in tierischen oder bakteriellen Zellen ausgehend vom Glycerin-3-phosphat synthetisiert. Nachgewiesen wurde die *de novo* Biosynthese in verschiedenen Zellkompartimenten, wie Plastiden, Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat [20].
In sukzessiv ablaufenden Reaktionen wird *sn*-Glycerin-3-phosphat unter Katalyse zweier diskreter Acyltransferasen Acyl-CoA(ACP):*sn*-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT) und Acyl-CoA(ACP):*sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (LPAAT) zunächst in das Lysophosphatid und anschließend in das *sn*-1,2-Diacylglycerin-3-phosphat überführt. Unter Einwirkung einer Phosphatidsäure Phosphatase kann das 1,2-Diacylglycerin gebildet werden, welches ein Vorläufer für Triacylglycerine, verschiedene Phospholipide und Glycodiacylglycerine darstellt (s. **Schema 3-1**). Die Triacylglycerine entstehen unter Katalyse durch Acyl-CoA(ACP):*sn*-1,2-Diacylglycerin-Acyltransferase (DAGAT) [95-97].

Bei Pflanzen können Glycerolipide in den Plastiden (prokaryotischer Weg) oder extraplastidal (eukaryotischer Weg), hier überwiegend im endoplasmatischen Retikulum, synthetisiert werden, was zu einer unterschiedlichen Verteilung der Acylreste führt [95].



Schema 3-1: Biosynthese von Glycerolipiden. I: Acyl-CoA(ACP):*sn*-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT), **II**: Acyl-CoA(ACP):*sn*-1-Acylglycerin-3-phosphat-Acyltransferase (LPAAT), **III**: Phosphatidsäure-Phosphatase, **IV:** Acyl-CoA(ACP):*sn*-1,2-Diacylglycerin-Acyltransferase (DAGAT).

4 Analytische Methoden

Da Blütenöle in reiner Form in einem vertretbaren Zeitaufwand nur in sehr geringen Mengen zu erhalten sind (s. **Abschnitt 6.2**), ist die Massenspektrometrie als Methode der Wahl zu ihrer Analytik anzusehen. Die Möglichkeiten zur *online*-Kopplung mit Chromatographiesystemen, bzw. die Analyse einzelner Ionen eines Gemisches mit tandemmassenspektrometrischen Methoden sollte eine zeitaufwändige *offline*-Trennung der Inhaltsstoffe überflüssig machen. In den folgenden Abschnitten werden die für diese Arbeit verwendeten Systeme und Methodiken in aller Kürze vorgestellt. Für detailliertere Informationen sei auf die angegebene Literatur verwiesen.

4.1 Gaschromatographie in Kopplung mit Massenspektrometrie

Gaschromatographie in Kopplung mit Massenspektrometrie ist in vielen Fällen die beste Methode, um komplexe Gemische aus unbekannten flüchtigen Substanzen oder solchen, die sich in flüchtige Derivate überführen lassen, zu analysieren. Hierfür gibt es zahlreiche Gründe, von denen nur einige genannt werden können. So ist die Trennleistung der Kapillarsäulen vielen anderen chromatographischen Methoden überlegen, es gibt eine große Auswahl von Belegungen, um Substanzen nach z.B. Siedepunkt oder Polarität zu trennen, benötigte Substanzmengen sind gering, die Methode ist heute anwenderfreundlich und vergleichsweise preiswert [98]. Standard-Systeme sind zumeist mit einem *Single-Quadrupole*-Analysator ausgestattet [99], so auch das von uns verwendete MD 800 der Firma Fison Instruments. Ein Großteil der Messungen wurde jedoch an einem GC/MS-System mit *Time-of-flight*-Analysator (TOF-Analysator) durchgeführt. Da dies kein Standardverfahren ist, soll es hier kurz erläutert werden.

Ein schematischer Aufbau des GCT^{TM} der Firma Micromass ist in **Abb. 4-1** wiedergeben [100]. Es wurde mit einer Elektronenstoß-Ionisations-Quelle (EI-Quelle) betrieben. Der Aufbau des Geräts erlaubt durch mehrfache Ionenfokussierung die Aufnahme hochaufgelöster Massenspektren (R=7000) und die Bestimmung exakter Massen (maximale Abweichung 5 mDa). Die in der Gasphase an unterschiedlichen Positionen erzeugten Ionen werden während der Extraktion aus der Quelle durch ein elektrisches Linsensystem räumlich fokussiert. Durch die räumliche Fokussierung tritt eine Geschwindigkeitsverteilung auf, da die Ionen unterschiedliche Wegstrecken in den elektrischen Feldern zurückgelegt haben. Durch orthogonale Beschleunigung wird eine Geschwindigkeitsverteilung entlang der TOF-Achse eliminiert. Eine weitere Kompensation der Energieverteilung erfolgt im Reflektron [101-105].

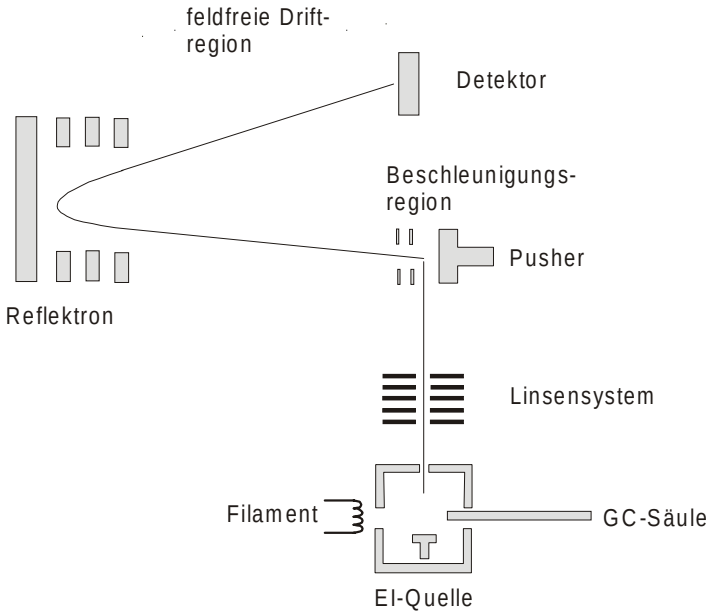


Abb. 4-1: Schematischer Aufbau eines GC/TOF-Instruments.

4.2 ESI-Massenspektrometrie

Während die EI-Massenspektrometrie für thermisch stabile, flüchtige und überwiegend unpolare Substanzen prädestiniert ist, eignet sich die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) überwiegend für polare Substanzen, die auch bis zu einem gewissen Grad thermisch labil sein dürfen. Bezüglich elektrochemischer Prozesse und Ionisierungsmodellen sei an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur verwiesen [106-110].

4.3 Tandem-Massenspektrometrie

Bei tandemmassenspektrometrischen Verfahren wird aus einem Gemisch von Ionen ein Teil ausgewählt und damit weitere massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Häufig wird nach der Auswahl eine Fragmentierung durch Stöße der beschleunigten Ionen mit Inertgas-Atomen angeregt (*Collisionally Activated Dissociation*, CID) [111,112]. Die Informationen, die aus einem CID-Spektrum erhalten werden können, hängen im wesentlichen davon ab, mit welcher Energie die Stoßexperimente durchgeführt werden, so wird zwischen *high-energy* und *low-energy* CID-Experimenten unterschieden. Erstgenannte sind besonders in der Lipidanalytik interessant, da sie vergleichbar mit der EI-Massenspektrometrie zur Spaltung von C-C-Bindungen führen [113-115]. Für unsere Untersuchungen stand ein *Triple-Quadrupole*-Gerät mit Elektrospray-Ionisation zur Verfügung, mit dem *low-energy* CID-Spektren erhalten werden. Auch solche Geräte sind verschiedentlich für die Lipidanalytik eingesetzt worden [116-118]. Zur Funktionsweise eines *Triple-Quadrupole*-Analysators sei auf die Ausführungen von W. D. Lehmann verwiesen [119].

5 Ergebnisteil

In **Abschnitt 5.1** bis **Abschnitt 5.6** werden die für Blütenöle entwickelten Analyseverfahren und deren Ergebnisse vorgestellt. Derivatisierungsmethoden für verschiedene analytische Fragestellungen werden an der Stelle ihrer jeweiligen ersten Anwendung erläutert. Diskussionen der Massenspektren erfolgen in herabgesetzter Schriftgröße. Blütenöle mit ähnlicher Zusammensetzung werden jeweils in einem Abschnitt zusammengefaßt.
Ein Vergleich der Inhaltsstoffe von Blütenölen, eine Diskussion speziesübergreifender, biosynthetischer Zusammenhänge, sowie Betrachtungen zur Entstehung von Blütenölen und Ölblumen werden in **Abschnitt 5.7**, separiert von der analytischen Fragestellung, vorgenommen.

5.1 Blütenöle aus (3*R*)-3-Acyloxyfettsäuren

5.1.1 Das Blütenöl von *Angelonia pubescens* (Scrophulariaceae)

***Fatty Acid Methyl Ester Profiling* - Allgemeines**

Bei Lipidproben, welche Fettsäuren in freier oder gebundener Form beinhalten, ist es oftmals zweckmäßig, zunächst die Strukturen der Fettsäuren zu bestimmen, bevor untersucht wird, ob und wenn ja, wie sie mit anderen molekularen Bausteinen verknüpft sind. Als Standardverfahren hat sich das *Fatty Acid Methyl Ester Profiling* (*FAME Profiling*) etabliert. Hierbei werden gebundene und/oder freie Fettsäuren in die flüchtigen Methylester überführt und anschließend mittels gaschromatographischer Verfahren unter Verwendung von Standardsubstanzen identifiziert oder durch Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie so weit möglich strukturaufgeklärt [120].

In der Literatur beschriebene Methoden zur Darstellung von Fettsäuremethylestern im analytischen Maßstab können in vier Gruppen eingeteilt werden: (a) sauer katalysierte Umsetzungen mit Methanol [121-125], (b) basisch katalysierte Umesterungen [121-123,126], (c) pyrolytische Verfahren [127-131] und (d) Methylierungen mit Diazomethan oder Methyliodid [120,121]. Während mit Methoden (a) und (c) sowohl freie, als auch *O*- oder *N*- gebundene Fettsäuren erfaßt werden, werden mit (b) nur *O*-gebundene, nicht aber freie oder *N*-gebundene Fettsäuren in die Methylester überführt [121]. Mit Methode (d) werden ausschließlich freie Fettsäuren erfaßt; sie wird oftmals nach vorheriger Hydrolyse einer Lipidprobe angewandt [120].

Welche Methode vorteilhaft zu verwenden ist, hängt von der Zusammensetzung der zu untersuchenden Lipidprobe ab, so kann jedes der hier aufgeführten Derivatisierungsverfahren bei ungeeignet substituierten Fettsäuren zu unerwünschten Nebenprodukten führen [120-131]. Detailliertere Untersuchungen, welches Verfahren für Blütenöle geeignet ist, wurden bisher nicht veröffentlicht. Sofern aus den Sekreten Fettsäuremethylester dargestellt wurden, wurde hierzu die Reaktionsfolge Verseifung und Methylierung mit Diazomethan [2] oder saure katalysierte Umsetzungen mit H_2SO_4 oder BF_3 in MeOH [3,4] verwendet. In lediglich einer Publikation wurden Gaschromatogramme (Fettsäuremethylester aus den Blütenölen von *Lysimachia vulgaris* und *Lysimachia punctata*, beide in der Pflanzenfamilie Primulaceae) abgebildet [3]. Es wurden nur die zu Hauptpeaks gehörigen Feldionisations-Massenspektren diskutiert, so dass für den Leser nicht erkennbar ist, ob die übrigen Signale auf weitere, nichtidentifizierte Bestandteile des Blütenöls oder auf Derivatisierungsartefakte zurückzuführen sind.

Da von Blütenölen bekannt ist, dass sie sowohl Fettsäuren, als auch Acylglycerine enthalten können, wurde in der vorliegenden Arbeit als erster Zugang zu ihren Inhaltsstoffen eine sauer katalysierte Methanolyse mit anschließendem *FAME Profiling* durchgeführt. Aufgrund der leichten Handhabung und der vorliegenden detaillierten Untersuchungen zu Reaktionsgeschwindigkeiten mit verschiedenen Lipidklassen wurde als Säure Bortrifluorid gewählt, welche kommerziell als methanolische Lösung (Merck, Darmstadt) erhältlich ist [124]. Pyrolytische Verfahren, bei denen ebenfalls sowohl freie, als auch gebundene Fettsäuren in die Methylester überführt werden, schieden als alternative Derivatisierungsmethoden aus, da sie literaturbekannt nicht mit Hydroxyfettsäuren kompatibel sind [128,131].

Vorversuche zum *FAME Profiling* wurden mit dem Blütenöl einer *Calceolaria* Kulturform (Scrophulariaceae) durchgeführt. Nach den Ergebnissen von S. Vogel konnte angenommen werden, dass dieses überwiegend aus Acylglycerinen mit 3-Acetoxyacylresten besteht [2]. Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass als Nebenreaktion der sauren Methanolyse Eliminierung von Essigsäure auftreten kann. Sie wird vermieden, wenn die Reaktionsmischung nicht über 60 °C erwärmt wird (detaillierte Bedingungen s. **Abschnitt 6.3**). Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei 60 °C ist die Reaktion vollständig, d.h. nach anschließender Trimethylsilylierung konnten mittels GC/MS keine Reste an Acylglycerinen nachgewiesen werden.

Nach der sauren Methanolyse wurden die Fettsäuremethylestergemische mit *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) umgesetzt (s. **Abschnitt 6.4**), um die gaschromatographischen Trenneigenschaften der Hydroxyfettsäuremethylester durch Trimethylsilylierung zu verbessern [132-134].

Fatty Acid Methyl Ester Profiling - Angelonia pubescens

Abb. 5-1 zeigt das Chromatogramm des Blütenöls von *Angelonia pubescens* nach sauer katalysierter Methanolyse (30 min) und nachfolgender Trimethylsilierung. Identifiziert wurden ausschließlich 3-Trimethylsiloxyfettsäuremethylester und 3-Acetoxyfettsäuremethylester[1]. Die Massenspur bei *m/z* 175 zeigt die Signale der 3-Trimethylsiloxyfettsäuremethylester mit Kettenlängen von C_{14}, C_{16}, C_{18} und C_{20}, die Spur bei *m/z* 43 die der analogen 3-Acetoxyfettsäuremethylester.

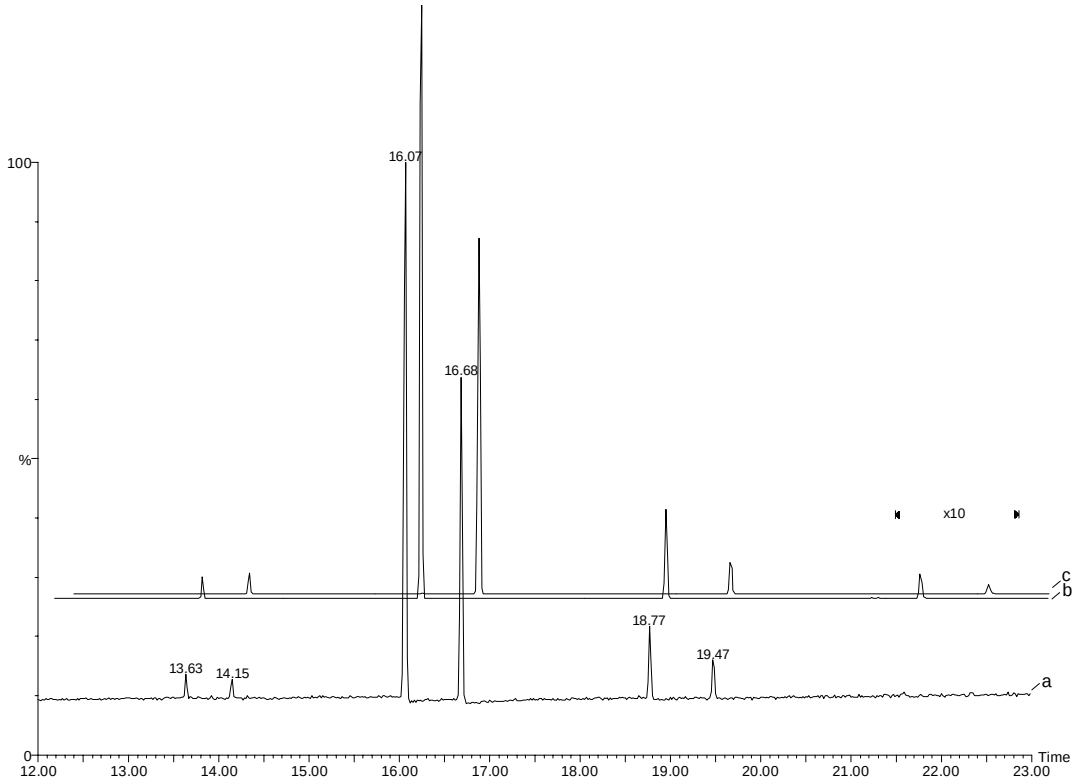


Abb. 5-1: **Fettsäuremethylesterprofil des Blütenöls von *A. pubescens.*** (a) TIC (b) Massenspure *m/z* 175, (c) Massenspur *m/z* 43 ((b) und (c) leicht versetzt). Bedingungen: **GCT 1**. Methylester von **RT 13.63 min** 3-OTMS 14:0, **14.15** 3-OAc 14:0, **16.07** 3-OTMS 16:0, **16.68** 3-OAc 16:0, **18.77** 3-OTMS 18:0, **19.47** 3-OAc 18:0, **21.58** 3-OTMS 20:0, **22.33** 3-OAc 20:0.

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte mit Hilfe der typischen Massenspektren. Die 3-Trimethylsiloxyfettsäuremethylester zeigen ein intensives Ion $[MeO(CO)CH_2CH(OTMS)]^+$ bei $m/z_{calc.}$ 175,079 resultierend aus einer α-Spaltung. Aus dem Ion $[M\text{-}Me]^+$ kann die Anzahl der C-Atome bestimmt werden [132,133]. Kommerziell erhältlicher 3-Hydroxypalmitinsäuremethylester (Sigma, St. Louis, U.S.A.) wurde

[1] Die verkürzte Reaktionszeit wurde gewählt, damit die Acetylreste nicht vollständig durch Methanolyse abgespalten werden und so im Fettsäuremethylesterprofil nachweisbar sind. Dies ist bei Blütenölen aus überwiegend freien Fettsäuren möglich, da die Veresterung freier Fettsäuren deutlich schneller verläuft, als die Umesterung [124].

ebenfalls mit MSTFA derivatisiert und koinjiziert. Koelution gab keinen Hinweis auf Methylverzweigungen in der Kohlenstoffkette.
Charakteristische Fragmente der 3-Acetoxyfettsäuremethylester sind $[M\text{-}Ac]^+$, $[M\text{-}HOAc]^+$, ein Doppelpeak bei $[M\text{-}HOAc\text{-}MeO]^+$ und $[M\text{-}HOAc\text{-}MeOH]^+$, sowie ein Signal bei $[M\text{-}74\text{-}HOAc\text{-}MeOH]^+$. Der Basepeak der Spektren liegt bei $m/z_{calc.}$ 43,0184 ($[CH_3CO]^+$). Die Position der Acetoxyfunktion läßt sich zwar nicht direkt aus den Spektren entnehmen, ergibt sich aber aus den trimethylsilylierten Hydrolyseprodukten.

GC/MS-Analyse nach Trimethylsilylierung - Allgemeines

Bei der für das *FAME Profiling* verwendeten sauren Methanolyse werden Ester- und Amidbindungen gespalten. Um mittels GC/MS zu untersuchen, ob die Fettsäuren in Blütenölen in freier oder gebundener Form vorliegen, bzw. um den Acylierungsgrad zu bestimmen, war eine nicht C(*O*)-X bindungsspaltende Derivatisierungsmethode (X=*O*,*N*) zu verwenden. Speziell bei Lipidmischungen wird in der Literatur in diesem Zusammenhang oft von Methylierungen mit Diazomethan berichtet [135-137]. Auch bei der Blütenölanalytik (*Oncidium pubes,* Orchidaceae) wurde dieses Verfahren von J. Marsaioli *et al.* angewandt [6].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Trimethylsilylierung der Vorrang gegeben. Hierdurch würden nicht nur Säuren in leichter flüchtige Verbindungen überführt, sondern auch die zu erwartenden Mono- und Diacylglycerine [2-4]. Dies verbessert zum einen deren gaschromatographischen Eigenschaften und zum zweiten konnte angenommen werden, dass aus den EI-Massenspektren der Trimethylsilylether Rückschlüsse auf die vorliegenden Regioisomere möglich sind. Entsprechende Untersuchungen wurden bei Blütenölen bislang nicht durchgeführt.

Wie bei den Hydroxyfettsäuremethylestern wurde als Trimethylsilylierungsmittel MSTFA verwendet. Das Reagenz und sein Reaktionsprodukt sind flüchtig, so dass die Probe vor der Injektion nicht aufgearbeitet werden muß. Die Derivatisierungen der Blütenöle waren jeweils nach zwei Stunden Reaktionszeit in Dichlormethan bei Raumtemperatur abgeschlossen (s. **Abschnitt 6.4**).

GC/MS-Analyse nach Trimethylsilylierung - *Angelonia pubescens*

Das GC/MS-Experiment nach Trimethylsilylierung des Blütenöls von *Angelonia pubescens* (s. **Abb. 5-2**) zeigt, dass das ursprüngliche Sekret überwiegend aus freien 3-Acetoxyfettsäuren besteht, detektiert wurden die entsprechenden Trimethylsilylester. Lediglich in Spuren werden Hexadec-2-en- und Octadec-2-ensäuretrimethylsilylester, sowie 3-Trimethylsiloxypalmitin- und 3-Trimethylsiloxystearinsäuretrimethylsilylester nachgewiesen. Bei den ungesättigten Verbindungen handelt sich um Reaktionsartefakte aus der Trimethylsilylierung mit MSTFA, wie ein Vergleich mit dem Fettsäuremethyl-

ester-Profil zeigt, bei dem keine ungesättigten Fettsäuren beobachtet wurden. 3-Acetoxyfettsäuren reagieren mit Basen sehr leicht unter Eliminierung von Essigsäure. Die Basizität des MSTFA reicht offenbar aus, um zu den Nebenprodukten zu führen. Da diese jedoch leicht als artifiziell zu erkennen sind und nur in Spuren gebildet werden, genügt die Methode einer qualitativen Untersuchung.

Bei einer Retentionszeit von 25.68 min wird in Spuren der Trimethylsilylether des 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerins **V** gefunden. Die Verbindung ist Hauptkomponente in zahlreichen anderen Blütenölen.

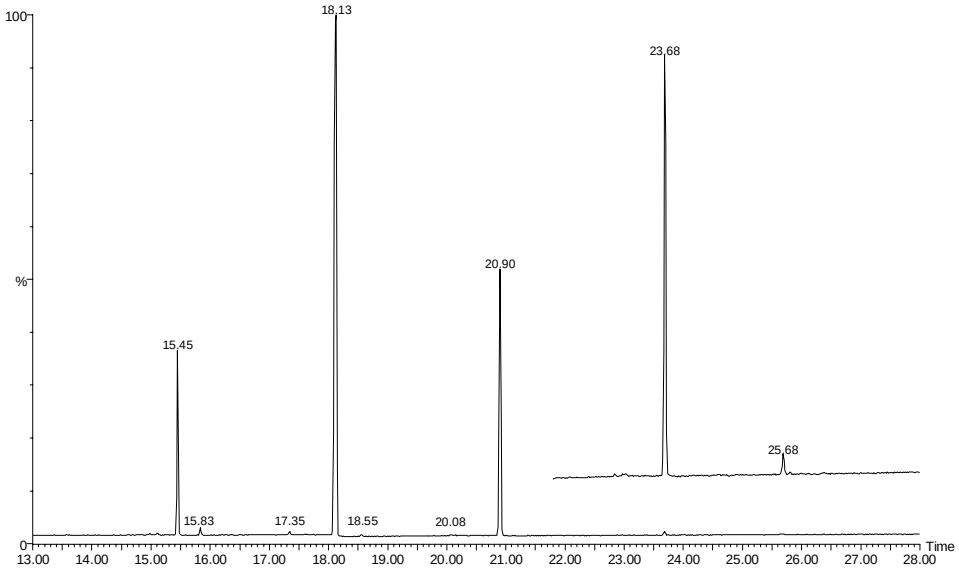


Abb. 5-2: Gaschromatogramm des Blütenöls von *A. pubescens* nach Trimethylsilylierung mit MSTFA. Eingeschoben ist ein Auszug eines Chromatogramms, bei dem höhere Substanzmengen injiziert wurden. Bedingungen: **GCT 1**. TMS-Ester, bzw. TMS-Ether von **RT 15.45 min** 3-OAc 14:0 (12,1 %), **15.83** 16:1(2) (0,6 %), **17.35** 3-OTMS 16:0 (0,4 %), **18.13** 3-OAc 16:0 (65,2 %), **18.55** 18:1(2) (0,2 %), **20.08** 3-OTMS 18:0 (0,3%), **20.90** 3-OAc 18:0 (20,8%), **23.68** 3-OAC 20:0 (0,4 %), **25.68** 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **V** (Spur)[2].

Die Trimethylsilylester der 3-Acetoxyfettsäuren zeigen charakteristische EI-Massenspektren, die nach unserem Kenntnisstand in der Literatur noch nicht beschrieben sind. Als Beispiel ist das Massenspektrum von 3-Acetoxymyristinsäuretrimethylsilylester in **Abb. 5-3** wiedergegeben. Beobachtet werden im hohen Masse-zu-Ladungs-Bereich die Ionen $[M\text{-}Ac]^+$ und $[M\text{-}HOAc]^+$ bei *m/z* 315,235 ($m/z_{calc.}$ 315,236), bzw. *m/z* 298,233 ($m/z_{calc.}$ 298,233) allerdings mit schwacher Intensität. Das erste Ion mit höherer Intensität ist $[M\text{-}Me\text{-}HOAc]^+$ bei *m/z* 283,207 ($m/z_{calc.}$ 283,209). Das Ion $[TMSO(CO)]^+$ bei *m/z* 117,032 ($m/z_{calc.}$ 117,037) ist typisch für trimethylsilylierte Carbonsäuren. Im Fall der 3-Acetoxyfettsäuretrimethyl-

[2] Alle bezüglich GC/MS-Chromatogrammen angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die Peakfläche im *Total Ion Chromatogram* (TIC).

silylester kann durch Umlagerung zusätzlich ein isobares Fragment $[AcOSi(CH_3)_2]^+$ entstehen. Signale bei $m/z_{calc.}$ 75,027 und $m/z_{calc.}$ 73,047 sind charakteristisch für trimethylsilylierte Verbindungen, während das Signal bei m/z 43,023 auf die Acetoxyfunktion hinweist. Das Ion bei m/z 161,059, mit der möglichen Struktur $[TMSO(CO)CH_2C(OH)H]^+$ ($m/z_{calc.}$ 161,063), weist auf die Position der Acetoxyfunktion am C-3 hin. Alle gemessenen Massen stimmen innerhalb einer Fehlertoleranz von 5 mDa mit den berechneten Massen überein.

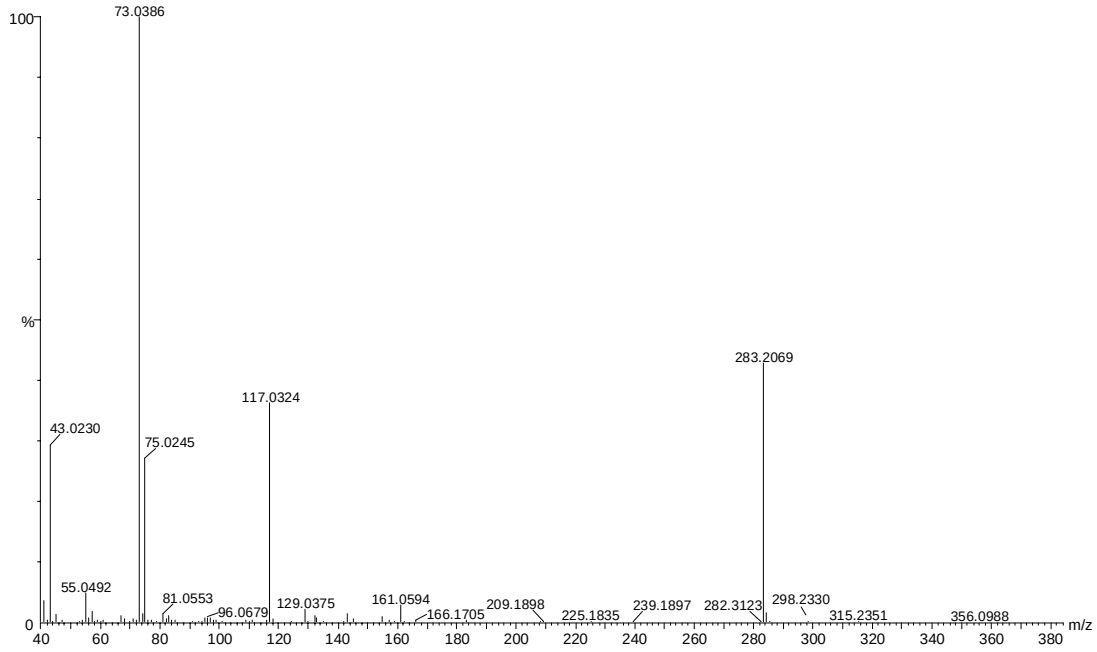


Abb. 5-3: EI-Massenspektrum (GCT) von 3-Acetoxypalmitinsäuretrimethylsilylester.

Die Massenspektren der TMS-Ester von 2,3-ungesättigten Fettsäuren sind charakteristisch und liegen in der NIST-Datenbank (National Institute of Standards and Technologie) vor. Die in dieser Probe ebenfalls nur in Spuren vorkommenden 3-Trimethylsiloxyfettsäuretrimethylsilylester wurden anhand des Ions $[TMSO(CO)CH_2CHOTMS]^+$ bei $m/z_{calc.}$ 233,103 und der jeweiligen Fragmente $[M\text{-}Me]^+$ identifiziert. Die Strukturaufklärung von 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **V** wird in **Abschnitt 5.2** beschrieben.

Bestimmung der absoluten Konfiguration von 3-Acetoxyfettsäuren - Allgemeines

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von 3-Hydroxyfettsäuren, die aus den 3-Acetoxyfettsäuren der Blütenöle nach saurer Methanolyse in Form ihrer Methylester erhalten werden, wurden in der Literatur unterschiedliche Methoden beschrieben. Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zur Bestimmung über den Drehwert [138], chiroptische Methoden [33] oder NMR-Untersuchungen an Mosher-Ester-Derivaten [87] sind Reinstoffe erforderlich. Die Methoden in der zweiten Gruppe beruhen auf einem Vergleich von Retentionszeiten mit Standards in der Hochleistungs-Flüssigkeits-chromatographie (HPLC) [139] oder der GC [34,140,141] und benötigen somit keine Substanzisolierungen. Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen und der größeren Probenanzahl waren für unsere Zwecke Methoden aus der zweiten

Gruppe und hier insbesondere GC-Methoden geeignet. In der Literatur beschriebene Verfahren beruhen auf einer Reduktion der 3-Hydroxyfettsäuren zu den 1,3-Diolen und anschließender Trennung der Enantiomeren auf einer chiral belegten Kapillarsäule [33] oder einer Derivatisierung der Carbonsäure- [34,140] oder der Hydroxyfunktion [141] mit chiralen, enantiomerenreinen Reagenzien und anschließender Trennung auf achiral belegten Säulen.

Die Verwendung chiraler Kapillarsäulen kam für unsere Aufgabenstellung nicht in Frage, da ihre Temperaturbeständigkeit für die Derivate der längerkettigen 3-Hydroxyfettsäuren aus Blütenölen nicht ausreichen würde [33]. Bezüglich der Derivatisierung mit chiralen Reagenzien wurden in den neueren Publikationen von verschiedenen Autoren (1´*S*)-1´-Phenylethylamide von 3-Methoxyfettsäuren aus 3-Hydroxyfettsäuren dargestellt. Obwohl verschiedene Methoden entwickelt wurden, ist jeweils mindestens eine dreistufige Derivatisierung erforderlich [34,140]. In einer älteren Publikation von S. Hammarström wird über die Derivatisierung der Hydroxyfettsäuremethylester in einer einstufigen Reaktion mit (2*S*)-2-Phenylpropionsäurechlorid berichtet [141]. Obwohl die resultierenden Verbindungen auf gepackten Säulen nicht vollständig getrennt werden konnten, wurde aufgrund der Simplizität und Schnelligkeit der Derivatisierung in dieser Arbeit getestet, ob der Fortschritt in der Gaschromatographie nun eine vollständige Trennung der diastereomeren Derivate erlaubt.

Als chiraler Standard wurde der nicht kommerziell erhältliche (3*R*)-3-Hydroxypalmitinsäuremethylester synthetisch dargestellt. Hierzu wurde Myristinsäurechlorid mit Meldrums Säure in Dichlormethan unter Katalyse durch Pyridin umgesetzt [142,143]. Erwärmung des Rohprodukts zum Rückfluß in Methanol über 4 h ergab 3-Ketopalmitinsäuremethylester in einer Ausbeute von 61 % nach Chromatographie über Kieselgel. Der 3-Ketopalmitinsäuremethylester wurde nach R. Noyori mit Wasserstoff unter Katalyse durch Dichloro[(*R*)-(+)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]ruthenium (II) in einer Ausbeute von 96 % enantioselektiv (e.e. 93 %) zum (3*R*)-3-Hydroxypalmitinsäuremethylester reduziert [144,145] (s. auch **Abschnitt 6.5** und **Abschnitt 6.6**).

Racemische Standards wurden aus den Blütenölen selbst durch Oxidation mit Kaliumdichromat und Rückreduktion mit Natriumborhydrid dargestellt (s. **Abschnitt 6.7**) [146].

Kommerziell erhältliche (2*S*)-2-Phenylpropionsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde mit Thionylchlorid zum Säurechlorid umgesetzt [141]. Die 3-Hydroxyfettsäuremethylester wurden mit dem Säurechlorid unter Katalyse durch Pyridin derivatisiert. Gaschromatographie der Derivate erfolgte, analog zu den vorher beschriebenen Experimenten, auf einer unpolar belegten Kapillarsäule (DB-5 MS, J & W Scientific).

Bestimmung der absoluten Konfiguration von 3-Acetoxyfettsäuren - *Angelonia pubescens*

Abb. 5-4 zeigt die Chromatogramme der mit (2*S*)-2-Phenylpropionylchlorid derivatisierten 3-Hydroxyfettsäuremethylester aus dem Blütenöl von *Angelonia pubescens*. Für die Aufnahme des unten abgebildeten Chromatogramms wurden die 3-Hydroxyfettsäuremethylester partiell racemisiert (s. **Abschnitt 6.7**). Die Signale der diastereomeren Derivate sind vollständig voneinander getrennt. Der Vergleich mit dem synthetischen Standard (nicht abgebildet) zeigt, dass sich die zuerst eluierenden diastereomeren Derivate von den (3*R*)-3-Hydroxyfettsäuren ableiten. D.h. bei den Verbindungen aus dem Blütenöl von *A. pubescens* handelt es sich um die (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren. Der Anteil der enantiomeren Verbindungen liegt unter der Nachweisgrenze.

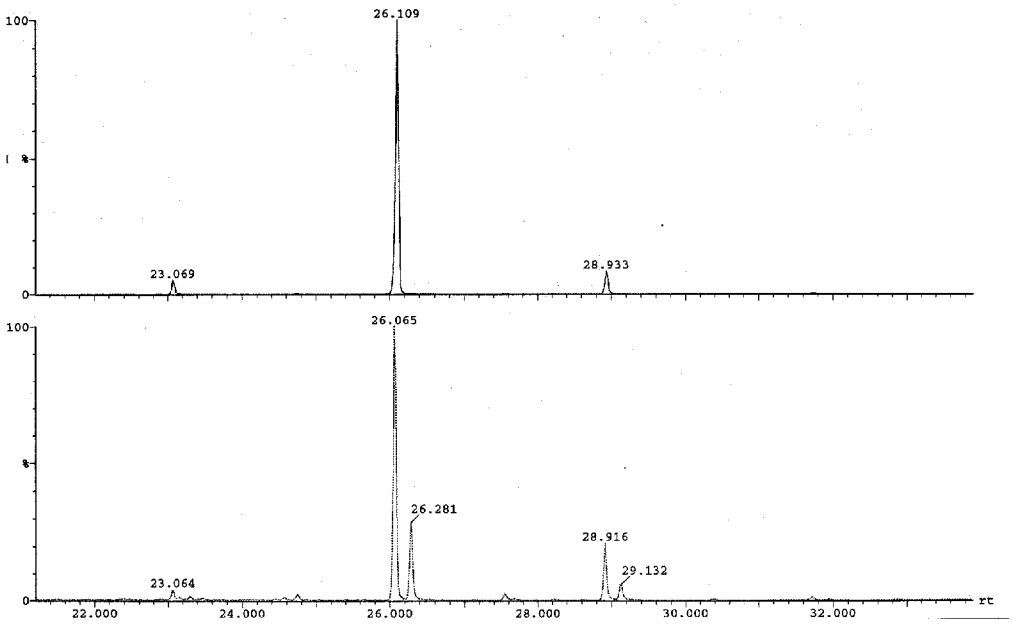


Abb. 5-4: Gaschromatogramm von 3-[(2*S*)-2-Phenylpropionyl)-oxy]fettsäuremethylestern aus dem Blütenöl von *A. pubescens.*
Bedingungen: **MD 1**. Oben: (3*R*)-3-[(2*S*)-2-Phenylpropionyl)oxy]-fettsäuremethylester, unten: (3*RS*)-3-[(2*S*)-2-Phenyl-propionyl)oxy]fettsäuremethylester.

Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie - Allgemeines

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Analysemethodik zu entwickeln, mit der eine weitgehende Charakterisierung der Inhaltsstoffe aus Blütenölen, unabhängig von ihren physikalischen Eigenschaften, möglich sein sollte. Um zu überprüfen, ob in Blütenölen sehr polare, höhermolekulare oder thermisch labile Substanzen (z.B. Triacylglycerine von Hydroxyfettsäuren oder komplexe Lipide) enthalten sind, die der Gaschromatographie nicht mehr zugänglich sein könnten, wurden von den nichtderivatisierten Sekreten Positiv- und Negativ-ESI-Massenspektren aufgenommen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden auf alle Proben die für Acylglycerine optimierten Bedingungen (Lösungsmittel, Zusatz von Ammoniumacetat, Elektrospray-Quellenparameter) übernommen (s. **Abschnitt 5.2**).

Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie - *Angelonia pubescens*

Das Positiv-ESI- und das Negativ-ESI-Massenspektrum des Sekrets von *Angelonia pubescens* sind jeweils in einer Gesamtübersicht und zwei Ausschnitten in **Abb. 5-5** und **Abb. 5-6** wiedergegeben. Alle Signale mit einer relativen Intensität von über 5 % lassen sich auf bereits mittels GC/MS strukturaufgeklärte Verbindungen zurückführen, so dass weitere Substanzen in signifikanten Mengen als Bestandteile des Blütenöls praktisch ausgeschlossen werden können.

Im Positiv-ESI-Spektrum werden im Masse-zu-Ladungs-Bereich *m/z* 240 bis *m/z* 400 nahezu ausschließlich Quasimolekülionen der mittels GC/MS strukturaufgeklärten (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren gefunden. Die Ionen entstehen bevorzugt durch Anlagerung eines Ammoniumions, es werden aber auch Ionen des Typs $[M+H]^+$ oder $[M+Na]^+$ beobachtet (s. **Tabelle 5-1**). Das Ion bei *m/z* 255,2 ist ein Fragment, welches überwiegend durch Abspaltung von Ammoniumacetat aus dem Ammoniumaddukt von (3*R*)-3-Acetoxypalmitinsäure entstehen dürfte. Bei *m/z* 279,1 wird in geringer Intensität ein Signal für das Natriumaddukt von Palmitinsäure gefunden. Es ist auf eine Verunreinigung in dem verwendeten Lösungsmittelgemisch zurückzuführen.
Das Ammoniumaddukt von 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **V** wird bei *m/z* 448,3 gefunden.
Im höheren Masse-zu-Ladungs-Bereich werden Clusterionen der (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren um ein Ammonium- oder bevorzugt ein Natriumion beobachtet. Die möglichen Clusterzusammensetzungen sind den entsprechenden Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen in **Tabelle A-1** im Anhang gegenübergestellt.

Auch im Negativ-ESI-Spektrum werden, hier in einem Masse-zu-Ladungs-Bereich von *m/z* 240 bis *m/z* 440 Quasimolekülionen der 3-Acetoxyfettsäuren gefunden. Es dominieren Ionen des Typs $[M-H]^-$, aber bedingt durch das Lösungsmittelgemisch aus Chloroform und Methanol besitzen auch die Ionen des Typs $[M+Cl]^-$ Bedeutung, welche gut an ihrem Isotopenmuster zu erkennen sind. Zusätzlich werden „Clusterionen" des Typs $[M+AcO]^-$ beobachtet (s. **Tabelle 5-1**). Da die Blütenöle selbst keinen Geruch nach Essigsäure aufweisen, kann angenommen werden, dass die Essigsäure ausschließlich aus dem Zusatz von Ammoniumacetat stammt. Das Anion von Palmitinsäure (*m/z* 255,0) und ein Fragment, welches durch Abspaltung von Essigsäure aus dem Anion des 3-Acetoxypalmitinsäure gebildet wird, werden in Analogie zum Positiv-ESI-Spektrum gefunden.

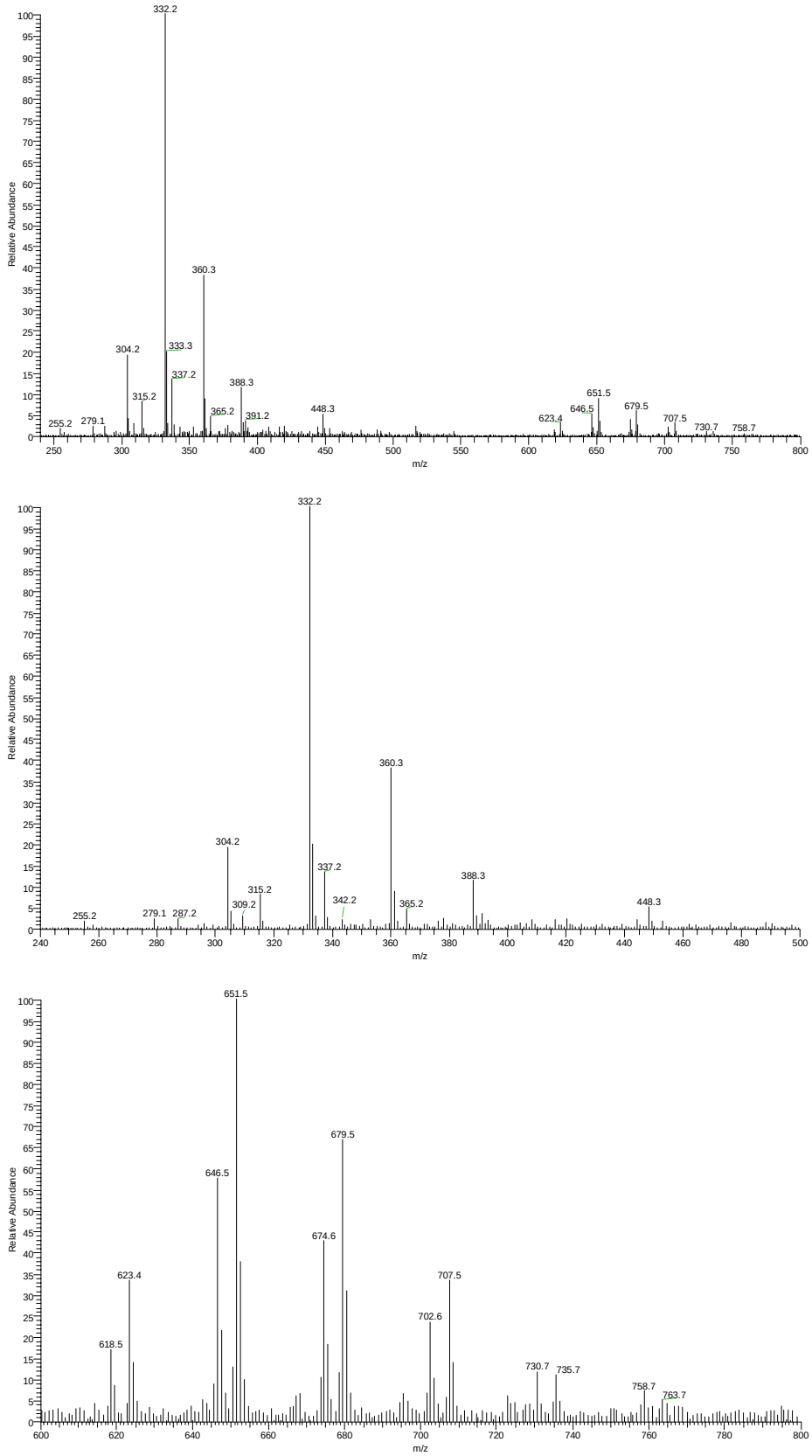


Abb. 5-5: Positiv-ESI-Spektrum des Blütenöls von *A. pubescens.* (a) Übersicht, (b) Ausschnitt *m/z* 240 bis *m/z* 500, (c) Ausschnitt *m/z* 600 bis *m/z* 800.

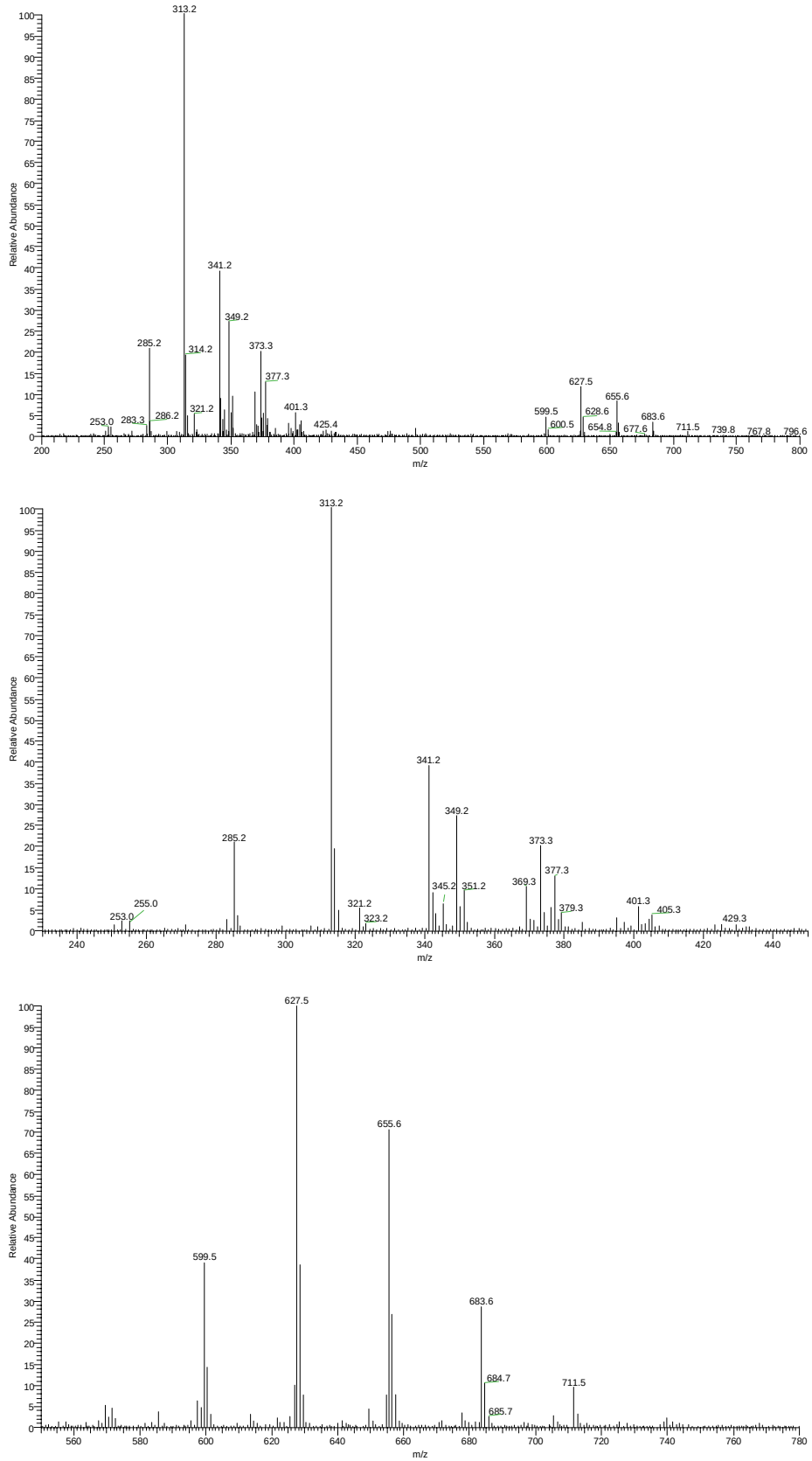


Abb. 5-6: Negativ-ESI-Spektrum des Blütenöls von *A. pubescens.* (a) Übersicht, (b) Ausschnitt *m/z* 230 bis *m/z* 450, (c) Ausschnitt *m/z* 550 bis *m/z* 780.

Das Anion des 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerins **V**, sowie das Cluster-Anion aus (3*R*)-3-Acetoxyeicosansäure und Essigsäure besitzen die gleiche nominelle Masse, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Ion bei *m/z* 429,3 durch eine Überlagerung der Signale für beide Ionen entsteht.
Im hohen Masse-zu-Ladungs-Bereich dominieren Cluster aus jeweils zwei langkettigen Fettsäuren (s. **Tabelle A-1**).

M	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$	$[M+Cl^-]^+$	$[M-H+HOAc]^-$
(3*R*)-OAc 14:0	287,2 (2,3)	304,2 (19,1)	309,2 (2,9)	285,2 (20,8)	321,2 (5,2)	345,2 (6,3)
(3*R*)-OAc 16:0	315,3 (8,3)	332,3 (100)	337,2 (13,3)	313,2 (100)	349,2 (27,2)	373,3 (20,1)
(3*R*)-OAc 18:0	342,3 (0,4)	360,3 (39,1)	365,3 (4,6)	341,3 (29,1)	377,2 (12,8)	401,3 (5,6)
(3*R*)-OAc 20:0	370,3 (n.b.)	388,3 (11,5)	393,3 (n.b.)	369,3 (10,3)	405,3 (3,7)	429,3 (1,3)

Tabelle 5-1: Quasimolekülionen der 3-Acetoxyfettsäuren aus dem Blütenöl von *A. pubescens* in Positiv- und Negativ-ESI-Spektren. (Gemessene *m/z*-Verhältnisse und relative Intensitäten in Klammern.)

5.1.2 Das Blütenöl von *Nierembergia scoparia* (Solanaceae)

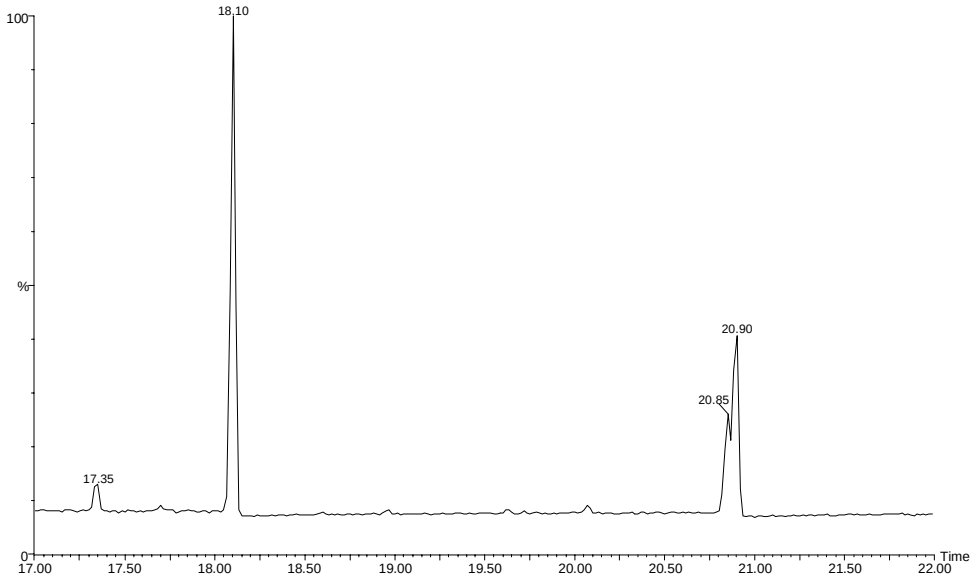


Abb. 5-7: Gaschromatogramm des Blütenöls von *N. scoparia* nach Trimethylsilylierung. Bedingungen: **GCT 1**. TMS-Ester von **RT 17.35 min** (3*R*)-OTMS 16:0 (3,6%), **18.10** (3*R*)-OAc 16:0 (56,5%), **20.07** (3*R*)-OTMS 18:0 (1,0%), **20.85** (3*R*)-O(*i*-5:0) 16:0 (13,5%), **20.90** (3*R*)-OAc 18:0 (23,0%).

Das Blütenöl von *Nierembergia scoparia* (Solanaceae) beinhaltet analog dem von *Angelonia pubescens* (Scrophulariaceae) (3*R*)-3-Acetoxy- und geringe Mengen der entsprechenden Hydroxyfettsäuren mit den Kettenlängen C_{16} und C_{18}. Dargestellt ist in **Abb. 5-7** das Chromatogramm, welches nach Umsetzung des Blütenöls mit MSTFA erhalten wurde. In teilweiser Überlagerung mit dem Peak für den (3*R*)-3-Acetoxystearinsäuretrimethylsilylester bei RT 20.90 min wird bei RT 20.85 min ein Signal gefunden, welches auf einen mit einer C_5-Säure acylierten (3*R*)-3-Hydroxypalmitinsäuretrimethylsilylester zurückzuführen ist. Die absolute Konfiguration der (3*R*)-3-Acyloxyfettsäuren wurde wie bei *A. pubescens* beschrieben bestimmt.

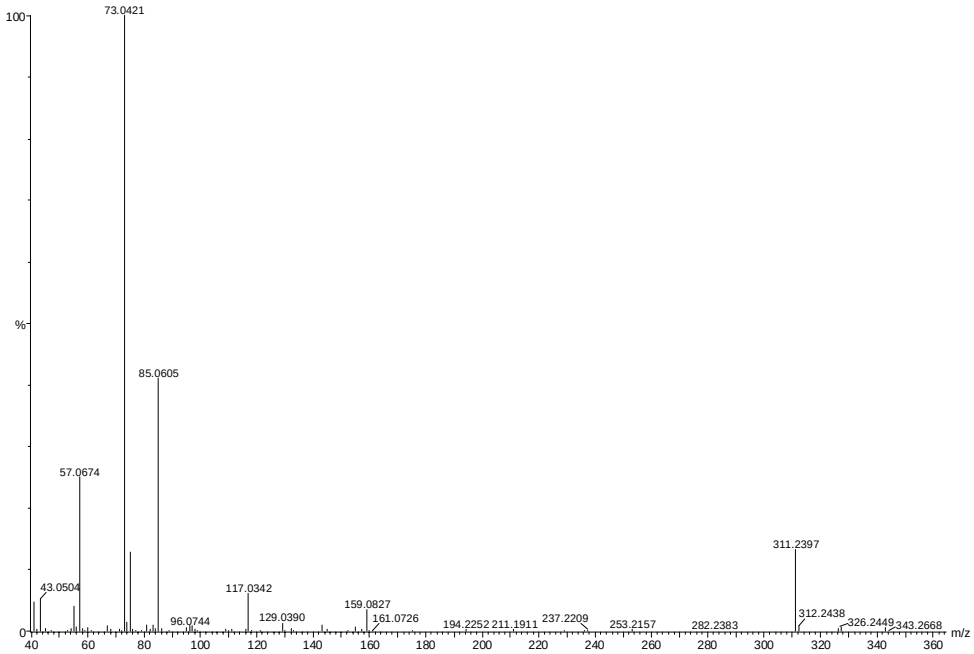


Abb. 5-8: EI-Massenspektrum (GCT) eines mit einer C_5-Säure acylierten 3-Hydroxypalmitinsäuretrimethylsilylesters.

Das Massenspektrum des mit einer C_5-Säure acylierten 3-Hydroxypalmitinsäuretrimethylsilylesters (s. **Abb. 5-8**) zeigt im hohen Masse-zu-Ladungs-Bereich die gleichen Fragmentionen wie der 3-Acetoxypalmitinsäuretrimethylsilylester bei *m/z* 343,254 ($m/z_{calc.}$ 343,267), *m/z* 326,245 ($m/z_{calc.}$ 326,264) und *m/z* 311,240 ($m/z_{calc.}$ 311,241). Es handelt es sich hier jedoch um die Ionen $[M\text{-}C_5H_9O]^+$, $[M\text{-}C_5H_{10}O_2]^+$ und $[M\text{-}C_5H_{10}O_2\text{-}Me]^+$. Die Ionen $[C_5H_9O_2SiMe_2]^+$ bei *m/z* 159,083 ($m/z_{calc.}$ 159,084, aus einer Umlagerung) und $[C_5H_9O]^+$ bei *m/z* 85,061 ($m/z_{calc.}$ 85,065), lassen den Rückschluß auf die C_5-Säure zu. Mit Ausnahme der beiden äußerst intensitätsschwachen Signale mit den höchsten Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen, liegen alle gemessenen Massen innerhalb der Toleranz von 5 mDa zu den berechneten Werten.

Kurzkettige Fettsäuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen werden biosynthetisch oftmals durch Transaminierung und oxidative Decarboxylierung aus Aminosäuren erhalten. Bei Fettsäuren mit fünf Kohlenstoffatomen sind Leucin oder Isoleucin mögliche Precursoren für 3-Methylbuttersäure, bzw. 2-Methylbuttersäure [147]. Neben diesen beiden Verbindungen sind nur noch Valeriansäure, bzw. 2,2-Dimethylpropionsäure

mögliche C_5-Säuren. Beide besitzen keine proteinogenen Aminosäuren als mögliche Vorläufer.

Aus den Massenspektren des 3-Acyloxyfettsäuremethylesters oder -trimethylsilylesters können keine Rückschlüsse auf eine mögliche Verzweigung des C_5-Acylrests getroffen werden. Hierzu müsste der Methylester der kurzkettigen Fettsäure mittels GC/MS untersucht werden. Alternativ könnte eine Identifizierung des Acylrests im Methylester von **3-OC_5H_{11} 16:0** durch Retentionszeitvergleich mit synthetischen Standards erfolgen.

Das in der Arbeit überwiegend verwendete Protokoll zur sauer katalysierten Umesterung erlaubte keine Detektion des C_5-Fettsäuremethylesters. Ursache ist die vergleichsweise hohe Wasserlöslichkeit und Flüchtigkeit. Das Reaktionsprotokoll umfaßt einen Schritt, bei welchem mit Wasser ausgeschüttelt wird und erfordert vor den gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchungen zumindest eine partielle Reduktion des Volumens.

Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge wurden keine Reaktionsprotokolle zur Analytik kurzkettiger Fettsäuren ausgearbeitet, sondern drei der insgesamt vier möglichen Verbindungen, namentlich 3-(Pentanoyloxy)-, 3-[(2-Methylbutanoyl)oxy]- und 2-[(3-Methylbutanoyl]hexadecansäure als Referenzsubstanzen synthetisiert. Ausgegangen wurde von dem synthetisch dargestellten 3-Ketopalmitinsäuremethylester, der in diesem Fall mit Natriumborhydrid reduziert und mit Kaliumhydroxid hydrolysiert wurde. Nach Umkristallisation wurden in relativ geringer Ausbeute, aber in hoher Reinheit (> 99 %, GC) 36 % 3-Hydroxypalmitinsäure erhalten (s. **Abschnitt 6.8**). Jeweils ein Teil hiervon wurde mit einem Überschuß an 2-Methylbuttersäure-, 3-Methylbuttersäure- oder Valeriansäurechlorid (s. **Abschnitt 6.9** und **Abschnitt 6.10**) umgesetzt. Je die Hälfte der Proben wurde mit Diazomethan in Et_2O methyliert (s. **Abschnitt 6.11**) oder mit MSTFA in Dichlormethan trimethylsilyliert. GC/MS-Analytik ergab, das neben der gewünschten Acyloxypalmitinsäure jeweils nur geringe Mengen an Hexadec-2-ensäure (bedingt durch das basische Reaktionsmedium) und nicht umgesetzte 3-Hydroxypalmitinsäure als Nebenkomponenten vorhanden waren, so dass die Rohprodukte ohne weitere Aufarbeitung als Standards eingesetzt werden konnten.

Identität des Analyten mit 3-[(3-Methylbutanoyl)oxy]hexadecansäure wurde durch Koelution des Analyten mit dem entsprechenden Standard auf zwei unterschiedlich belegten GC-Kapillarsäulen (DB-5 MS, J&W Scientific und SP-2560, Supelco), sowie durch Identität der Massenspektren gezeigt. Die Retentionszeiten sind in **Tabelle 5-2** wiedergegeben.

RT (DB-5MS)	Verbindung	RT (SP-2560)
21.31	3-[(2-Methylbutanoyl)oxy]hexadecansäuremethylester	52.94
21.33	3-[(3-Methylbutanoyl)oxy]hexadecansäuremethylester	53.51
21.97	3-(Pentanoyloxy)hexadecansäuremethylester	55.31

Tabelle 5-2: Identifizierung von 3-[(3-Methylbutanoyl)oxy]hexadecansäure.
Bedingungen: **MD 1** und **MD 2**.

ESI-massenspektrometrische Untersuchungen in Analogie zu denen bei *A. pubescens* ergaben keinen Hinweis auf bis hierher nicht strukturaufgeklärte Bestandteile im Blütenöl von *N. scoparia*.

5.1.3 Das Blütenöl von *Krameria lanceolata* (Krameriaceae)

In der Literatur wurden bereits 3-Acetoxyfettsäuren mit den Kettenlängen C_{16}, C_{18}, C_{20} oder C_{22} als Hauptbestandteile von Blütenölen verschiedener Krameriaceae-Arten benannt [8-10].

Das Blütenöl von *Krameria lanceolata* (Krameriaceae) wurde bislang nicht untersucht. Es wurde uns dankenswerterweise von Frau Dr. B. B. Simpson (University of Texas at Austin, USA) zur Verfügung gestellt, da die semi-parasitären Pflanzen nicht in Kultur gehalten werden können. Die von uns durchgeführten Experimente zeigen, dass auch das Sekret von *K. lanceolata* überwiegend aus freien 3-Acetoxyfettsäuren besteht, jedoch werden erstmals auch solche mit ungerader Kohlenstoffanzahl in signifikanten Mengen in Blütenölen nachgewiesen. Die Verteilung der Kettenlängen (C_{13}-C_{22}) ist verglichen mit den bisherigen Ergebnissen etwas breiter. Dargestellt ist dies in dem nach Trimethylsilylierung der Ölprobe erhaltenen Gaschromatogramm in **Abb. 5-9**. Zu den 3-Acetoxyfettsäuren analoge 3-Hydroxyfettsäuren werden in geringen Mengen gefunden. Gesättigte Fettsäuren (**14:0**, **15:0**, **16:0**, **18:0** und **22:0**) und langkettige primäre Alkohole mit 24 oder 26 Kohlenstoffatomen konnten als Nebenbestandteile der Probe nachgewiesen werden.

Die Identifizierung der nicht weiter funktionalisierten Fettsäuretrimethylsilylester erfolgte durch Vergleich der Spektren mit denen der NIST-Datenbank, die trimethylsilylierten primären Alkohole zeigen intensive Fragmente $[M\text{-}Me]^+$ und $[CH_2OTMS]^+$ aus denen die Anzahl der C-Atome und die funktionelle Gruppe abgeleitet werden können.

Drei langkettige Fettsäuren (**22:0**, **23:0** und **24:0**) werden als Methylester (NIST-Datenbank) detektiert. Da die Proben in TBME/MeOH gelagert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie möglicherweise ursprünglich als aktivierte Ester (z.B. Acyl-CoA) vorgelegen und mit dem Solvens reagiert haben.

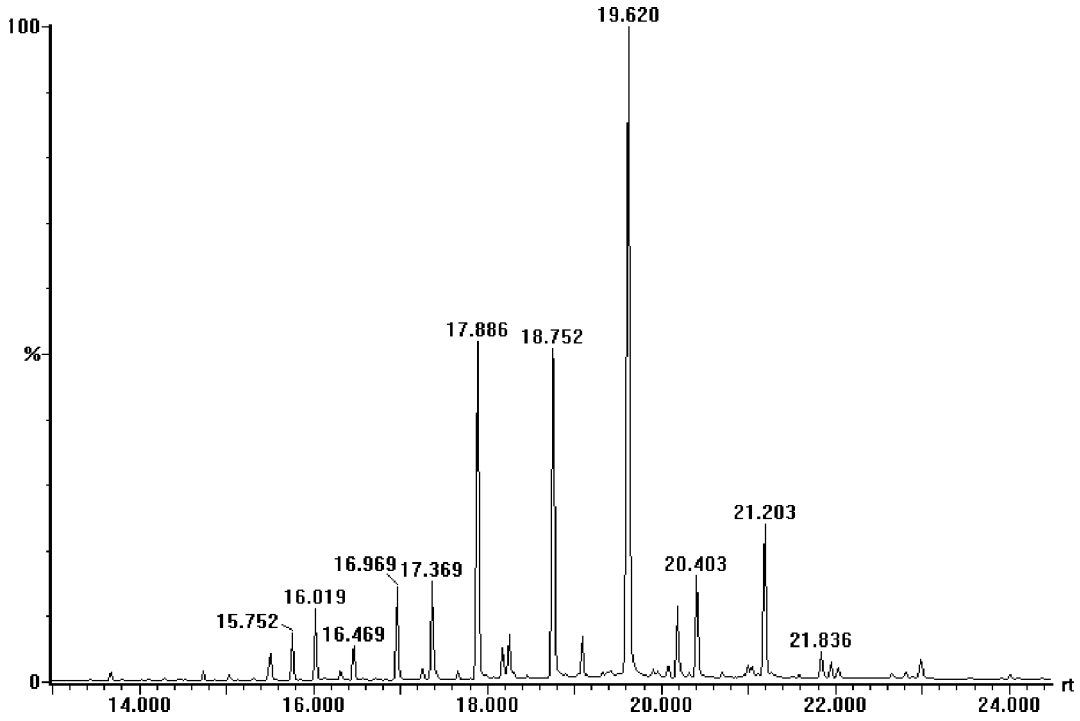


Abb. 5-9: Gaschromatogramm des Blütenöls von *K. lanceolata* nach Trimethylsilylierung. Bedingungen: **MD 3**. TMS-Ester, bzw. TMS-Ether von **RT 13.69 min** 14:0 (0,3 %), **14.74** 15:0 (0,3 %), **15.04** (3*R*)-OAc 13:0 (0,2 %), **15.52** (3*R*)-OTMS 14:0 (1,3 %), **15.75** 16:0 (1,6 %), **16.02** (3*R*)-OAc 14:0 (2,4 %), **16.47** (3*R*)-OTMS 15:0 (1,5 %), **16.97** (3*R*)-OAc 15:0 (3,4 %), **17.37** (3*R*)-OTMS 16:0 (3,6 %), **17.65** 18:0 (0,4 %), **17.89** (3*R*)-OAc 16:0 (13,1 %), **18.25** (3*R*)-OTMS 17:0 (1,6 %), **18.75** (3*R*)-OAc 17:0 (15,6 %), **19.10** (3*R*)-OTMS 18:0 (1,3 %), **19.62** (3*R*)-OAc 18:0 (31,0 %), **20.19** 22:0 (Methylester, 2,9 %), **20.40** (3*R*)-OAc 19:0 (4,4 %), **21.00** 23:0 (Methylester, 0,7 %), **21.05** 22:0 (0,5 %), **21.20** (3*R*)-OAc 20:0 (6,4 %), **21.84** 24:0 (Methylester, 1,1 %), **21.95** Tetracosan-1-ol (0,7 %), **22.04** (3*R*)-OAc 21:0 (0,7 %), **22.82** 24:0 (0,4 %), **22.99** (3*R*)-OAc 22:0 (1,0 %), **24.00** Hexacosan-1-ol (0,3 %).

Die absolute Konfiguration der 3-Hydroxyfettsäuremethylester konnte für die Fettsäuren mit Kettenlängen von 14-20 Kohlenstoffatomen zu (3*R*) bestimmt werden. Bei den Fettsäuren mit 13, 21 und 22 Kohlenstoffatomen war die Konzentration für einen Nachweis nach der Racemisierung zu gering, dennoch wird auch hier eine analoge absolute Konfiguration angenommen.

Langkettige Fettsäuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen besitzen vielfach *iso*- oder *anteiso*-Konfiguration, welche auf verzweigte Starter-Moleküle (*iso*-Valeryl- bzw. *anteiso*-Valeryl-CoA) in der Fettsäurebiosynthese zurückzuführen sind. Fettsäuren mit

ungerader Kohlenstoffanzahl, die keine Methylverzweigungen aufweisen, lassen auf eine Beteiligung von Propionsäure an der Biosynthese schließen. Propionyl-CoA selbst kann beim Abbau von Fettsäuren mit ungerader C-Anzahl, bzw. bei vielstufigen Abbaureaktionen der Aminosäuren Methionin, Isoleucin oder Valin entstehen [28,148].

Um Hinweise auf die Starter-Moleküle in der Biosynthese der 3-Acetoxyfettsäuren mit ungerader C-Anzahl aus dem Blütenöl von *K. lanceolata* zu erhalten, sollten sie auf Methylverzweigungen untersucht werden. Aus den vorliegenden Massenspektren der 3-Hydroxy-, 3-Trimethylsiloxy- oder 3-Acetoxyfettsäuremethylester oder -fettsäuretrimethylsilylester können Methylverzweigungen weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden, da Bindungsbrüche entlang der Kohlenstoffkette nicht regelmäßig auftreten.

In der Literatur werden zur Ermittlung von Methylverzweigungen bei 3-Hydroxyfettsäuren vornehmlich Verfahren vorgestellt, welche auf einen Vergleich von gaschromatographischen Retentionszeiten mit denen von Standardverbindungen beruhen [34,134]. Hierbei wurden aus verschiedenen Bakterien überwiegend *iso*- und *anteiso*-verzeigte Fettsäuren nachgewiesen. Von den *iso*-verzweigten 3-Hydroxyfettsäuren ist zusätzlich bekannt, dass die trifluoracetylierten Methylester ein intensiveres Ion $[M\text{-}C_3H_7]^+$ zeigen, als die nicht verzweigten Säuren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob eine universellere massenspektrometrische Methode realisierbar ist.

Hierzu war bekannt, dass durch die Einführung von Stickstoff in Fettsäurederivate unter EI-Bedingungen ein verändertes Fragmentierungsverhalten (Radikal-induzierte Fragmentierung) generiert werden kann. Dabei entstehen durch Bindungsbrüche entlang der Kohlenstoffkette in den EI-Massenspektren Fragmentleitern, aus denen auf Positionen von Methylverzweigungen, wie auch von Doppelbindungen geschlossen werden kann.

Häufig dargestellte stickstoffhaltige Derivate von Fettsäuren sind Picolinylester, Dimethyloxazoline und Pyrrolidide [149-155]. Während die Darstellung der Picolinylester und Dimethyloxazoline aus den Komponenten der Blütenöle von *K. lanceolata* aus verschiedenen Gründen problematisch erschien, konnten die Pyrrolide leicht aus den 3-Hydroxyfettsäuremethylestern der sauren Methanolyse erhalten werden. Hierzu wurden letzgenannte mit Pyrrolidin und Eisessig (10:1, v/v) umgesetzt (**s. Abschnitt 6.12**) [154].

Durch Auswertung der Massenspektren der 3-Hydroxyfettsäurepyrrolidide und der entsprechenden mit MSTFA trimethylsilylierten Derivate konnte gezeigt werden, dass die 3-Acetoxyfettsäuren aus dem Blütenöl von *K. lanceolata* keine Methylverzweigungen aufweisen.

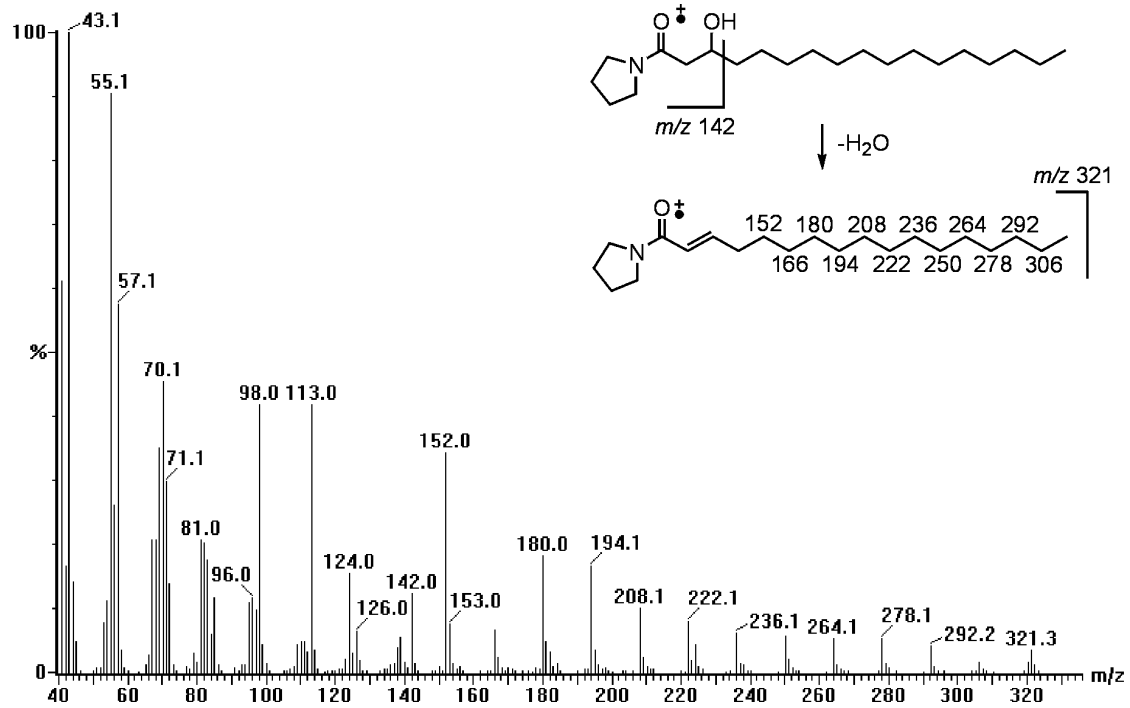


Abb. 5-10: EI-Massenspektrum (MD 800), sowie Fragmente des 3-Hydroxyheptadecansäure-pyrrolidids.

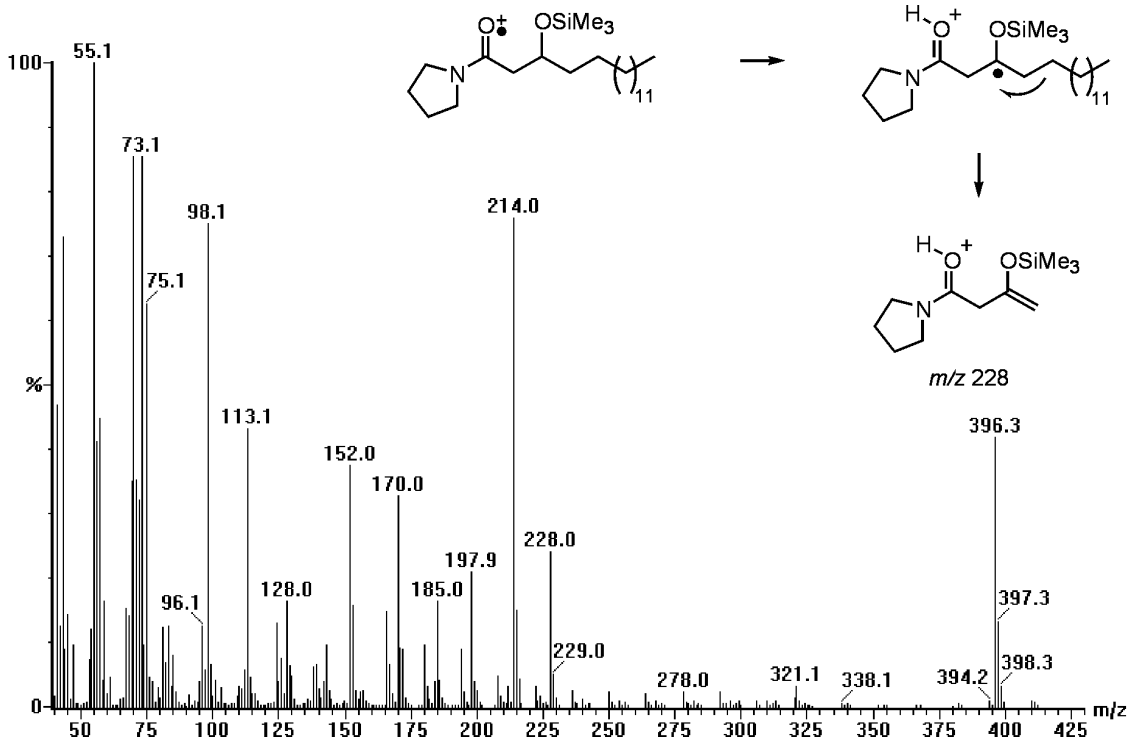


Abb. 5-11: EI-Massenspektrum (MD 800) und Mechanismus zur Bildung des Fragments *m/z* 228 von 3-Trimethylsiloxyheptadecansäurepyrrolidid.

Diskutiert werden sollen als Beispiele die Massenspektren des 3-Hydroxy- und des 3-Trimethylsiloxy-heptadecansäurepyrrolidids (**Abb. 5-10** und **Abb. 5-11**).

Die Massenspektren der 3-Hydroxyfettsäurepyrrolidide zeigen bei *m/z* 142 ein für die Substanzklasse charakteristisches Signal (**Abb. 5-10**). Molekülionen werden nicht beobachtet, der Peak mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ist jeweils [M-H_2O], beim 3-Hydroxyheptadecansäurepyrrolidid *m/z* 321. Nach der Abspaltung von Wasser wird eine Fragmentleiter beobachtet, bei der zunächst eine Methyl-Gruppe und dann Methyleneinheiten verloren werden. Das Ion mit kleinestem Masse zu Ladungs-Verhältnis in dieser Reihe ist bei allen Homologen *m/z* 152 (**Abb. 5-10**). Anhand dieser Fragmente kann eine Methylverzweigung ab Position C-5 ausgeschlossen werden. Da das Fragment bei *m/z* 138 nicht beobachtet wird, trifft dies auf Position C-4 zunächst nicht zu. Ein Nachweis, dass auch hier keine Methylverzweigung vorliegt, gelingt jedoch mit Hilfe der EI-Massenspektren der trimethylsilylierten Verbindungen. Durch Radikal-induzierte Fragmentierung unter Beteiligung eines fünfgliedrigen Übergangszustands wird ein intensives Fragment bei *m/z* 228 gebildet (**Abb. 5-11**). Bei einer Methylverzweigung an Position C-4 würde das Fragment um 14 Masseneinheiten zu höheren Massen verschoben erwartet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den 3-Hydroxyfettsäurepyrrolididen wird in den Massenspektren der trimethylsilylierten Derivate keine durchgehende Fragmentleiter beobachet, so dass jeweils beide Derivate zur Strukturaufklärung herangezogen werden müssen.

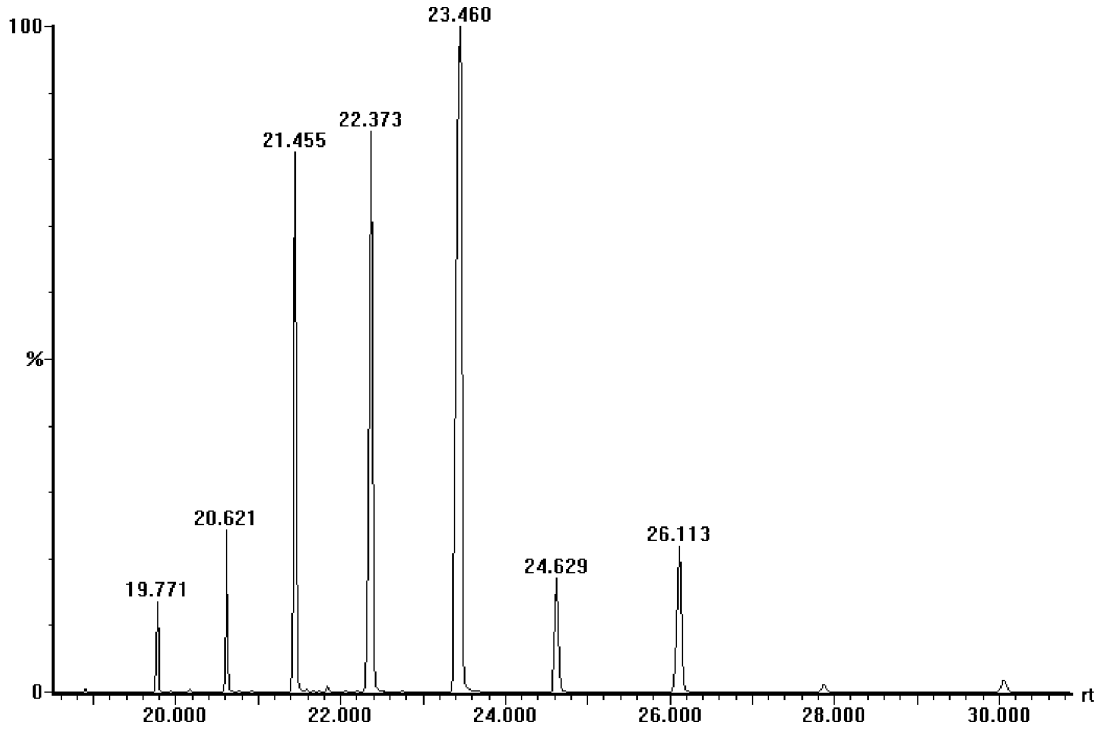


Abb. 5-12: 3-Trimethylsiloxyfettsäurepyrrolidide aus dem Blütenöl von *K. lanceolata* (dargestellt ist die Spur bei *m/z* 214, einem Fragment aus der α-Spaltung). Bedingungen: **MD 4**. Pyrrolidide von **RT 18.94 min** (3*R*)-OTMS 13:0, **19.77** (3*R*)-OTMS 14:0, **20.62** (3*R*)-OTMS 15:0, **21.46** (3*R*)-OTMS 16:0, **22.37** (3*R*)-OTMS 17:0, **23.46** (3*R*)-OTMS 18:0, **24.63** (3*R*)-OTMS 19:0, **26.13** (3*R*)-OTMS 20:0, **27.90** (3*R*)-OTMS 21:0, **30.08** (3*R*)-OTMS 22:0.

In **Abb. 5-12** zeigt eine Spur des Massenchromatogramms der trimethylsilylierten Hydroxyfettsäurepyrrolidide bei *m/z* 214, dass alle als Methylester erfaßten 3-Hydroxyfettsäuren auch als Pyrrolidide erfaßt wurden.

Mit Ausnahme von Myristinsäure und Pentadecansäure werden auch alle nicht funktionalisierten Fettsäuren aus dem Blütenöl von *Krameria lanceolata* als Pyrrolidide gefunden (RT 20.65 min **16:0**, 22.47 min **18:0**, 28.37 min **22:0**, 30.69 min **23:0**, 33.59 min **24:0**). Die Massenspektren gaben in keinem Fall einen Hinweis auf eine Methylverzweigung.

Auf die Aufnahme von ESI-Massenspektren wurde beim Blütenöl von *K. lanceolata* verzichtet, um den geringen Probenrest zu Vergleichszwecken einlagern zu können.

5.2 Blütenöle aus Acylglycerinen mit (3*R*)-3-Acetoxyacylresten

5.2.1 Das Blütenöl von *Diascia barberae* (Scrophulariaceae)

Im Fettsäuremethylester-Profil des Blütenöls von *Diascia barberae* (Scrophulariaceae) wurden nach vierstündiger sauer Methanolyse, sowie anschließender Trimethylsilylierung die Methylester von **3-OTMS 14:0** (3,1%), **3-OTMS 16:0** (75,6%) und **3-OTMS 18:0** (21,3%) nachgewiesen. Die absolute Konfiguration wurde, wie in **Abschnitt 5.1.1** beschrieben, zu (3*R*) bestimmt.

Die nach Trimethylsilylierung des Sekrets erhaltenen Komponenten besaßen deutlich höhere Retentionszeiten (s. **Abb. 5-13**), als bisher für (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure-trimethylsilylester ermittelt wurden. Auswertung der EI-TOF-Massenspektren ergab, dass das Blütenöl aus Acylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und bis zwei weiteren Acetylresten besteht (s. **Tabelle 5-3**).

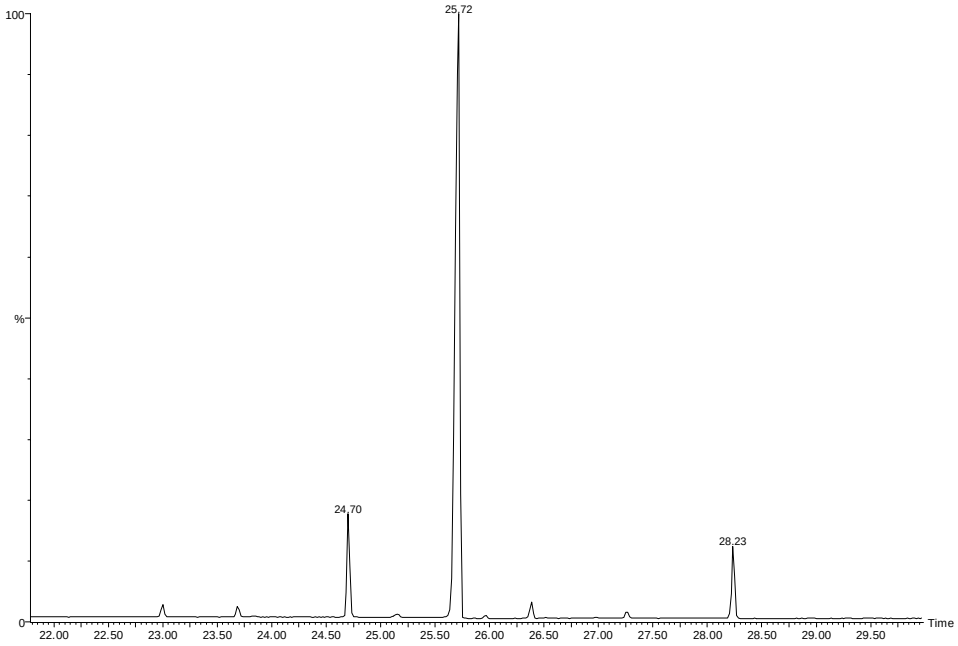


Abb. 5-13: Gaschromatogramm des Blütenöls von *D. barberae* nach Trimethylsilylierung. Bedingungen: **GCT 1**.

Nummer	RT [min]	Verbindung	%
I	23,00	2-[(3*R*)-3-Acetoxymyristoyl]-1-acetylglycerin	1,4
II	23,70	2-[(3*R*)-3-Acetoxymyristoyl)]-1,3-diacetylglycerin	0,9
III	24,70	2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl)]glycerin	8,0
IV[*]	25,15	1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin	0,5
V	25,72	2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin	80,6
VI[*]	25,98	3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin	0,3
VII	26,40	2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1,3-diacetylglycerin	1,4
VIII	27,27	2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]glycerin	0,6
IX	28,23	2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-1-acetylglycerin	6,3
X	28,97	2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl)]-1,3-diacetylglycerin	0,1

Tabelle 5-3: Als TMS-Ether identifizierte Komponenten aus dem Blütenöl von *D. barberae.* ([*] Möglicherweise Produkte aus Acylmigration.)

Zwei der drei aus dem Chromatogramm ersichtlichen Hauptkomponenten sind Trimethylsilylether von 1,2-Diacylglycerinen, jeweils mit einer Acetyl- und einer (3*R*)-3-Acetoxypalmitoyleinheit **V** oder einer (3*R*)-3-Acetoxystearoyleinheit **IX**. In geringen Mengen kommt das entsprechende Derivat **I** der (3*R*)-3-Acetoxymyristinsäure vor. Als einziges 1,3-Diacylglycerin wird **VI** in Spuren als Regiosiomer der Hauptkomponente **V** gefunden. Da bei Mono- und Diacylglycerinen während der Lagerung eine Isomerisierung durch Acylmigration auftreten kann [156,157], kann angenommen werden, dass **V** das alleinige Primärprodukt der Biosynthese darstellt.
Eine weitere Hauptkomponente aus dem Blütenöl von *D. barberae* ist das 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin **III**. Analog zu den Diacylglycerinen wird eine Spur eines isomeren, hier 1-Monoacylglycerins **IV**, bei leicht erhöhter Retentionszeit gefunden. 2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]glycerin **VIII** tritt als Nebenbestandteil auf.
Die nur in geringen Mengen gefundenen Triacylglycerine besitzen jeweils zwei Acetylreste, sowie einen (3*R*)-3-Acetoxymyristoyl- **II**, -palmitoyl- **VII** oder stearoylrest **X**.

Bei 1,2-Diacylglycerinen gibt es zwei mögliche Regioisomere. In den bislang in der Literatur beschriebenen Fällen lassen sich diese nicht anhand der EI-Massenspektren der Trimethylsilylether unterscheiden. In ausgewählten Fällen gelang dies mit Hilfe der EI-Massenspektren der *tert*.-Butyldimethylsilylether oder Nicotinylderivate [158,159]. Beide Verfahren sind auf die hier untersuchten Verbindungen nicht anwendbar. Sie beruhen auf einem Intensitätsvergleich der Signale, die nach Abspaltung jeweils eines Fettsäurerestes als Acyloxyradikal (TBDMS-Ether) oder Keten (Nicotinylderivat) entstehen. Das Signal aus Abspaltung des Fettsäurerestes aus Position C-2 des Acylglycerins wird jeweils als das mit der höheren relativen Intensität beschrieben. Die Verfahren setzen voraus, dass beide abspaltbaren Fettsäurereste ähnliche Stabilitäten besitzen müssen, was bei den

Derivaten der Acylglycerine mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und einem Acetylrest aus Blütenölen nicht der Fall wäre. Stattdessen gelingt jedoch eine massenspektrometrische Differenzierung der reversen Isomere anhand der EI-Massenspektren der Trimethylsilylether, wie im Folgenden dargelegt wird.
Aus der Literatur ist bekannt, dass bei trimethylsilylierten Monoacylglycerinen ein Fragment $[M\text{-}RCOOH]^+$ durch McLafferty-Abspaltung der langkettigen, nicht derivatisierten Fettsäure RCOOH nur dann in hoher Intensität entsteht, wenn sie an die sekundäre Hydroxyfunktion des Glycerins gebunden ist [160]. Dieses Verhalten wird bei den Monoacylglycerinen mit einer gebundenen (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure R´COOH in besonders ausgeprägter Form beobachtet. Bei den trimethylsilylierten 2-Monoacylglycerinen **III** und **VIII** ist $[M\text{-}R´COOH]^+$ ($m/z_{calc.}$ 218,116) Basepeak, bei dem trimethylsilylierten 1-Monoacylglycerin **IV** tritt das Fragment überhaupt nicht auf.
Bei den trimethylsilylierten 1,2-Diacylglycerinen **I**, **V** und **IX** aus dem Blütenöl von *D. barberae* wird ein analoges Fragment $[M\text{-}R´COOH]^+$ ($m/z_{calc.}$ 188,087), wenn auch in geringerer Intensität, beobachtet. Dies kann als erster Hinweis dahingehend interpretiert werden, dass die jeweilige (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure an die sekundäre Hydroxyfunktion des Glycerins gebunden ist, wenn berücksichtigt wird, dass das entsprechende Fragment beim trimethylsilylierten 1,3-Diacylglycerin **VI** nicht auftritt. Bei letztgenanntem muß die (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure an eine primäre Hydroxyfunktion gebunden sein.
Bestätigt werden wird diese Interpretation in **Abschnitt 5.2.2**. Dort wird gezeigt, dass das reverse Isomer des 1,2-Diacylglycerins kein Fragment $[M\text{-}R´COOH]^+$ aufweist.

Die EI-Massenspektren der Triacylglycerine liefern keinen Hinweis auf die Position der langkettigen Fettsäure. Da jedoch für die Monoacyl-, wie Diacylglycerine gezeigt wurde, dass die (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren ganz überwiegend an die sekundäre Hydroxyfunktion des Glycerins gebunden sind, wird dies auch für die Triacylglycerine angenommen.

Glycerin ist ein prochirales Molekül, die beiden CH_2OH-Gruppen sind enantiotop. Nach einer Konvention von H. Hirschmann wird, wenn er sich auch nicht dieses Deskriptors bedient, dem Kohlenstoffatom der *pro-S*-Gruppe die Nummer 1 zugeordnet [161]. Aufgrund des Stereozentrums des (3*R*)-Acetoxyfettsäurerestes gibt es von den analysierten 1-Monoacylglycerinen, 1,2- und 1,3-Diacylglycerinen jeweils zwei mögliche Diastereomere. Welches, oder ob beide möglichen Diastereomere vorliegen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden[3].

[3] Durch Auslassung des *sn*-Deskriptors soll angedeutet werden, dass z.B. bei **VI** nicht zwischen den Diastereomeren *sn*-3-[(3*R*)-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin und *sn*-1-[(3*R*)-Acetoxypalmitoyl]-3-acetylglycerin unterschieden wird.

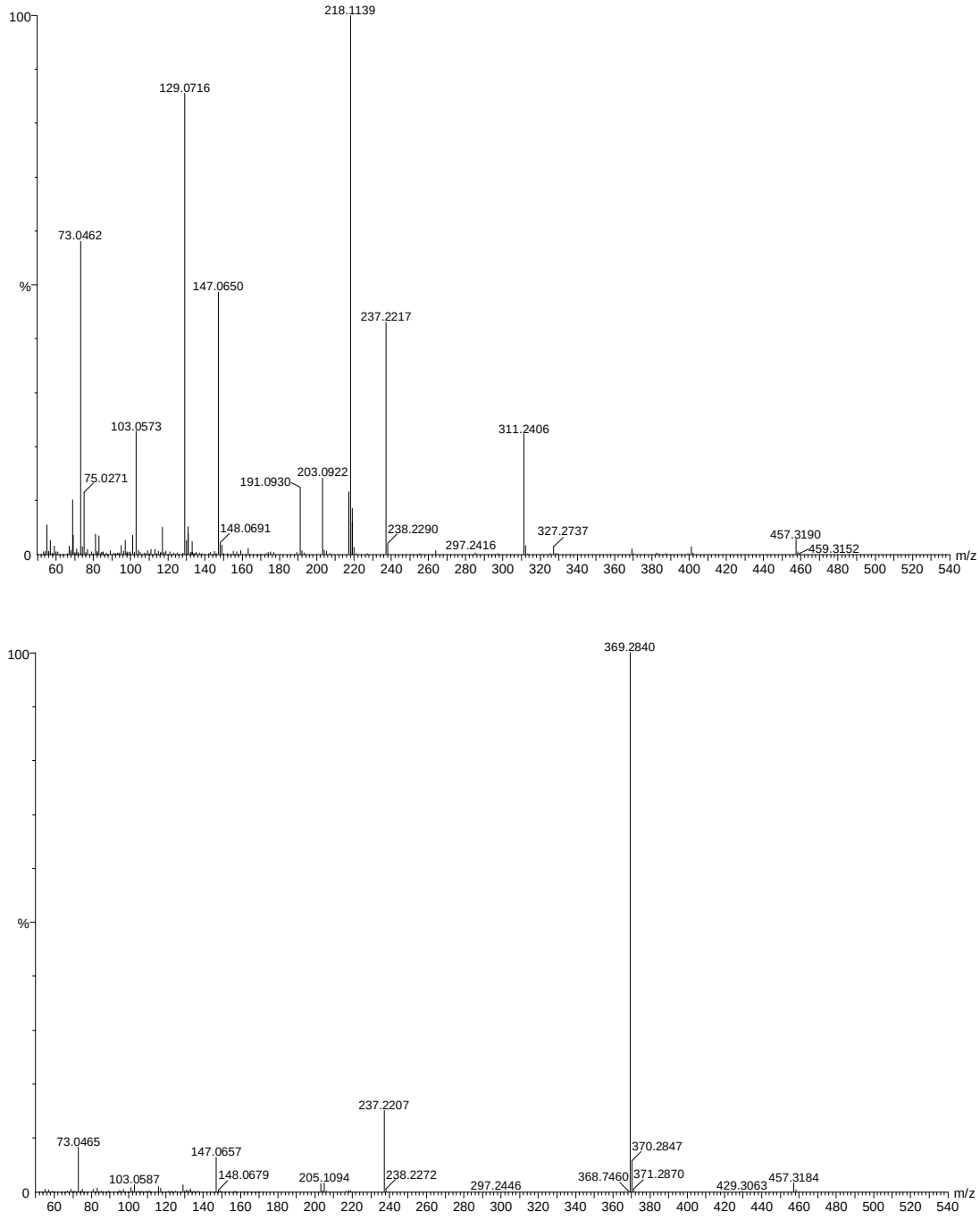
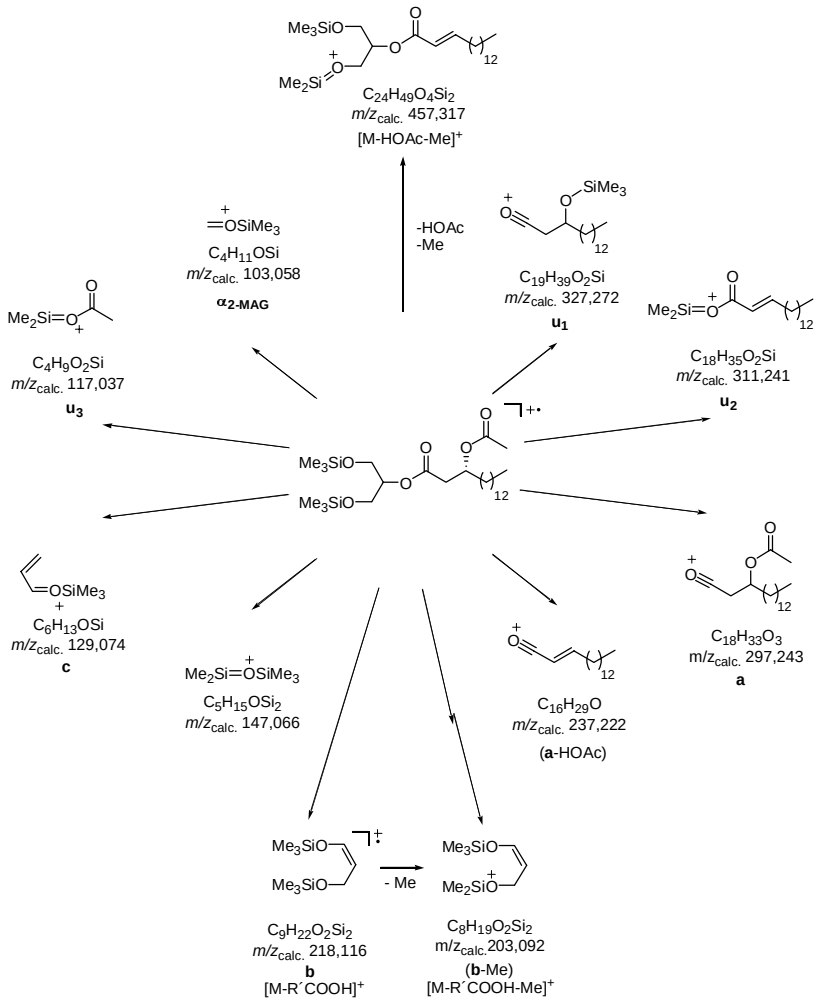


Abb. 5-14: EI-Massenspektren (GCT) des trimethylsilylierten 2-Monoacylglycerins III (oben) bzw. 1-Monoacylglycerins IV (unten) mit einem (3*R*)-3-Acetoxypalmitoylrest.



Schema 5-1: Fragmente des trimethylsilylierten 2-[(3*R*)-3-Acetoxy-palmitoyl]glycerins III.

Im Folgenden werden die EI-Massenspektren beispielhaft interpretiert. Die Reihenfolge ist dabei so gewählt, dass eine kurze, aufeinander aufbauende Beschreibung möglich wird.

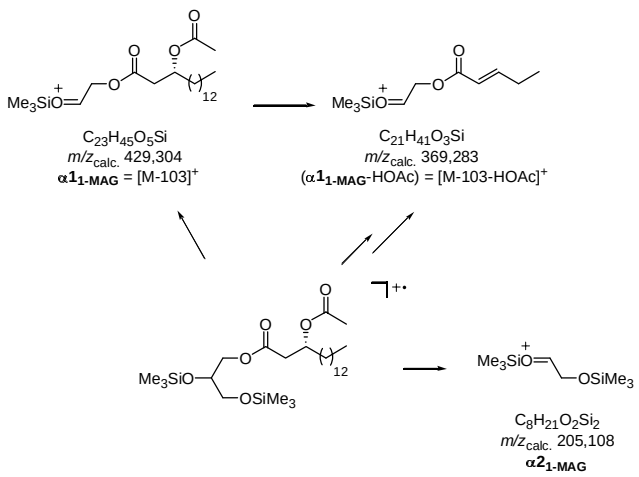
In **Abb. 5-14** (oben) ist das Massenspektrum des trimethylsilylierten 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl)]-glycerins **III** wiedergegeben. Wichtige Fragmentionen sind in **Schema 5-1** zusammengefaßt.

Als Ion mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis wird $[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 457,319 beobachtet. Die leichte Abspaltung von Essigsäure läßt sich durch Ausbildung eines resonanzstabilisierten Michael-Systems erklären. Es folgt eine Reihe von Signalen, die die gebundene Acetoxypalmitinsäure charakterisieren. Die Fragmente $\mathbf{u_1}$, bzw. $\mathbf{u_2}$ bei *m/z* 327,274 und *m/z* 311,241 sind jeweils mit einer Umlagerung einer TMS-Gruppe vom Glycerinrückgrat zum Fettsäurerest verbunden. (Massenspektren von Acylglycerinen, die nach Derivatisierung einen 3-Trimethylsiloxyfettsäurerest beinhalten, zeigen neben dem Fragment bei *m/z* 327 intensive Fragmente aus α-Spaltungen um die 3-OTMS-Gruppe. Solche Fragmente werden hier nicht beobachtet.) Das Acyliumion **a** bei *m/z* 297,242 wird, aus anfänglich erwähnten Gründen, nur mit geringer Intensität beobachtet. Diese ist jedoch zur Bestimmung der exakten Masse ausreichend, so dass in Kombination mit den ESI-Experimenten die Acetoxyfunktion im Fettsäurerest nachgewiesen werden kann. Das Ion (**a**-HOAc) bei *m/z* 237,222 besitzt eine mittlere relative Intensität.

Der Basepeak **b** oder $[M\text{-}R´COOH]^+$ des Spektrums bei *m/z* 218,114 und hiermit verknüpft (**b**-Me) oder $[M\text{-}R´COOH\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 203,092, lassen sich durch (formelle) McLafferty-Abspaltung der (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure R´COOH erklären. Es kann angenommen werden, dass das Signal auf die Reaktionsfolge Eliminierung von Essigsäure und anschließender McLafferty Abspaltung der Hexadec-2-ensäure zurückgeht. Bestätigt wird dies dadurch, dass das Spektrum des Monoacylglycerins, welches ursprünglich schon die Hexadec-2-ensäure enthält, dem hier diskutierten sehr ähnlich ist. (Solche Verbindungen werden als Reaktionsartefakte erhalten, wenn Blütenöle über einen längeren Zeitraum in der Hitze mit MSTFA umgesetzt werden.)

Das Fragment bei *m/z* 147,065 entsteht durch Wanderung einer Trimethylsilylgruppe zum zweiten Trimethylsiloxyrest. Das Fragment **c** bei *m/z* 129,072 tritt bei verschiedenen trimethylsilylierten Acylglycerinen auf [160], das Fragment bei *m/z* 117,038 ist durch Wanderung einer TMS-Gruppe zu einem Acetoxyrest zu erklären. Das Signal $\boldsymbol{\alpha_{2\text{-MAG}}}$ bei *m/z* 103,057 ist auf die zwei primären Trimethylsiloxyfunktionen zurückzuführen und belegt, im Zusammenhang mit der Abwesenheit von Fragmenten aus α-Spaltungen um eine sekundäre Trimethylsiloxyfunktion, dass es sich bei der Verbindung um ein 2-Acylglycerin handelt.

Alle gemessenen Massen stimmen innerhalb der Fehlertoleranz von 5 mDa mit den berechneten Fragmentmassen überein. Die Massenspektren trimethylsilylierter 2-Monoacylglycerine mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacylrest sind im Anhang (**Tabelle A-2**) zusammengefaßt.



Schema 5-2: Fragmente des trimethylsilylierten 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerins IV.

Das Spektrum des trimethylsilylierten 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerins **IV** (s. **Abb. 5-14** unten) unterscheidet sich ausgeprägt von dem seines Regioisomeren, weil es durch das Fragment ($\boldsymbol{\alpha 1_{1\text{-MAG}}}$-HOAc) oder $[M\text{-}103\text{-}HOAc]^+$ bei *m/z* 369,284 (s. **Schema 5-2**) dominiert wird. Das Ion $\boldsymbol{\alpha 1_{1\text{-MAG}}}$ selbst wird bei *m/z* 429,306 mit sehr geringer Intensität beobachtet. Als weiteres Fragment einer α-Spaltung um die sekundäre Trimethylsiloxyfunktion entsteht $\boldsymbol{\alpha 2_{1\text{-MAG}}}$ bei *m/z* 205,109.

Analog, wenn auch z.T. mit deutlichen Unterschieden in den relativen Signalintensitäten im Vergleich zum Spektrum des trimethylsilylierten 2-Acylglycerins, treten $[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 457,318, **a** bei *m/z* 297,245, (**a**-HOAc) bei *m/z* 237,221 und $[C_5H_{15}OSi_2]^+$ bei *m/z* 147,066 auf.

Fragmente analog zu $\mathbf{u_1}$ und $\mathbf{u_2}$, die auf eine Umlagerung eines Trimethylsilylrestes zum 3-Acetoxypalmitoylrest zurückzuführen sind, werden beim Derivat des 2-Acylglycerins nicht beobachtet. Ebenso fehlt das zu **b** oder $[M\text{-}R´COOH]^+$ analoge Fragment, welches durch McLafferty Abspaltung der (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure R´COOH gebildet wird. Mit zu vernachlässigenden Intensitäten treten die Fragmente bei *m/z* 203,093 (isobar zu (**b**-Me)), *m/z* 129,073 (isobar zu **c**), *m/z* 117,037 (analog $\mathbf{u_3}$) und

m/z 103,059 (analog $\alpha_{\mathbf{2\text{-}MAG}}$) auf. Die Massenspektren trimethylsilylierter 1-Monoacylglycerine mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacylrest sind im Anhang (**Tabelle A-3**) zusammengefaßt.

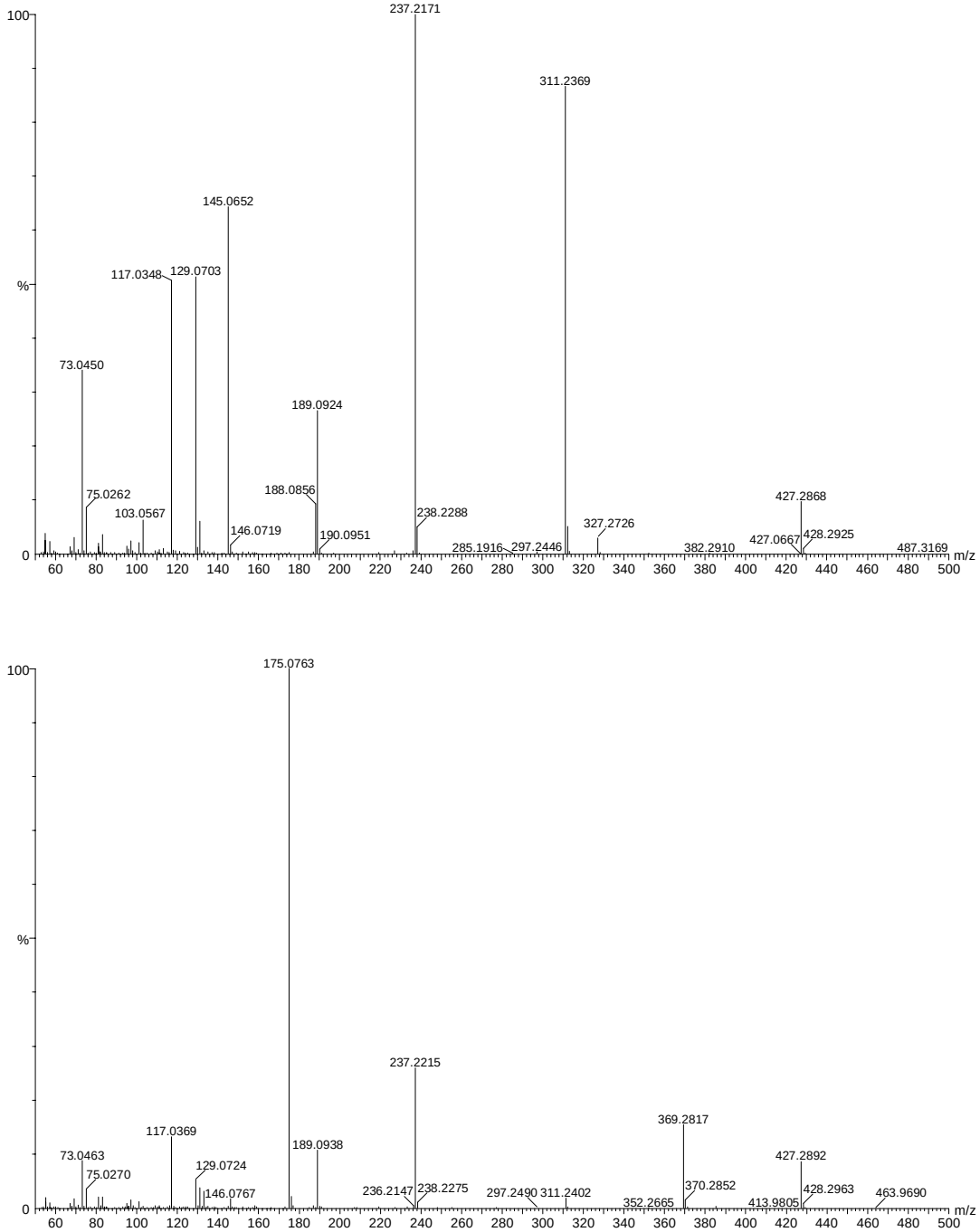


Abb. 5-15: EI-Massenspektren (GCT) der TMS-Ether von 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin V (oben) und 3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin VI (unten).

In **Abb. 5-15** sind die Spektren der Trimethylsilylether des 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerins **V** (oben) und des 3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerins **VI** (unten) wiedergegeben.
Beide Verbindungen zeigen als Ionen mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis $[M\text{-}Me\text{-}HOAc]^+$ mit $m/z_{calc.}$ 427,288. Eine Unterscheidung zwischen dem 1,2- und 1,3-Diacylglycerin ist, analog zu den Monoacylglycerinen dadurch möglich, dass bei dem 1,3-Diacylglycerin um die sekundäre OTMS-Gruppe

intensive Fragmente durch α-Spaltung entstehen, hier (**α1$_{1,3\text{-DAG}}$**-HOAc) bei *m/z* 369,282 (*m/z*$_{calc.}$ 369,283) und **α2$_{1,3\text{-DAG}}$** bei *m/z* 175,076 (*m/z*$_{calc.}$ 175,079). Das Fragment **α1$_{1,3\text{-DAG}}$** (*m/z*$_{calc.}$ 429,304) wird in diesem Fall nicht beobachtet (ohne Schema).

Dass die (3*R*)-3-Acetoxypalmitinsäure im 1,2-Diacylglycerin **V** an die sekundäre Hydroxyfunktion des Glycerinrückrats gebunden ist, kann wieder aus dem Auftreten des Fragments [M-R´COOH]$^+$, hier bei *m/z* 188,086 geschlußfolgert werden.

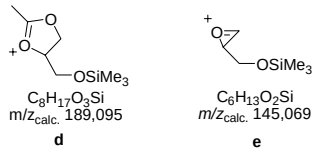
Analog zu den trimethylsilylierten Monoacylglycerinen wird die Struktur des (3*R*)-3-Acetoxyacylrests durch die Fragmente **u$_1$**, **u$_2$**, **a** und (**a**-HOAc) charakterisiert, wobei **u$_1$** ausschließlich bei dem 1,2-Diacylglycerin und **u$_2$** in deutlich höherer Intensität als beim 1,3-Diacylglycerin auftritt.

Das Fragment **d** bei *m/z*$_{calc.}$ 189,095 (s. **Schema 5-3**) wird bei trimethylsilylierten 1,2-Diacylglycerinen mit nicht funktionalisierten, langkettigen Fettsäureresten nach Bruch einer C-C-Bindung in einem Fettsäurerest gebildet [160]. Die hier erhöhte Intensität des Signals ist darauf zurückzuführen, dass das gleiche Ion durch Abspaltung des langkettigen Acyloxyradikals entstehen kann.

Für das Fragment bei *m/z* 145,065 kann Struktur **e** (s. **Schema 5-3**) angenommen werden [160]. Das Fragment bei *m/z*$_{calc.}$129,070 ist analog Fragment **c** bei den Monoacylglycerinen, das Fragment *m/z* 103,057 entspricht **α**$_{2\text{-MAG}}$ und wäre hier als **α**$_{1,2\text{-DAG}}$ zu bezeichnen (s. **Schema 5-2**). Die drei letztgenannten Fragmente treten mit bemerkenswerter Intensität nur bei dem 1,2-Diacylglycerin auf.

Das Fragment **u$_3$** bei *m/z*$_{calc.}$ 117,037 ist wieder beiden Isomeren gemein.

Die Massenspektren trimethylsilylierter 1,2- und 1,3-Diacylglycerine, jeweils mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacylrest, sind im Anhang (**Tabelle A-4** und **Tabelle A-5**) zusammengefaßt.



Schema 5-3: Ergänzende Fragmentstrukturen.

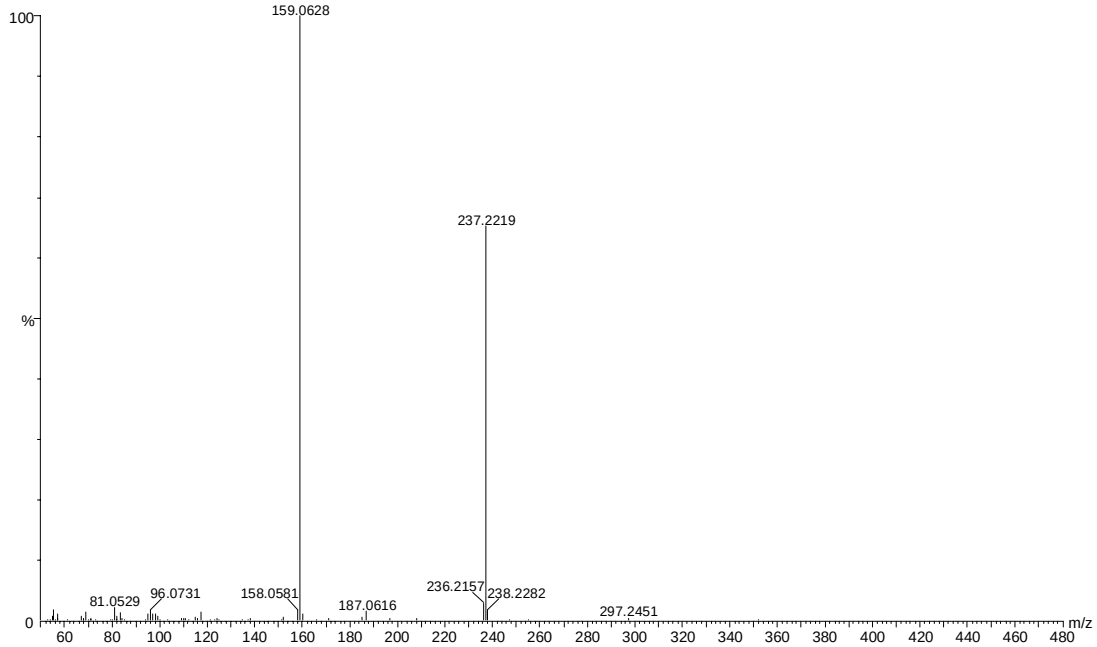
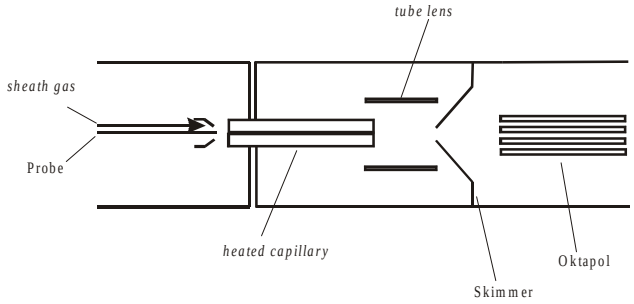


Abb. 5-16: EI-Massenspektrum (GCT) des 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1,3-diacetylglycerins VII.

Abschließend soll das EI-Spektrum des 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl[-1,2-diacetylglycerins **VII** (s. **Abb. 5-16**) als Beispielspektrum eines Triacylglycerins mit einer (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und zwei weiteren Acetylresten betrachtet werden. Obwohl als Ion mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis erst $[M\text{-}2HOAc]^+$ bei *m/z* 352,267 ($m/z_{calc.}$ 352,261) beobachtet wird, wird durch die Ionen **a** und (**a**-HOAc) bei *m/z* 297,245, bzw. *m/z* 237,221 (s. **Schema 5-1**), sowie $[M\text{-}R´COOH]^+$ bei *m/z* 159,063 ($m/z_{calc.}$ 159,066) nachgewiesen, dass es sich bei der Verbindung um ein Triacylglycerin mit einem (3*R*)-3-Acetoxypalmitoylrest und zwei Acetylresten handelt. Wie oben steht R´COOH hierbei für die (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure. Wie weiter vorne schon erläutert, basiert die vorgeschlagene Anordnung der Fettsäuren im Triacylglycerin auf Analogieschlüssen und kann nicht direkt aus dem EI-Spektrum abgeleitet werden. Die Massenspektren von Triacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacylrest sind im Anhang (**Tabelle A-6**) zusammengefaßt.

Wie in **Abschnitt 5.1.1** bei den Untersuchungen zum Blütenöl von *Angelonia pubescens* erwähnt, wurden alle ESI-Massenspektren unter vergleichbaren, für Acylglycerine aus Blütenölen optimierten Bedingungen gemessen.

Die Proben wurden hierzu nach einer von K.L. Duffin *et al.* für Acylglycerine mit nicht funktionalisierten Fettsäuren beschriebenen Methode präpariert [162]. Das Blütenöl wurde in 5 mM Ammoniumacetat in 70 Vol% $CHCl_3$ und 30 Vol% MeOH gelöst. Durch Zugabe des Salzes wird zum einen eine Steigerung der Ionenausbeute der verhältnismäßig unpolaren Acylglycerine erreicht. Zum zweiten werden statt der sonst bevorzugt auftretenden Natriumaddukte Ammoniumaddukte erhalten. Erstgenannte zeigen gegenüber *low energy* CID-MS/MS-Experimenten hohe Stabilität. Erst ab ca. 100 eV Stossenergie werden nach K.L. Duffin *et al.* Fragmente erhalten, welche dann aber kaum zur Strukturaufklärung beitragen können. Ammoniumaddukte sollen hingegen ab einer Stoßenergie von 50 eV in charakteristischer Weise fragmentieren [162]. Auch die hier analysierten Natriumaddukte zeigen, mit Ausnahme der Fragmente aus Abspaltung von Essigsäure, keine Signale, die zur Strukturaufklärung herangezogen werden konnten. Die Ammoniumaddukte neigten hingegen so stark zur Fragmentierung, dass schon unter moderaten Quellenbedingungen eine *in source* Fragmentierung auftrat. Als optimale Quellenparameter wurden die (Offset-) Potentiale an *heated capillary* (200 °C), *tube lens* und Oktapol auf 51 V, 75 V und -5 V gesetzt (**s. Schema 5-4**). Unter Verwendung dieser Parameter wurden sowohl Cluster-, als auch Fragmentbildung bei Acylglycerinen weitgehend vermieden.



Schema 5-4: Vereinfachter Aufbau der ESI-Quelle des TSQ 7000.

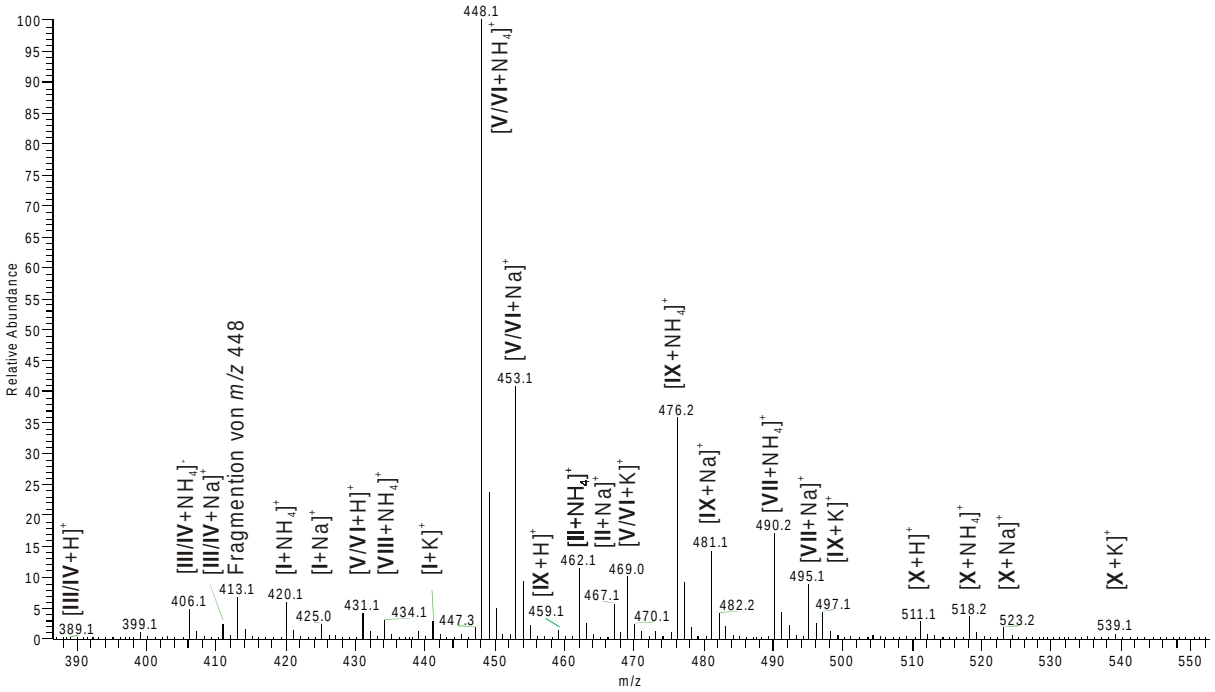


Abb. 5-17: Positiv-ESI-Massenspektrum des Blütenöls von *D. barberae.*

In dem in **Abb. 5-17** dargestellten Positiv-ESI-Spektrum des Blütenöls von *Diascia barberae* werden für alle mittels GC/EI-TOFMS strukturaufgeklärten Verbindungen Quasimolekülionen gefunden (s. **Tabelle 5-3**). Die größten Signalintensitäten zeigen hierbei die Ammoniumaddukte, daneben werden aber auch Natrium- oder Kaliumaddukte, sowie durch Anlagerung eines Protons, oder alternativ durch Abspaltung von Ammoniak aus den Ammoniumaddukten entstandene Ionen beobachtet. Die ermittelten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Quasimolekülionen bestätigen, dass es sich bei den Acyloxyresten in 3-Position der langkettigen Fettsäuren um Acetoxy-Funktionen handeln.

Ausser für einige Fragmentionen (z.B. $[\mathbf{V}/\mathbf{VI}+H\text{-}H_2O]^+$), werden im Positiv-ESI Spektrum keine weiteren Signale beobachtet. Begründet in der Verwendung komplementärer massenspektrometrischer Methoden, die hier zu den gleichen Resultaten führen, kann deshalb ausgeschlossen werden, dass das Blütenöl neben den bereits strukturaufgeklärten Verbindungen weitere Substanzen in signifikanten Mengen enthält.

Abschliessend werden in diesem Abschnitt die CID-Spektren der Acylglycerin-Ammoniumaddukte aus dem Blütenöl von *D. barberae* betrachtet. Bei Verwendung geringer Stoßenergien um 19 eV lassen sich daraus Art- und Anzahl der an das Glycerinrückgrat gebundenen Fettsäuren bestimmen. Die gleiche Methode wird in **Abschnitt 5.6.1** auf strukturähnliche Substanzen angewandt, die sich aufgrund von erhöhter Molekülmasse und Polarität nicht mehr mittels GC/MS untersuchen ließen.

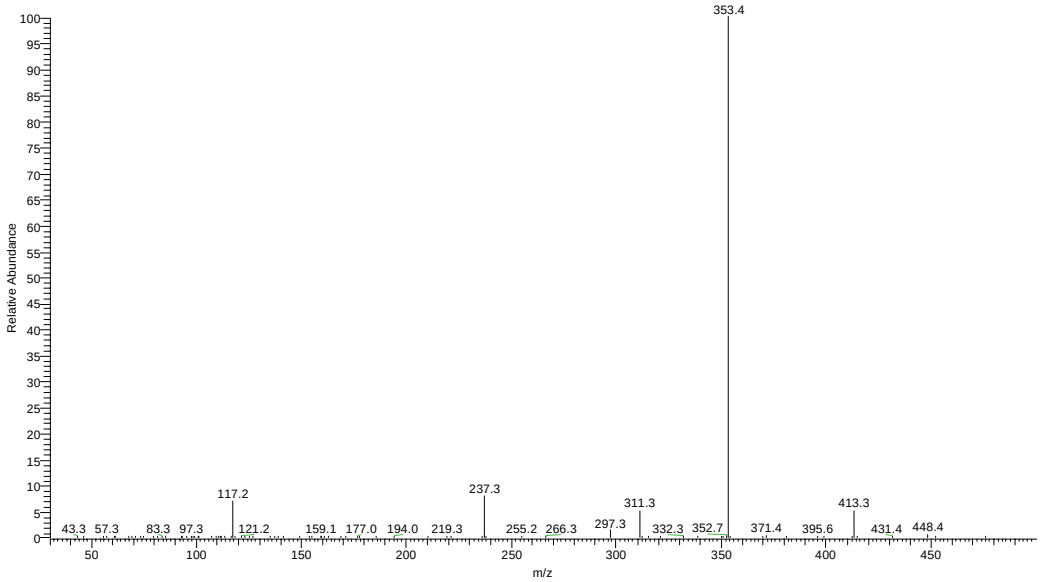
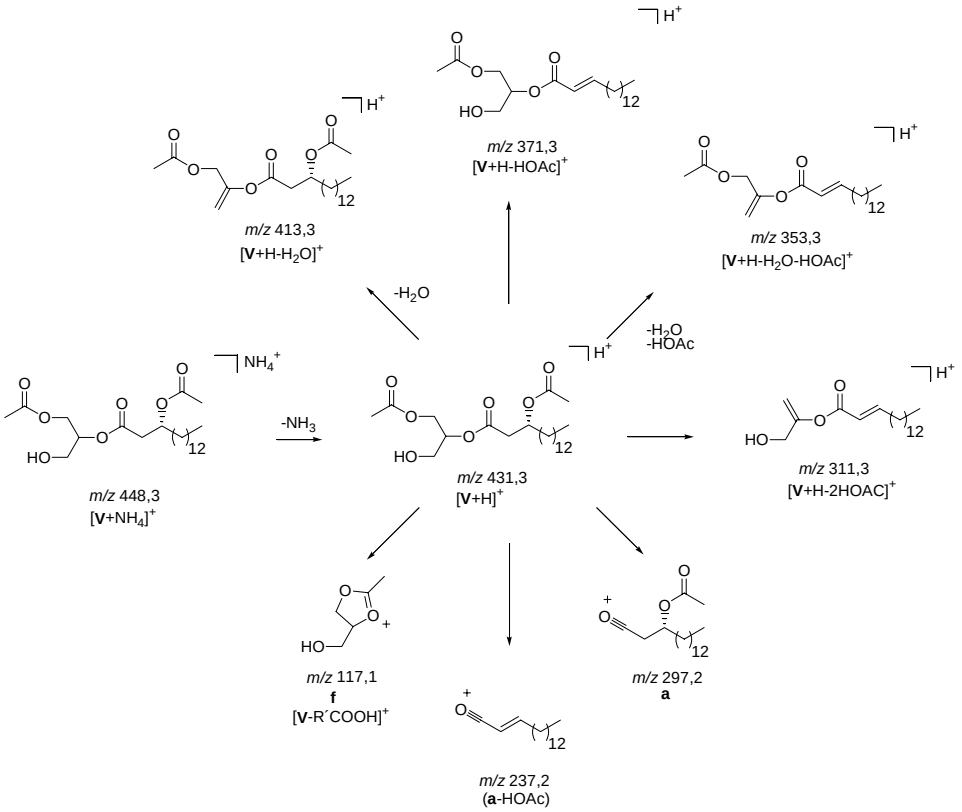


Abb. 5-18: CID-Spektrum (19 eV) von $[V/VI+NH_4]^+$.



Schema 5-5: Fragmente von $[V+NH_4]^+$.

Als detaillierteres Beispiel soll das CID-Spektrum der Ionen bei *m/z* 448,3 in **Abb. 5-18** betrachtet werden. Aus den GC/EI-TOFMS Untersuchungen ist bekannt, dass das Signal durch die Ammoniumaddukte eines Regioisomerengemisches aus ganz überwiegend 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **V** und wenig des 1,3-Regioisomeren **VI** hervorgerufen wird. Da bedingt durch die massenspektrometrische

Methode in den CID-Spektren keine Fragmente durch α-Spaltungen beobachtet werden, ist das Gemisch nicht als solches im Spektrum zu erkennen. In **Schema 5-5** zur Fragmentierung wird daher vereinfachend nur auf **V** Bezug genommen.
Die in dem Spektrum beobachteten Fragmente können in drei Typen eingeteilt werden. Zum einen werden Fragmente durch Verlust von kleinen Neutralmolekülen wie Ammoniak, Wasser oder Essigsäure gebildet. So ist der Basepeak bei *m/z* 353,4 auf Abspaltung von Essigsäure aus der 3-Position des Fettsäurerestes und Wasser zurückzuführen. Das Fragment *m/z* 311,3, bei dem zwei Moleküle Essigsäure abgespalten wurden, besitzt eine deutlich geringere Intensität. Weitere Fragmente des Typs „Verlust von kleinen Neutralteilchen" sind $[\mathbf{V/VI}+H]^+$, $[\mathbf{V/VI}+H-H_2O]^+$ und $[\mathbf{V/VI}+H-HOAc]^+$ bei *m/z* 431,3, *m/z* 413,3 und *m/z* 371,3. Alle genannten Fragmente haben aus dem ursprünglichen Ammoniumaddukt jeweils auch Ammoniak verloren, was jedoch nicht jeweils explizit erwähnt wird. Als zweiter Typ von Fragmenten werden, wie schon in den EI-Spektren, das Acylium-Ion **a**, hier bei *m/z* 297,3, und (**a**-HOAc), hier bei *m/z* 237,3, erhalten. Der Verlust der langkettigen Fettsäure führt zum dritten Typ von Ionen. Bei den Diacylglycerinen mit einer (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure und einem weiteren Essigsäurerest wird das Signal für **f** oder $[M-R´COOH]^+$ bei *m/z* 117,2 beobachtet.

Das Fragmentierungsverhalten von den Monoacylglycerin- und Triacylglycerin-Ammoniumaddukten aus dem Blütenöl von *D. barberae* ist dem eben für Diacylglycerine diskutierten sehr ähnlich, außer, dass bei den Monoacylglycerinen kein Fragment vom Typ [M-R´COOH] erhalten wurde. Bei den Triacylglycerinen ist **f** oder [M-R´COOH] bei *m/z* 159,2 Basepeak. Für die Diskussion der Spektren in **Abschnitt 5.6.1** ist es von Bedeutung, dass kein Folgefragment $[M-R´COOH-CH_2CO]^+$ bei *m/z* 117,2 auftritt. Alle CID-Spektren der Ammoniumaddukte aus dem Blütenöl von *D. barberae* sind im Anhang (**Tabelle A-7**, **Tabelle A-8**, **Tabelle A-9**) zusammengefaßt.

5.2.2 Das Blütenöl von *Lysimachia ciliata* (Primulaceae)

Untersuchungen zu den Inhaltsstoffen der Blütenöle von *Lysimachia punctata* und *Lysimachia vulgaris* (Primulaceae) wurden bereits von S. Vogel durchgeführt. Als Hauptkomponenten wurden Diacylglycerine mit je einem 3-Acetoxystearoyl- oder einem 3-Acetoxy-*trans*-octadec-11-enoylrest und einem Acetylrest beschrieben. Die Verteilung der Acylreste auf die Hydroxygruppen des Glycerinrückgrats wurde nicht bestimmt [3].

In dem von uns ermittelten Fettsäuremethylesterprofil des Blütenöls von *Lysimachia ciliata* wurden keine ungesättigten Fettsäuren, sondern **3-OTMS 16:0** (56,3 %) und **3-OTMS 18:0** (43,6 %) nachgewiesen; die absolute Konfiguration wurde für beide Verbindungen zu (3*R*) bestimmt. Das nach Trimethylsilylierung erhaltene Chromatogramm ist dem von *Diascia barberae* ähnlich (s. **Abb. 5-19** und **Abb. 5-13**). Aus einer Koinjektion der beiden derivatisierten Gemische wurde jedoch erkenntlich, dass die trimethylsilylierten Verbindungen **XI** bei RT 25.87 min, **XII** bei RT 27.27 min, **XIII** bei RT 28.42 min und **XIV** bei RT 28.53 min nicht identisch mit schon bekannten Komponenten aus dem Blütenöl von *D. barberae* sind. Die TMS-Ether von 1-[(3*R*)-Acetoxypalmitoyl]glycerin **IV** und 3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **VI** entsprechen allerdings schon identifizierten Verbindungen.

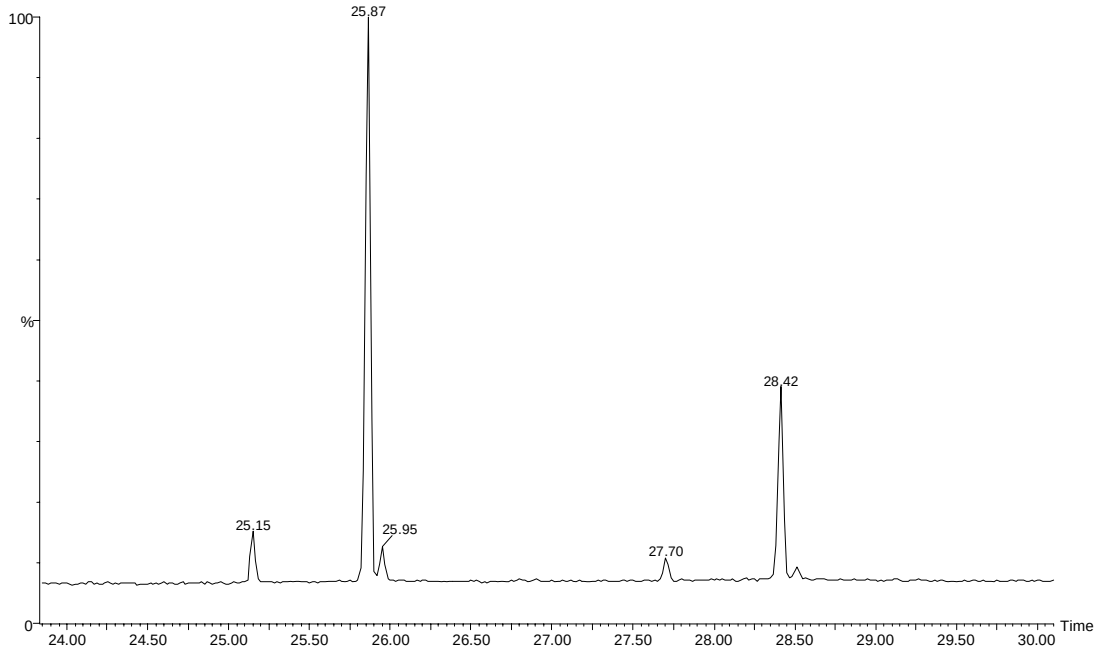


Abb. 5-19: Gaschromatogramm des Blütenöls von *L. ciliata* nach Trimethylsilylierung. Bedingungen: **GCT 1**. TMS-Ether von **RT 25.15 min** 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin **IV** (5,7 %), **25.87** 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-2-acetylglycerin **XI** (64,5 %), **25.98** 3-[(3*R*)-3-Acetoxy-palmitoyl]-1-acetylglycerin **VI** (3,4%), **27.72** 1-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]glycerin **XII** (2,7 %), **28.42** 1-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-2-acetylglycerin **XIII** (22,2 %), **28.53** 3-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-1-acetylglycerin **XIV** (1,5 %).

Auffällig ist, dass neben dem bereits bekannten 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin **IV** auch das analoge 1-Monoacylglycerin **XII** mit dem (3*R*)-3-Acetoxystearoylrest (MS-Daten in **Tabelle A-3**) gefunden wird, während bei *D. barberae* die analogen 2-Monoacylglycerine überwiegen. Möglicherweise könnte es sich somit bei der Hauptkomponente **XI** aus dem Sekret von *L. ciliata* um das reverse Isomer des 1,2-Diacylglycerins **V** handeln, welches im Blütenöl von *D. barberae* Haupkomponente ist. Dies wird dadurch gestützt, dass die EI-Massenspektren der TMS-Ether von **XI** (s. **Abb. 5-20**) und **V** (s. **Abb. 5-15**), mit Ausnahme des Ions bei $m/z_{calc.}$ 188,087, die gleichen Signale besitzen. Aus dem Fehlen des Signals beim Derivat von **XI** kann geschlussfolgert werden, dass hier der 3-Acetoxypalmitoylrest gebunden an eine primäre Hydroxyfunktion des Glycerins vorliegt. Verbindung **XIII** wurde analog als 1-[(3*R*)-3-Acetoxysteaoryl]-2-acetylglycerin, Komponente **XIV** entsprechend den Ausführungen im vergangenen Kapitel als 3-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-1-acetylglycerin identifiziert. Charakteristische Fragmente sind in **Tabelle A-4** und **Tabelle A-5** zusammengefaßt. Verbindung **VI** entsteht möglicherweise durch Acylmigration aus **XI** (vgl. auch **Abschnitt 5.2.1**).

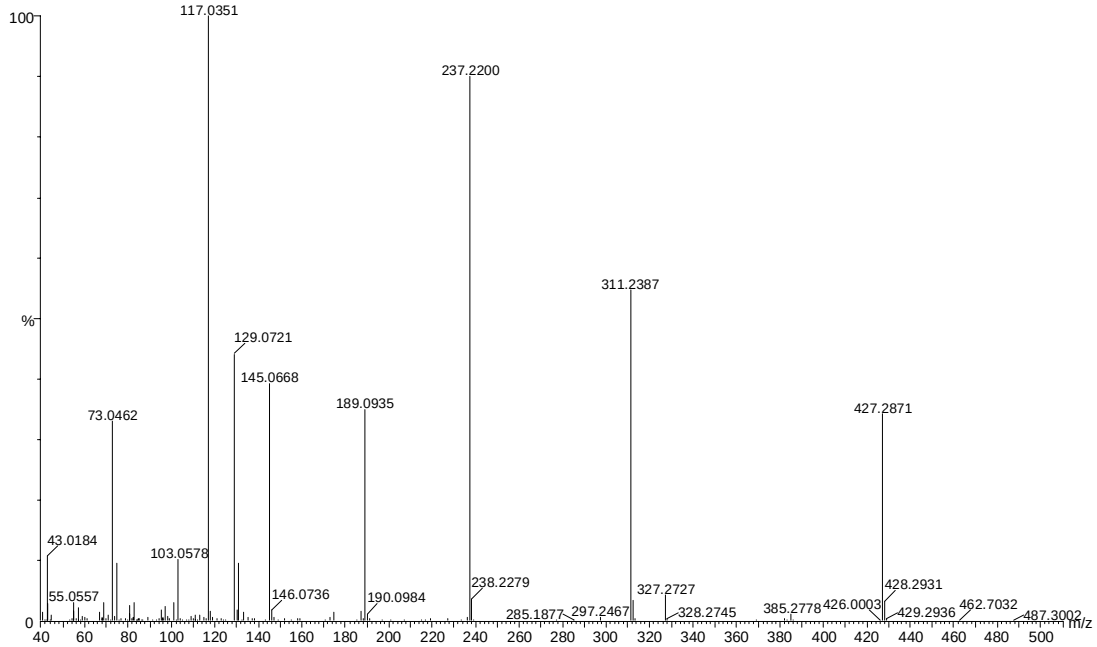


Abb. 5-20: **EI-Massenspektrum (GCT) des trimethylsilylierten 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-2-acetylglycerins XI.**

Die ESI-Massenspektren des Sekrets lieferten keinen Hinweis auf weitere Inhaltsstoffe in größeren Mengen. Die CID-Spektren der Ammoniumaddukte der Mono- und Diacylglycerine unterscheiden sich von denen der Regioisomeren aus dem Blütenöl von *D. barberae* nicht signifikant, so dass auf eine Diskussion verzichtet wird.

5.3 Blütenöl aus (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren und Acylglycerinen

5.3.1 Das Blütenöl von *Trimezia martinicensis* (Iridaceae)

Im Fettsäuremethylesterprofil des Blütenöls von *Trimezia martinicensis* (Iridaceae) wurde zu 99 % **3-OTMS 16:0** nachgewiesen. Die absolute Konfiguration wurde zu (3*R*) bestimmt.

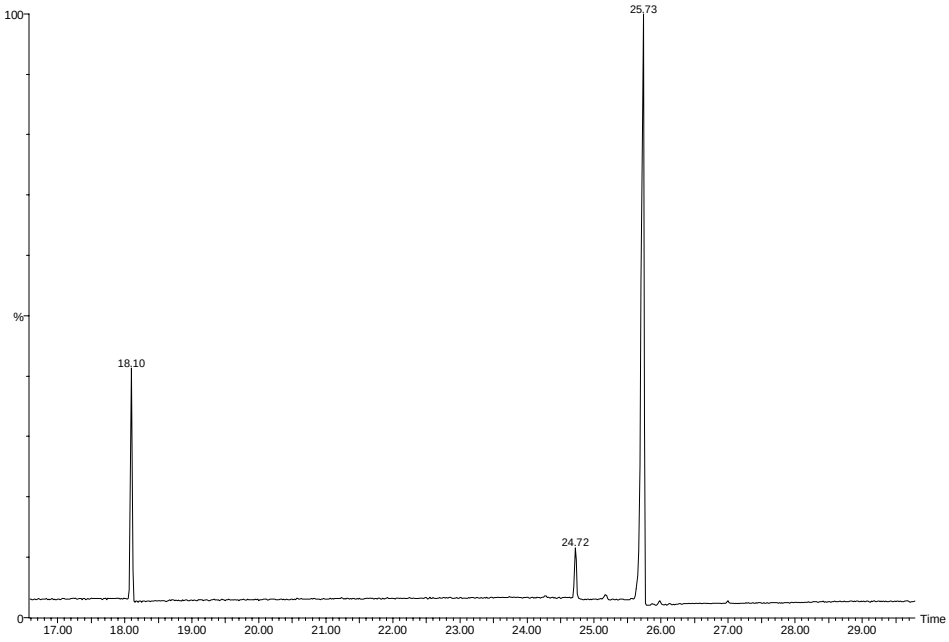


Abb. 5-21: Gaschromatogramm des Blütenöls von *T. martinicensis* nach Trimethylsilylierung. Bedingungen: **GCT 1**. TMS-Ester, bzw. TMS-Ether von **RT 18.10 min** (3*R*)-OAc 16:0 (17,5 %), **24.72** 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin **III** (4,5 %), **25.17** 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin **IV** (0,7 %), **25.73** 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **V** (76,8 %), **25.98** 3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **VI** (0,5 %).

Abb. 5-21 zeigt das Chromatogramm, welches nach Trimethylsilylierung des Sekrets erhalten wurde. Die als TMS-Ester oder TMS-Ether identifizierten Komponenten **(3*R*)-OAc 16:0** (17,5 %), 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin **III** (4,5 %), 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin **IV** (0,7 %), 2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **V** (76,8 %), **25.98** 3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin **VI** (0,5 %) waren schon aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt, neu ist jedoch, das signifikante Mengen an Fettsäuren neben Acylglycerinen vorkommen. Wie bei *D. barberae* ist die (3*R*)-3-Acetoxypalmitoylrest sowohl bei den Monoacylglycerinen, als auch bei den Diacylglycerinen überwiegend an die sekundäre Hydroxyfunktion des Glycerinrückgrats gebunden.

5.4 Blütenöl aus Acylglycerinen mit nicht funktionalisierten Acylresten

5.4.1 Das Blütenöl von *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae)

Abb. 5-22 zeigt einen Ausschnitt aus dem Chromatogramm des mit MSTFA umgesetzten Blütenöls von *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae). Nicht dargestellt ist der Retentionszeitbereich um 12 min, bei dem in geringen Mengen trimethylsilylierte Monosaccharide gefunden werden, deren genaue Bestimmung nicht erfolgte.

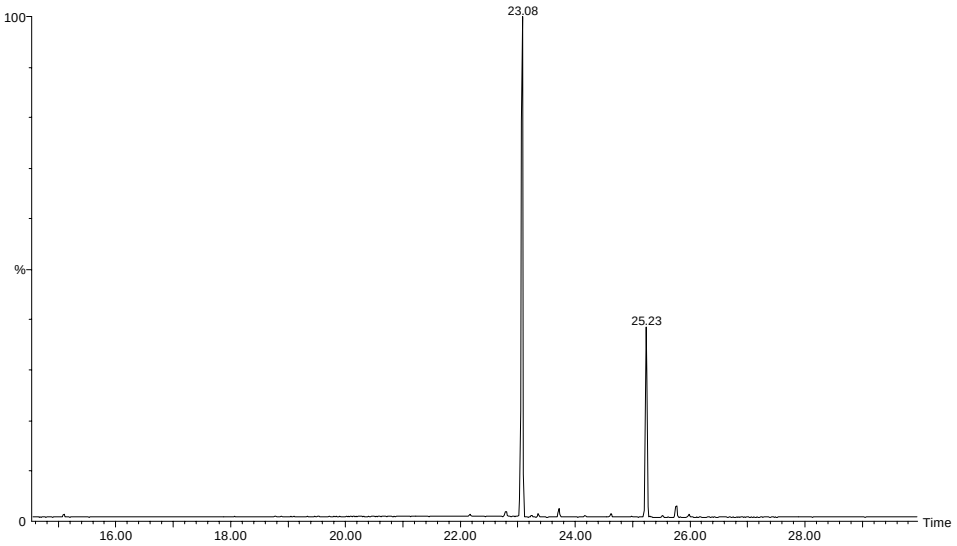


Abb. 5-22: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm des Blütenöls von *Sisyrinchium micranthum* nach direkter Trimethylsilylierung (Prozentangaben bezogen auf Lipidsignale).[1] Bedingungen: **GCT 1**. TMS-Ester, bzw. TMS-Ether von **RT 15.10 min** 16:0 (0,38 %), **22.17** 2-MAG [16:0] **XV** (0,55 %), **22.80** 1,2-DAG [16:1(9*t*), 2:0] **XVI** (0,76 %), **23.08** 1,2-DAG [16:0, 2:0] **XVII** (67,24 %), **23.35** 1,3-DAG [16:0, 2:0] **XVIII** (0,51 %), **23.72** TAG [16:0, 2:0, 2:0] **XIX** (1,07 %), **25.23** 1,2-DAG [16:0, 4:0] **XX** (26,79 %), **25.78** 1,2-DAG [16:0, *i*-5:0] **XXI** (1,67 %), **25.98** TAG [16:0, 4:0, 2:0] **XXII** (0,49 %).

[1] Die Strukturen der Acylglycerine werden abgekürzt durch Angabe des Verbindungstyps und der gebundenen Fettsäuren in eckigen Klammern beschrieben. Die Reihenfolge, in der die Fettsäuren angegeben werden, entspricht ihrer Kettenlänge und gibt nicht die Position im Acylglycerin wieder (s. Text).

Die Analyse ergab, dass das Sekret überwiegend aus Acylglycerinen mit nicht funktionalisierten Fettsäuren besteht. Bei den beiden Hauptkomponenten **XVII** und **XX** handelt es sich um 1,2-Diacylglycerine mit einem Palmitoyl- und einem Acetyl-, bzw. Butanoylrest. Es werden zwei weitere 1,2-Diacylglycerine **XVI** und **XXI** mit einem Palmitoleoyl- und einem Acetyl-, bzw. einem Palmitoyl- und einem 2-Methyl-butanoylrest gefunden. Das einzige in geringen Mengen nachgewiesene 1,3-Diacyl-glycerin **XVIII** ist das Regioisomer der Hauptkomponente **XVII** und vermutlich durch Acylmigration während der Lagerung aus diesem hervorgegangen. Der Bistrimethylsilylether von 2-Palmitoylglycerin **XV** wird als einziges Derivat eines Monoacylglycerins nachgewiesen. Zwei in geringen Anteilen auftretende Triacyl-glycerine **XIX** und **XXII** enthalten jeweils einen Palmitoyl- und zwei Acetyl- oder einen Acetyl- und einen Butanoylrest. Neben den Acylglycerinen wurde eine geringe Menge Palmitinsäure nachgewiesen.

Abb. 5-23 zeigt als Beispiel für ein Massenspektrum eines trimethylsilylierten 1,2-Diacylglycerins mit einem langkettigen und einem kurzkettigen Acylrest das von **XX** mit einem Palmitoyl- und einem Butanoylrest.

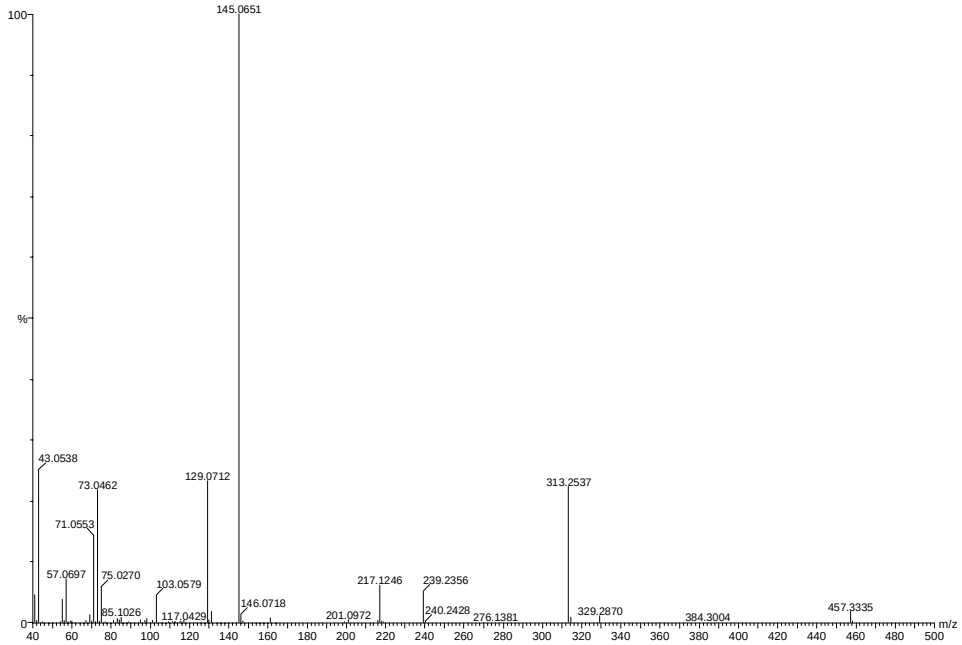
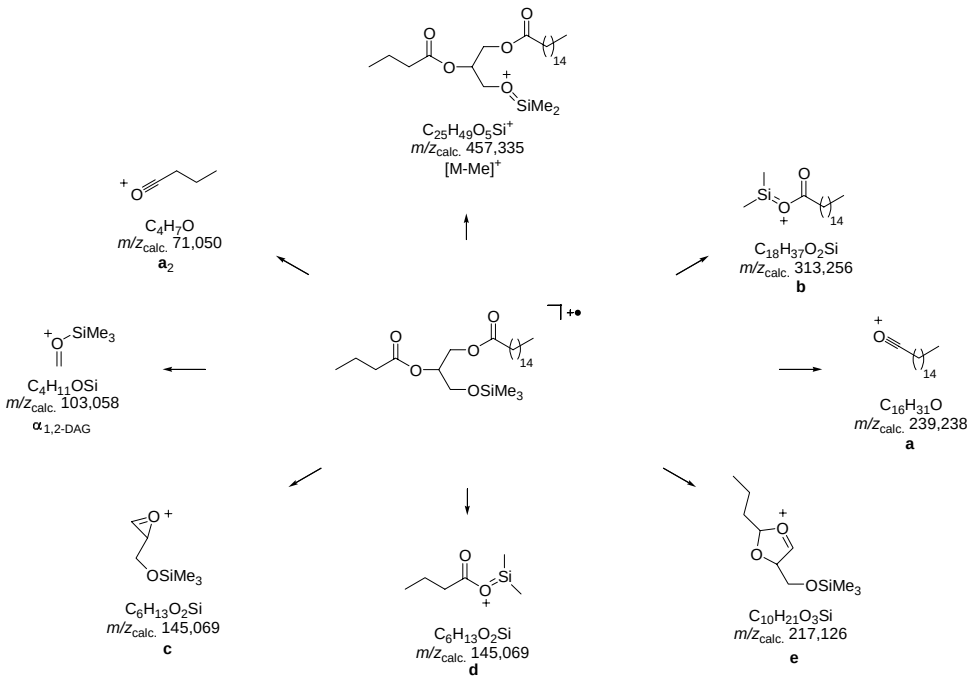


Abb. 5-23: EI-Massenspektrum (GCT) des trimethylsilylierten 1,2-Diacylglycerins XX mit einem Palmitoyl- und einem Butanoylrest.

Der langkettige Acylrest wird anhand des Acyliumions **a** bei *m/z* 239,236 und des Umlagerungsproduktes **b** bei *m/z* 313,254 identifiziert (s. **Schema 5-6**). Der kurzkettige Acylrest führt zu einem Acyliumion $\mathbf{a}_2$ bei *m/z* 71,055. Die hohe Intensität des Signals bei *m/z* 145,065 beruht auf der Überlagerung zweier isobarer Ionen **c** und **d**. Eine Bestätigung, dass eine C_4-Säure gebunden ist, gelingt über das Ion **e** bei *m/z* 217,125, welches nach Abspaltung des Palmitoyl-Radikals entsteht. Das es sich um ein 1,2-Diacylglycerin handelt, ergibt sich aus dem Signal $\alpha_{1,2\text{-DAG}}$ bei *m/z* 103,058 ($[CH_2OTMS]^+$) und dem Fehlen der Bruchstücke um

eine sekundäre Trimethylsiloxyfunktion. Charakteristische Fragmente aller trimethylsilylierten 1,2-Diacylglycerine aus dem Blütenöl von *S. micranthum* sind in **Tabelle A-10** zusammengefaßt.



Schema 5-6: Wichtige Fragmente des trimethylsilylierten 1,2-Diacylglycerins XX mit einem Palmitoyl- und einem Butanoylrest.

Das EI-Spektrum des trimethylsilylierten 1,3-Diacylglycerins **XVIII** mit einem Palmitoyl- und einem Acetylrest zeigt ebenfalls Ionen der Typen $[M\text{-}Me]^+$ (*m/z* 429,309, 3,8 %, $m/z_{calc.}$ 429,304), **a** (*m/z* 239,238, 5,5 %, $m/z_{calc.}$ 239,236), **b** (*m/z* 313,256, 2,0 %, $m/z_{calc.}$ 313,256), **d** (*m/z* 117,040, 21,3 %, $m/z_{calc.}$ 117,037) und **e** (*m/z* 189,096, 5,3 %, $m/z_{calc.}$ 189,095). Ein zu **c** analoges Fragment fehlt, anstelle von $\alpha_{1,2\text{-DAG}}$ treten $\alpha\mathbf{1}_{1,3\text{-DAG}}$ (*m/z* 175,079, 100 %, $m/z_{calc.}$ 175,079) und $\alpha\mathbf{2}_{1,3\text{-DAG}}$ bei (*m/z* 371,300, 8,2 %, $m/z_{calc.}$ 371,298) als Fragmente der α-Spaltungen um die sekundäre Trimethylsiloxyfunktion auf.

Das Triacylglycerin **XIX** mit einem Palmitoyl- und zwei Acetylresten zeigt im EI-Spektrum kein Molekülion. Ion mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ist das Acyliumion der Palmitinsäure bei *m/z* 239,238 (16,8 %, $m/z_{calc.}$ 239,238). Ein Fragment bei *m/z* 159,065 (39,8 %, $m/z_{calc.}$ 159,066) entsteht durch Abspaltung des langkettigen Acyloxyradikals und bestätigt, dass zwei Essigsäurereste an das Glycerinrückgrat gebunden sind. Basepeak ist $[CH_3CO]^+$ (*m/z* 43,018, 100 %, $m/z_{calc.}$ 43,018).
Analoge Fragmente beim Triacylglycerin **XXII** mit einem Palmitoyl-, einem Butanoyl- und einem Acetylrest sind *m/z* 239,239 (32,3 %, $m/z_{calc.}$ 239,238), *m/z* 187,098 (42,4 %, $m/z_{calc.}$ 187,097) und *m/z* 71,050 (100 %, $m/z_{calc.}$ 71,050).

Der TMS-Ester von **16:0** und der Bistrimethylsilylether des 2-Palmitoylglycerins **XV** wurden anhand von Referenzspektren in der NIST-Datenbank identifiziert.

Wie in **Abschnitt 5.2.1** bereits beschrieben, lassen sich Regioisomere von 1,2-Diacylglycerinen in bestimmten Fällen anhand der EI-Massenspektren der TBDMS- oder Nicotinylderivate unterscheiden. Für die TBDMS-Ether wurde geprüft, ob das Verfahren auch dann anwendbar ist, wenn eine kurzkettige Fettsäure gebunden ist. Hierzu wurde ein Aliquot des Blütenöls mit *N*-Methyl-*N*-(*tert*.-butyldimethylsilyl)trifluoracetamid bei 80 °C umgesetzt. Bei dieser Methode entstanden durch Isomerisierung größere Mengen des 1,3-Diacylglycerins und des chromatographisch trennbaren Regioisomeren zum ursprünglichen 1,2-Diacylglycerin. In den Spektren beider 1,2-Diacylglycerine war das Ion, welches durch Abspaltung des langkettigen Acyloxyradikals entsteht, das intensivere, so dass diese Methode hier keine Anwendung finden kann.

Das *FAME Profiling* wird in diesem Abschnitt in Anschluß an die Untersuchung der trimethylsilylierten Probe beschrieben, da aufgrund der dort erhaltenen Resultate eine andere Derivatisierungsmethode zu verwenden war. Nach als Standardreaktion durchgeführter saurer Methanolyse der Blütenölprobe mit BF_3 in MeOH wurden lediglich Palmitinsäuremethylester (98,8 %) und der Methylester einer Hexadecensäure nachgewiesen (1,2 %). Die kurzkettigen Fettsäuren werden, wie in **Abschnitt 5.1.2** beschrieben, während der Aufarbeitung verloren. Um sie auf Methylverzweigungen zu untersuchen, wurde ein pyrolytisches Derivatisierungsverfahren mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) als Reagenz angewandt (s. **Abschnitt 6.13**) [127-131,163]. Wie unten beschrieben, wurden Buttersäure und 2-Methylbuttersäure (*i*-5:0) neben Essigsäure durch Vergleich mit Referenzsubstanzen als kurzkettige Fettsäuren identifiziert.

Als Standardsubstanzen wurden Buttersäure, 2-Methylbuttersäure, 3-Methylbuttersäure und Valeriansäure (jeweils 1 µL in 100 µL TCTFE) mit 100 µL 0,2 N TMSH-Lösung in Methanol umgesetzt. Die GC/MS-Untersuchungen erfolgen am MD 800 (SP-2560, Supelco; Bedingungen: **MD 5**). Als Retentionszeiten wurden für Buttersäuremethylester 14.62 min, 2-Methylbuttersäuremethylester 14.88 min, 3-Methylbuttersäuremethylester 15.18 min und für Valeriansäuremethylester 16.73 min ermittelt. Durch Vergleich der Retentionszeiten und charakteristischer McLafferty Fragmente (*m/z* 74, bzw. *m/z* 88) wurden Buttersäure und 2-Methylbuttersäure als kurzkettige Fettsäuren im Blütenöl von *S. micranthum* nachgewiesen.

Für den Hexadecensäuremethylester wurde über die Darstellung der Dimethyldisulfid-Addukte (DMDS-Addukte) zunächst gezeigt, dass sich die Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 befindet. Durch Vergleich der Retentionszeiten mit Standards lies sich ferner beweisen, dass es sich um Palmitoleinsäuremethylester handelt. Palmitoleinsäure tritt im gewöhnlichen Pflanzenstoffwechsel und in vielen Lipiden auf [23] (vgl. auch **Kapitel 2**).

Die Darstellung der DMDS-Addukte erfolgte wie in **Abschnitt 6.14** beschrieben. Die Reaktionsprodukte wurden in Dichlormethan gelöst und mittels GC/MS untersucht (HT-5, SGE; Bedingungen: **MD 6**). Als einziges Derivat einer 16:1-Säure wurde bei RT 26.49 min der Methylester von **9,10-diSMe 16:0** identifiziert. Charakteristische Fragmente sind das Molekülion bei *m/z* 362 (8,0 %) und die beiden Fragmente $[MeO(CO)(CH_2)_7CH(SCH_3)]^+$ bei *m/z* 217 (48,1 %) und $[CH_3(CH_2)_5CH(SCH_3)]^+$ bei *m/z* 145 (48,0 %) aus α-Spaltungen.

Palmitoleinsäure (**16:1(9*c*)**) und Palmitelaidinsäure (**16:1(9*t*)**) (Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Schweden) wurden mit Diazomethan zu den Methylestern umgesetzt (**s. Abschnitt 6.11**). Nach Optimierung des Temperaturprogramms konnten die beiden Regiosiomeren auf einer unpolaren belegten Säule (DB-5 MS, J & W Scientific; Bedingungen: **GCT 2**) vollständig getrennt werden (RT 21.35 min für den Ester von **16:1(9*c*)** und RT 21.50 min für den Ester von **16:1(9t)**). Der Methylester des Analyten koeluierte mit dem von **16:1(9*c*)**.

Auf die Aufnahme von ESI-Massenspektren wurde verzichtet, um die restliche Substanz für Vergleichszwecke zu erhalten.

5.5 Blütenöl mit acetylierten Dihydroxyfettsäuren

5.5.1 Das Blütenöl von *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae)

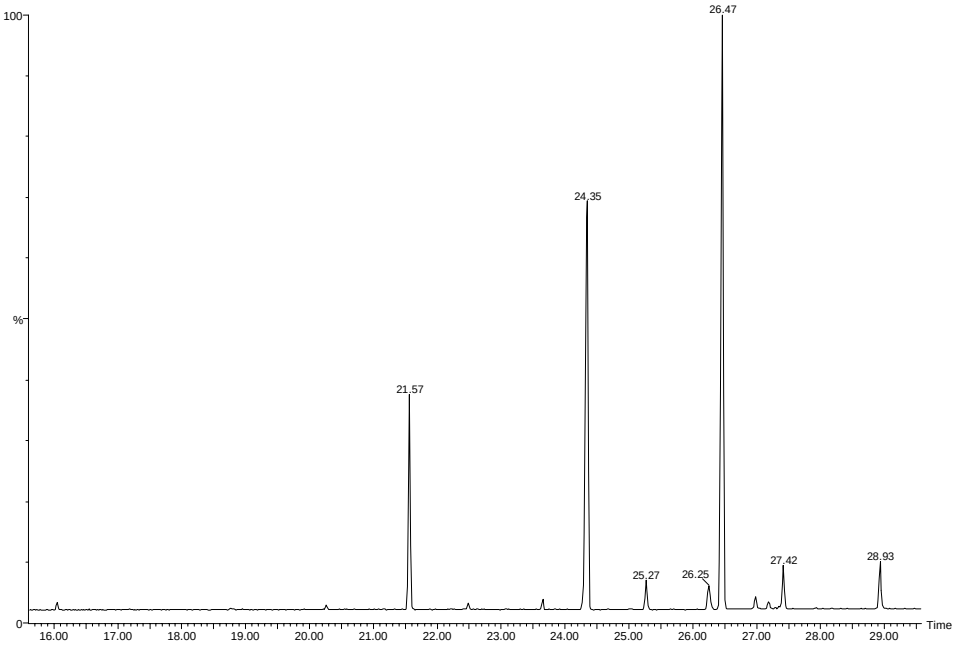


Abb. 5-24: Fettsäuremethylesterprofil des Blütenöls von *Malpighia coccigera*. (Bedingungen: **GCT 1**). Methylester von **RT 16.05 min** 3-OTMS 16:0, **18.77** 3-OTMS 18:0, **21.57** 7-OTMS 20:0, **22.48** 7-OAc 20:0, **23.67** 3,7-bisOTMS 20:0, **24.30**[a(1), (5%)] 9-OTMS 22:0, **24.35**[a(1), (95%)] 7-OTMS 22:0, **25.25**[a(2), (3%)] 9-OAc 22:0, **25.27**[a(2), (97%)] 7-OAc 22:0, **26.25**[a(3), (79%)] 5,9-bisOTMS 22:0, **26.28**[a(3), (21%)] 3,7-bisOTMS 22:0, **26.47** 3,9-bisOTMS 22:0, **26.98**[a(4), (3%)] 9-OTMS 24:0, **26.98**[a(4), (97%)] 7-OTMS 24:0, **27.18** 3-OAc, 9-OTMS 22:0, **27.42** 9-OAc, 3-OTMS 22:0, **28.92**[a(5), (35%)] 5,11-bisOTMS 24:0, **28.92**[a(5), (65 %)] 3,9-bisOTMS 24:0.

[a(i)] Chromatographische Trennung der Regiosiomeren nicht vollständig. Prozentangaben beziehen sich jeweils auf zwei koeluierende Verbindungen)

Abb. 5-25 zeigt das Chromatogramm des Blütenöls von *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae) nach vierstündiger Umsetzung mit BF_3 in Methanol und anschließender Trimethylsilylierung. Die Hauptkomponenten sind trimethylsilylierte Mono- oder Dihydroxyfettsäuremethylester.

Unter den monohydroxylierten Fettsäuren überwiegen die an Position C-7 funktionalisierten Verbindungen, so lassen sich zwei der drei Peaks mit einer relativen Intensität von über 40 % bei RT 21.57 min, bzw. RT 24.35 min auf die Methylester von

7-OTMS 20:0 und **7-OTMS 22:0** zurückführen. Eine kleinere Menge der analogen C_{24}-Verbindung wird bei RT 26.98 min beobachtet. In den Fällen der beiden längerkettigen Verbindungen eluiert jeweils früher, aber nicht vollständig getrennt, ein geringerer Anteil der isomeren Methylester von **9-OTMS 22:0**, bzw. **9-OTMS 24:0** bei RT 24.30 min, bzw. RT 26.98 min. Bezogen auf die an Position C-7 funktionalisierten Isomere wurden die Anteile zu 5 %, bzw. 3 % berechnet (s.u.). Nach unserem Kenntnisstand ist in der Literatur keine gaschromatographische Methode zur vollständigen Trennung von langkettigen, isomeren Hydroxyfettsäuren beschrieben, so dass in dieser Arbeit, wie auch in der Literatur, teilweise Massenspektren von Gemischen interpretiert werden [164-166].
Aufgrund einer offensichtlich nicht vollständig erfolgten Methanolyse werden bei RT 22.48 min, RT 25.25 min und RT 25.27 min geringe Mengen der Methylester von **7-OAc 20:0**, **9-OAc 22:0** und **7-OAc 22:0** gefunden.
Derivate der 3-Hydroxyfettsäuren **3-OH 16:0** und **3-OH 18:0**, treten in dem Chromatogramm bei RT 16.05 min und RT 18.77 min in Spuren auf.
Bei den Dihydroxyfettsäuren ist der Methylester von **3,9-bisOTMS 22:0**, der gleichzeitig zum Signal mit höchster Intensität im *Total Ion Chromatogramm* führt, mit RT 26.47 min die Hauptkomponente. In deutlich geringeren Anteilen werden die Methylester von **3,7-bisOTMS 20:0** bei RT 23.67 min, **5,9-bisOTMS 22:0** bei RT 26.25 min, **3,7-bisOTMS 22:0** bei RT 26.28 min, **5,11-bisOTMS 24:0** bei RT 28.92 min und **3,9-bisOTMS 24:0** ebenfalls bei RT 28.92 min beobachtet.
Aufgrund der nicht vollständigen Methanolyse werden auch Derivate von monoacetylierten Dihydroxyfettsäuren gefunden, namentlich die Methylester von **3-OAc, 9-OTMS 22:0** und **9-OAc, 3-OTMS 22:0** bei RT 27.18 min und RT 27.42 min.

Massenspektren von trimethylsilylierten Monohydroxyfettsäuremethylestern (ausgenommen 3-Hydroxyfettsäuremethylester)

Die 7-, bzw. 9-Trimethylsiloxyfettsäuremethylester wurden anhand ihrer Massenspektren identifiziert. Untersuchungen analoger Verbindungen sind bei P. J. Holloway und F. Gelin *et al.* beschrieben [164,167].
Im hohen Masse-zu-Ladungs-Bereich werden die Fragmente $[M\text{-}Me]^+$, $[M\text{-}MeO]^+$ und $[M\text{-}Me\text{-}MeOH]^+$ beobachtet. Im Gegensatz zu den 3-Trimethylsiloxyfettsäuremethylestern treten beide durch α-Spaltung möglichen Fragmente auf, so z.B. bei dem 7-Trimethylsiloxyeicosansäuremethylester α_1 ($[MeO(CO)(CH_2)_5CH(OTMS)]^+$) bei $m/z_{calc.}$ 231,142 und α_2 ($[(TMSO)CH(CH_2)_{12}CH_3]^+$) bei $m/z_{calc.}$ 285,261. Das Fragment (α_1-MeOH) wird jeweils in geringer Intensität beobachtet. Typisch für in der Mitte der Kette hydroxylierte Fettsäuren sind auch die Ionen **u** aus der Umlagerung der TMS-Gruppe zur Carboxylgruppe unter gleichzeitigem Bruch der Kohlenstoffkette, benachbart zur ursprünglichen Trimethylsiloxyfunktion [167]. Bei 7-Trimethylsiloxyfettsäuremethylestern liegt **u** $[MeO(COTMS)(CH_2)_5]$ bei $m/z_{calc.}$ 202,139.
Die Anteile der 9-Trimethylsiloxyfettsäuremethylester, die als Mindermengenkomponenten mit den isomeren 7-Trimethylsiloxyfettsäuremethylestern eluieren, wurden aus den Integralen über die Massenspuren der α-Fragmente berechnet. Unabhängig davon, ob die Fragmente des Typs α_1 oder α_2 herangezogen wurden, waren die Ergebnisse sehr ähnlich (Abweichungen um 1 %); es wurde jeweils gemittelt. Die massenspektrometrischen Daten der einzelnen Verbindungen sind, unter Berücksichtigung exakter Massen und relativer Intensitäten, in **Tabelle A-11** angegeben.

Massenspektren von trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylestern

Die Interpretation der EI-Massenspektren von trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylester soll zunächst am Beispiel von **3,9-bisOTMS 22:0** beschrieben werden. **Abb. 5-26** zeigt dass Massenspektrum, in **Schema 5-7** werden charakteristische Fragmente wiedergegeben.

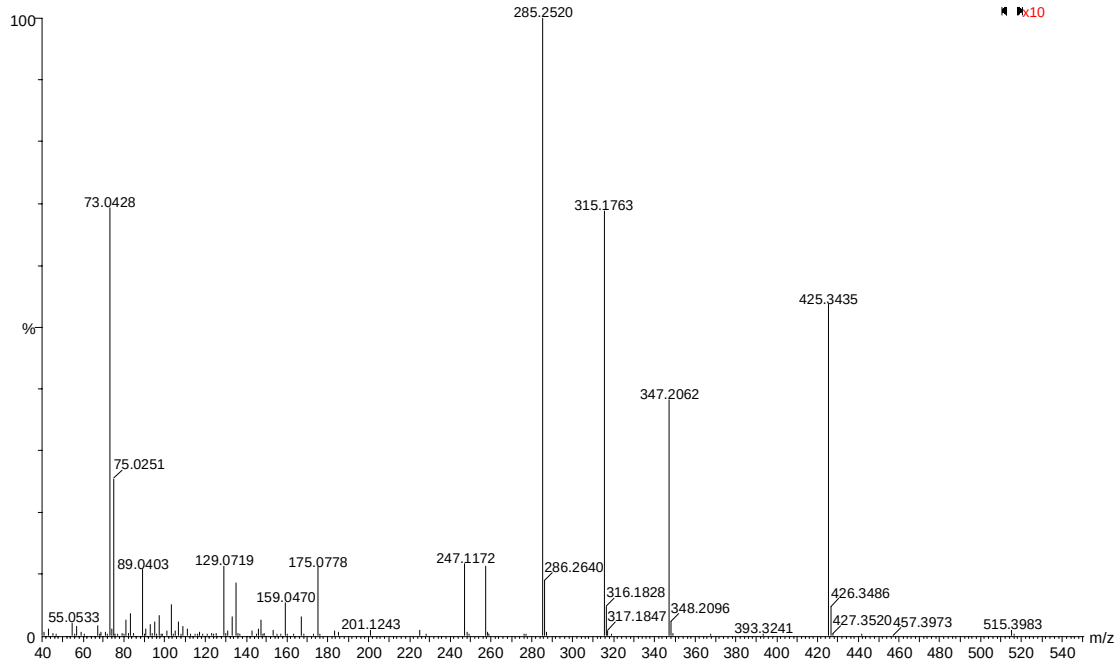
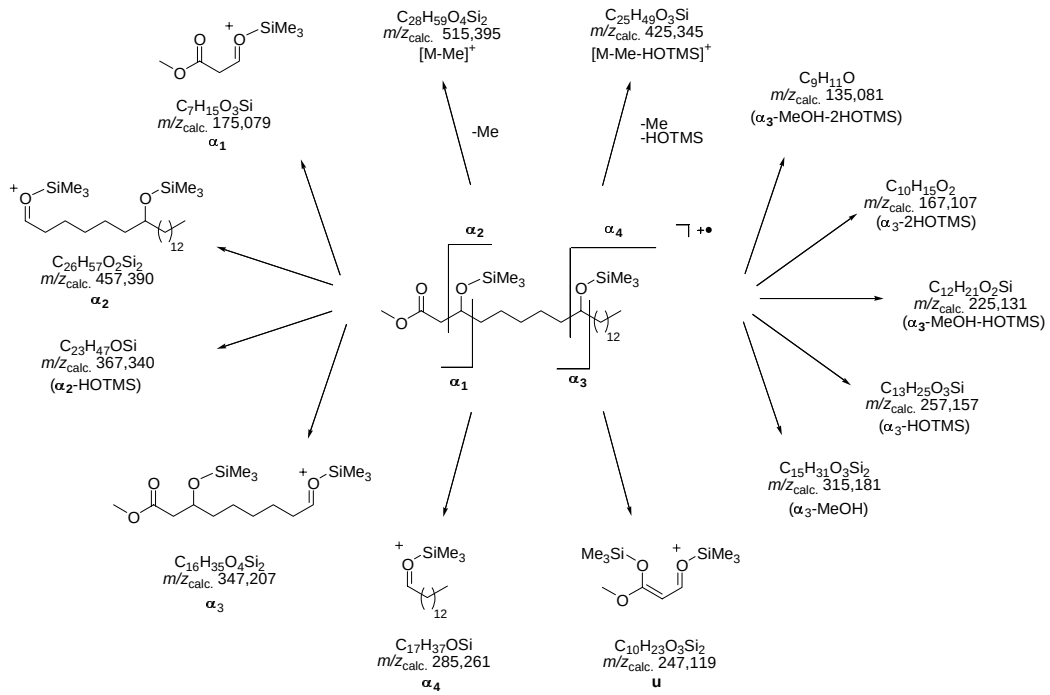


Abb. 5-26: EI-Massenspektrum (GCT) des Methylesters von 3,9-bisOTMS 22:0.



Schema 5-7: Charakteristische Fragmente des Methylesters von 3,9-bisOTMS 22:0.

Ion mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ist $[M\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 515,398, allerdings in geringer Intensität. Das erste signifikante Fragment ist $[M\text{-}Me\text{-}HOTMS]^+$ bei *m/z* 425,344.
Es folgt eine Reihe von Ionen aus α-Spaltungen. Mit α_1 und α_2 werden die Fragmente bezeichnet, die durch die näher an der Methylesterfunktion gelegene Trimethylsiloxyfunktion induziert werden. Die Fragmente α_3 und α_4 entstehen um die näher am Methylende des Fettsäuremethylesters gelegene Trimethylsiloxyfunktion. Das jeweils erstgenannte Fragment enthält die Esterfunktion; α_1 wird bei *m/z* 175,078 und α_3 bei *m/z* 347,206 beobachtet. Die Fragmente α_2 bei *m/z* 457,397 und α_4 bei *m/z* 285,252 enthalten das Methylende des Fettsäurederivates. Das Fragment α_2 und sein Folgefragment (α_2-HOTMS), hier bei *m/z* 367,343, besitzen bei an C-3 hydroxylierten Dihydroxyfettsäuren eine sehr geringe Intensität. Von Fragment α_3 leiten sich zahlreiche Ionen unter Verlust von Neutralteilchen ab. Interessant ist hierbei das Fragment (α_3-MeOH) bei *m/z* 315,176, welches mit einer relativen Intensität um 70 % beobachtet wird. Es tritt bei mittig monohydroxylierten Fettsäuremethylestern, wie oben und in der Literatur beschrieben, nur in geringer Intensität auf [167]. Offensichtlich wird die Fragmentbildung durch die Trimethylsiloxyfunktion an Position C-3 begünstigt. Weitere Fragmente sind (α_3-HOTMS) bei *m/z* 257,156, (α_3-MeOH-HOTMS) bei *m/z* 225,134, (α_3-2HOTMS) bei *m/z* 167,106 und (α_3-MeOH-2HOTMS) bei *m/z* 135,080. Schließlich wird ein intensiveres Fragment aus einer Umlagerung bei *m/z* 247,117 beobachtet, das die Struktur **u** besitzen könnte (s. **Schema 5-7**). Mit Ausnahme für das intensitätsschwache Fragment α_2 und den Basepeak α_4 stimmen alle gemessenen Massen innerhalb einer Fehlertoleranz von 5 mDa mit den berechneten Massen überein (s. **Tabelle A-12**).

Dihydroxyfettsäuren, die an Position C-3 keine Hydroxyfunktion besitzen, treten in dem hier beschriebenen Experiment nur im Gemisch mit eben solchen auf. Der Methylester von **5,9-bisOTMS 22:0** eluiert zeitgleich mit dem von **3,7-bisOTMS 22:0** und **5,11-bisOTMS 24:0** mit **3,9-bisOTMS 24:0**. Eine vollständige Interpretation der Massenspektren ist möglich, da bei den an C-5 substituierten Fettsäuren das Fragment (α_3-MeOH) nicht auftritt. Wird als Beispiel das Gemisch der C_{24}-Säuren betrachtet, so kann aus den Fragmenten α_1 bei *m/z* 175,081 (6,2 %, $m/z_{calc.}$ 175,079) und *m/z* 203,112 (28,1 %, $m/z_{calc.}$ 203,110), α_3 bei *m/z* 347,210 (13,7 %, $m/z_{calc.}$ 347,207) und *m/z* 375,243 (2,9 %, $m/z_{calc.}$ 375,239), sowie α_4 bei *m/z* 313,294 (65,4 %, $m/z_{calc.}$ 313,293) und *m/z* 285,263 (37,6 %, $m/z_{calc.}$ 285,261) zunächst abgeleitet werden, dass trimethylsilylierte Dihydroxyfettsäuremethylester mit den Trimethylsiloxyfunktionen an den Positionen C-3 oder C-5 und C-9 oder C-11 vorliegen. Nur zu dem Fragment α_3 bei *m/z* 347,210, welches zu der an Position C-9 funktionalisierten Fettsäure gehört, tritt ein um 32 Masseneinheiten leichteres Fragment (α_3-MeOH) bei *m/z* 315,185 (32,7 %, $m/z_{calc.}$ 315,181) auf. Wie oben dargelegt, ist es charakteristisch für an Position C-3 funktionalisierte Dihydroxyfettsäuren. Dementsprechend besteht das Gemisch aus den Methylestern von **5,11-bisOTMS 24:0** und **3,9-bisOTMS 24:0**. Analog ist die Zuordnung bei den C_{22}-Säuren möglich.
Ein zu **u** analoges Fragment fehlt bei den an C-5 substituierten Verbindungen.
Die Anteile der im Gemisch eluierenden Verbindungen wurden aus den Integralen über die Massenspuren der Fragmente des Typs α_4 abgeschätzt, da die Intensitäten der Fragmente α_1, α_2 und α_3 stark vom Substitutionsmuster abhängen.
Die massenspektrometrischen Daten aller Vertreter des soeben diskutierten Verbindungstyps sind in **Tabelle A-12** zusammengefaßt.

Massenspektren von Acetoxyfettsäuremethylestern mit mittig angeordneter Acetoxyfunktion

Im höheren Masse-zu-Ladungs-Bereich tritt das Fragment $[M\text{-}HOAc]^+$ in geringer Intensität auf. Das erste signifikante Ion ist $[M\text{-}HOAc\text{-}MeOH]^+$. Im Gegensatz zu den 3-Acetoxyfettsäuremethylestern tritt, induziert durch die Acetoxyfunktion, ein Fragment **α** einer α-Spaltung auf, welches die

Methylesterfunktion enthält, so z.B. $[MeO(CO)(CH_2)_5CH(OAc)]^+$ bei $m/z_{calc.}$ 201,113 bei den 7-Acetoxyfettsäuremethylestern. Basepeak in den Spektren ist jeweils (α-CH_2CO).
Der Anteil des 9-Acetoxydocosansäuremethylesters, der mit dem an C-7 funktionalisierten Regioisomeren eluiert, wurde aus den Fragmenten des Typs (α-CH_2CO) berechnet.
Die massenspektrometrischen Daten der Vertreter dieser Verbindungsklasse sind in **Tabelle A-13** zusammengefaßt.

Massenspektren von gemischt acetylierten und trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylestern

Die EI-Massenspektren der gemischt acetylierten und trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylester sollen zunächst am Beispiel des Methylesters von **9-OAc, 3-OTMS 22:0** diskutiert werden. Von dieser Verbindung wird kein Molekülion erhalten, jedoch eine Reihe von Fragmenten unter Abspaltung kleiner Neutralteilchen: $[M\text{-}HOAc]^+$ bei *m/z* 440,372 (0,1 %, $m/z_{calc.}$ 440,368), $[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 425,346 (100 %, $m/z_{calc.}$ 425,345), $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS]^+$ bei *m/z* 350,327 (0,3 %, $m/z_{calc.}$ 350,327), $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}HOMe]^+$ bei *m/z* 318,304 (0,4 %, $m/z_{calc.}$ 318,292), $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}HOMe\text{-}CO]^+$ bei *m/z* 290,302 (0,2 %, $m/z_{calc.}$ 290,297) und $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}HOMe\text{-}C_3H_6O]^+$ bei *m/z* 276,285 (3,0 %, $m/z_{calc.}$ 276,282).
Fragmente aus α-Spaltungen können induziert durch die Trimethylsiloxy- oder die Acetoxyfunktion entstehen. Mit α_1 wird das Fragment bezeichnet, welches durch C-C-Bindungsbruch benachbart zur Trimethylsiloxyfunktion entsteht und die Methylesterfunktion des Fettsäurederivates enthält. Es tritt hier bei *m/z* 175,080 (21,9 %, $m/z_{calc.}$ 175,079) auf und charakterisiert die Verbindung als 3-Trimethylsiloxymethylester. Ion α_2 ist das entsprechende Fragment mit dem Alkylende des Fettsäurederivates. Es wird selbst nicht beobachtet, aber (α_2-HOAc) bei *m/z* 367,343 (0,3 %, $m/z_{calc.}$ 367,340).
Ähnlich wird das Fragment α_3, welches aus einer α-Spaltung um die Acetoxyfunktion entsteht und das Methylesterende des Fettsäurederivates enthält nicht beobachtet, aber (α_3-CH_2CO) bei *m/z* 275,175 (1,0 %, $m/z_{calc.}$ 275,168) und (α_3-CH_2CO-HOTMS) bei *m/z* 185,117 (1,1 %, $m/z_{calc.}$ 185,118). Anhand dieser Fragmente läßt sich die Funktionalisierung der Fettsäure durch einen Acyloxysubstituenten an Position C-9 nachweisen. Dass es sich um einen Acetoxysubstituenten handelt, ergibt sich aus den ESI-massenspektrometrischen Untersuchungen (s.u.).
Außer für die beiden intensitätsschwachen Signale $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS]^+$ und $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}HOMe]^+$ und (α_3-CH_2CO) stimmen alle gemessenen Massen innerhalb der Fehlertoleranz von 5 mDa mit den berechneten überein. Charakteristische Fragmente dieser und analoger Verbindungen sind in **Tabelle A-14** zusammengefaßt.

Bei RT 27.18 min kommt in geringen Mengen der Methylester des reversen Isomeren **3-OAc, 9-OTMS 22:0** vor. Das Spektrum hat ein deutlich differenziertes Erscheinungsbild. So ist das Signal $[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 425,351 (1,0 %, $m/z_{calc.}$ 425,345) vergleichsweise intensitätsschwach. Basepeak ist hier ein Ion bei *m/z* 285,261 ($[CH(OTMS)(CH)_{12}CH_3]^+$, $m/z_{calc.}$ 285,261), welches auf eine Trimethylsiloxyfunktion in Position (ω-13) hinweist. Weitere Fragmente $[MeO(CO)CH_2CH(OAc)(CH_2)_5CH(OTMS)]^+$ bei *m/z* 317,180 (11,3 %, $m/z_{calc.}$ 317,178) und ein analoges Fragment nach Abspaltung von Essigsäure bei *m/z* 257,157 (83,2 %, $m/z_{calc.}$ 257,157) bestätigen dies für eine C_{22}-Säure und belegen ferner einen Acetoxyrest, dessen Position C-3 durch das Ion $[MeO(CO)CH_2CH(OH)]^+$ bei *m/z* 103,058 (3,9 %, $m/z_{calc.}$ 103,040) bestätigt wird.

Um zu überprüfen, ob die Fettsäuren im Blütenöl von *M. coccigera* frei oder in gebundener Form vorliegen und welche Hydroxygruppen acyliert sind, wurde ein Aliquot des Sekrets mit MSTFA umgesetzt und gaschromatographisch/massenspektrometrisch untersucht (s. **Abb. 5-27**).

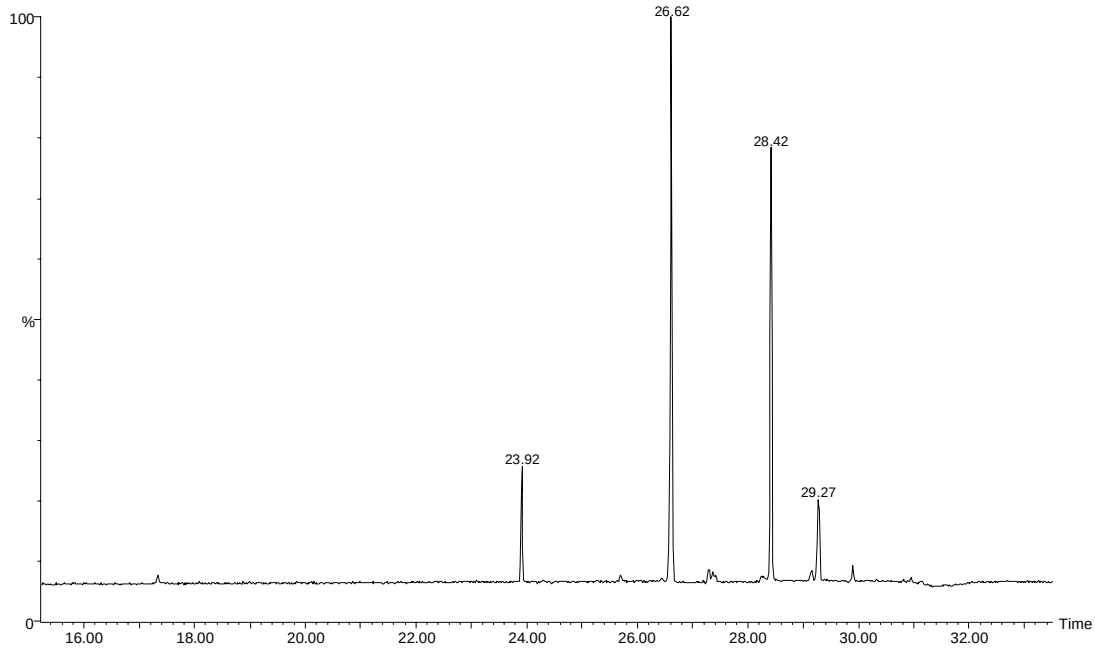


Abb. 5-27: Gaschromatogramm des Blütenöls von *M. coccigera* nach Trimethylsilylierung. Bedingungen: **GCT 1**. Trimethylsilylester von **RT 17.33 min** 3-OTMS 16:0, **18.08** 3-OAc 16:0, **20.87** 3-OAc 18:0, **23.92** 7-OAc 20:0, **25.70** 7-OAc, 3-OTMS 20:0, **26.62**[a(1), (97%)] 7-OAc 22:0, **26.63**[a(1), (3%)] 9-OAc 22:0, **28.25** 7-OAc, 3-OTMS 22:0, **28.29** 3-OAc, 9-OTMS 22:0 oder 5-OAc, 9-OTMS 22:0[b], **28.42** 9-OAc, 3-OTMS 22:0[a(2), (>92 %)], **28.42** 9-OAc, 5-OTMS 22:0[a(2), (<8 %)], **29.15**[a(3), (94%)] 7-OAc 24:0, **29.17**[a(3), (6%)] 9-OAc 24:0, **29.27** 3,9-diOAc 22:0, **30.82** 9-OAc, 3-OTMS 24:0, **30.95** 11-OAc, 5-OTMS 24:0. Methylester von **RT 27.28 min** 9-OAc, 5-OTMS 22:0, **27.42** 9-OAc, 3-OTMS 22:0, **29.90** 11-OAc, 5-OTMS 24:0.

a(i) Chromatographische Trennung der Regioisomeren nicht vollständig.
b Siehe Erläuterungen im Text.

Bei den detektierten Verbindungen handelt es sich fast ohne Ausnahme um Trimethylsilylester, woraus geschlossen werden kann, dass die Säuren im ursprünglichen Sekret in freier Form vorliegen.

Die an Position C-7 hydroxylierten Fettsäuren werden ausschließlich in acetylierter Form nachgewiesen. So werden die TMS-Ester von **7-OAc 20:0** bei RT 23.92 min, **7-OAc 22:0** bei RT 26.62 min und **7-OAc 24:0** bei RT 29.15 min beobachtet. Analog zu den Untersuchungen der Fettsäuremethylester eluieren nicht vollständig abgetrennt von den beiden letztgenannten Verbindungen geringe Anteile der TMS-Ester von **9-OAc 22:0** (3 % relativ zu **7-OAc 22:0**) bei RT 26.63 min und **9-OAc 24:0** (6% relativ zu **7-OAc 24:0**) bei RT 29.17 min. **7-OAc 20:0** und **7-OAc 22:0** sind zwei von vier Hauptkomponenten aus dem Blütenöl von *M. coccigera.*

In Spuren werden die TMS-Ester von **3-OTMS 16:0** bei RT 17.33 min, **3-OAc 16:0** bei RT 18.08 min und **3-OAc 18:0** bei RT 20.87 min gefunden.
Von den Dihydroxyfettsäuretrimethylsilylestern ist der größte Teil monoacetyliert und zwar an der jeweils weiter von der Carboxylgruppe entfernten Hydroxyfunktion. So tritt als dritte Hauptkomponente im Derivatgemisch der TMS-Ester von **9-OAc, 3-OTMS 22:0** bei RT 28.42 min auf. In einem Anteil von weniger als 8 % koeluiert der regiosiomere TMS-Ester von **9-OAc, 5-OTMS 22:0** (s.u.). In deutlich geringeren Mengen als der TMS-Ester von **9-OAc, 3-OTMS 22:0** werden die von **7-OAc, 3-OTMS 20:0** bei RT 25.70 min, **7-OAc, 3-OTMS 22:0** bei RT 28.25 min, **9-OAc, 3-OTMS 24:0** bei RT 30.82 min und **11-OAc, 5-OTMS 24:0** bei RT 30.95 min gefunden. Hinweise auf Spuren einer monoacetylierten Dihydroxyfettsäure, bei der die näher am Methylende gelegene Hydroxygruppe acyliert ist, finden sich nur bei RT 28.92 min. Es handelt sich entweder um **3-OAc, 9-OTMS 22:0** oder **5-OAc, 9-OTMS 22:0**. Aufgrund der geringen Substanzmenge kann zwischen den beiden Verbindungen nicht unterschieden werden (s.u.).
Als diacetyliertes Dihydroxyfettsäurederivat wird nur der TMS-Ester von **3,9-diOAc 22:0** bei RT 29.27 min nachgewiesen.
Neben den TMS-Estern werden in der Probe geringe Mengen der Methylester von **9-OAc, 5-OTMS 22:0** bei RT 27.82 min, **9-OAc, 3-OTMS 22:0** bei RT 27.42 min und **11-OAc, 5-OTMS 24:0** bei RT 29.90 min beobachtet. Es handelt sich hier vermutlich um Artefakte aus der Lagerung in einem *tert*.-Butylmethylether/Methanol-Gemisch.

Massenspektren von Fettsäuretrimethylsilylestern mit mittig angeordneter Acetoxyfunktion

In den EI-Massenspektren von Fettsäuretrimethylsilylestern mit mittig angeordneter Acetoxyfunktion werden keine Molekülionen beobachtet. Das Ion mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ist $[M\text{-}HOAc]^+$ bei *m/z* 382,331 (1,6 %, $m/z_{calc.}$ 382,327), wenn als Beispiel das Massenspektrum des Trimethylsilylesters von **7-OAc 20:0** betrachtet wird. Es folgen die Ionen $[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$ (*m/z* 367,303, 64,5 %, $m/z_{calc.}$ 367,303) und $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS]^+$ (*m/z* 292,280, 5,7 %, $m/z_{calc.}$ 292,277). Basepeak des Spektrums ist $[TMSO(CO)(CH_2)_5CH(OH)]^+$ oder (α-CH_2CO) (*m/z* 217,125, $m/z_{calc.}$ 217,126), aus dem die Substitution an C-7 abgeleitet werden kann. Das Fragment α ($[TMSO(CO)(CH_2)_5CH(OAc)]^+$, $m/z_{calc.}$ 259,147) tritt nur mit sehr schwacher Intensität auf und ist somit nicht charakteristisch. Ein Hinweis, dass es sich bei dem Acyloxy- um einen Acetoxyrest handelt, ergibt sich aus dem Fragment $[CH_3CO]^+$ (*m/z* 43,019, 8,5 %, $m/z_{calc.}$ 43,018), der endgültige Nachweis gelingt allerdings erst mit den ESI-Massenspektren. Ein intensives Fragment $[TMSO(CO)]^+$ (*m/z* 117,035, 88,7 %, $m/z_{calc.}$ 117,037) ist charakteristisch für Trimethylsilylester, allerdings dürfte auch hier eine Überlagerung mit dem isobaren Fragment $[AcOSiMe_2]^+$ aus einer Umlagerung auftreten. Alle experimentell bestimmten Massen stimmen innerhalb einer Fehlertoleranz von 5 mDa mit den berechneten Massen überein. Charakteristische Signale weiterer Vertreter dieser Verbindungsklasse sind in **Tabelle A-15** zusammengefaßt.

Massenspektren von gemischt acetylierten und trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuretrimethylsilylestern

Im Folgenden wird die Interpretation eines Spektrums von zwei chromatographisch nicht voneinander getrennten, monoacetylierten und mit MSTFA umgesetzten Dihydroxyfettsäuren bei RT 28.42 min wiedergegeben. Das Spektrum ist in **Abb. 5-28** dargestellt. Hauptkomponente ist der Trimethylsilylester von **9-OAc, 3-OTMS 22:0**. Charakteristische Fragmente sind **Schema 5-8** zu entnehmen.

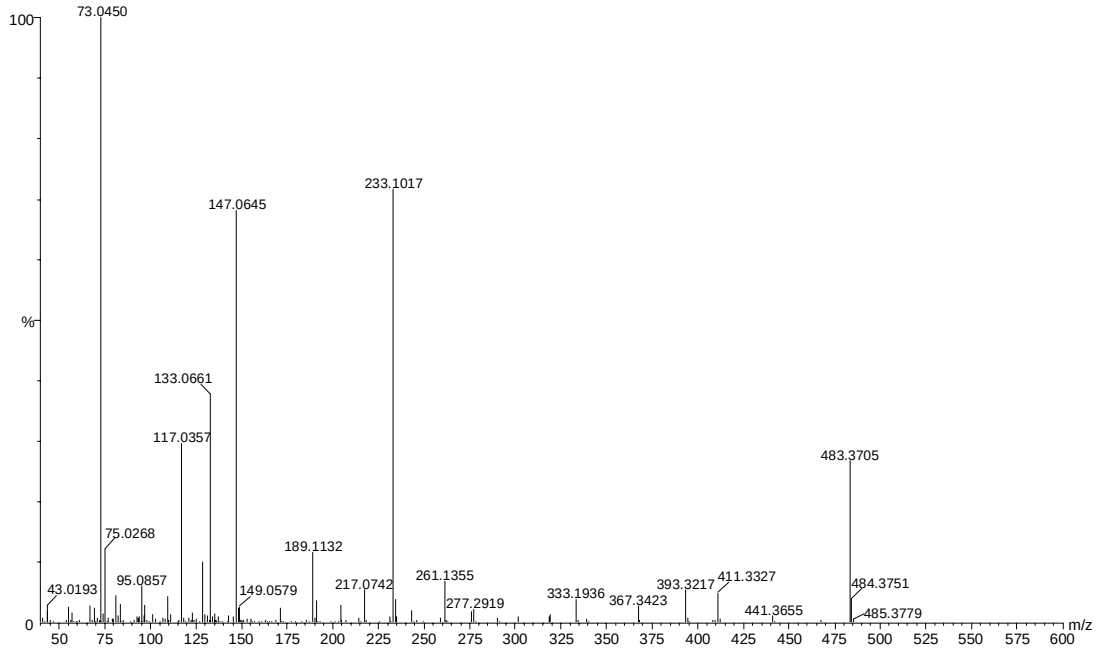
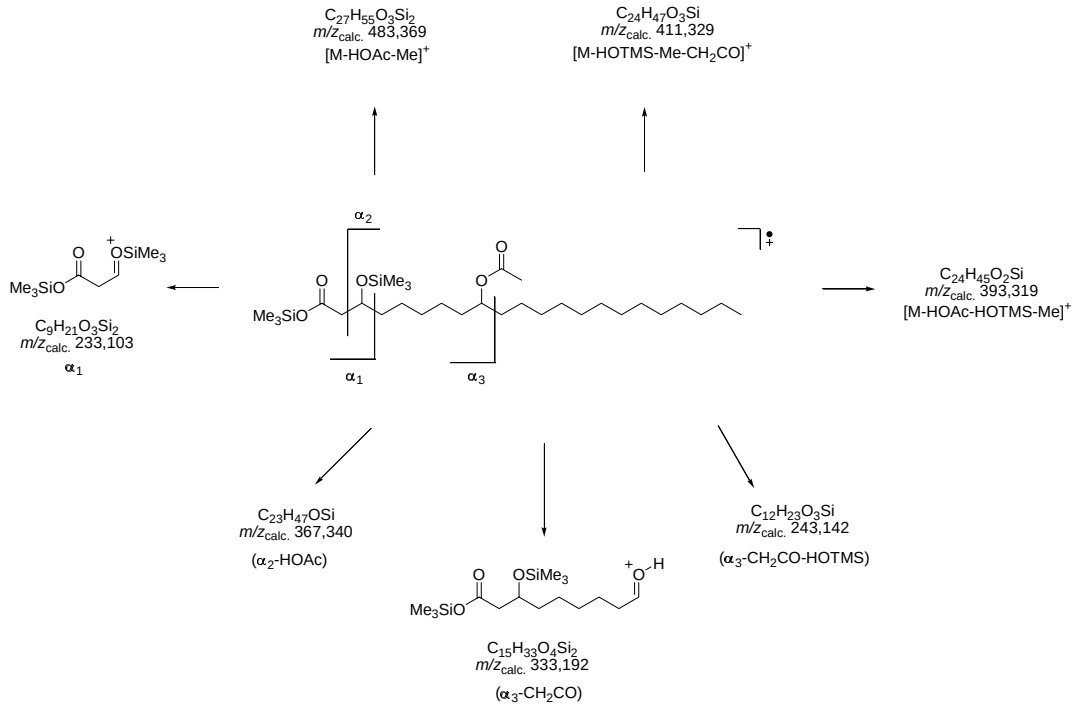


Abb. 5-28: EI-Massenspektrum (GCT) eines Gemisches der TMS-Ester von 9-OAc, 3-OTMS 22:0 (> 92 %) und 9-OAc, 5-OTMS 22:0 (< 8 %).

In dem Spektrum wird kein Molekülion beobachtet, das Fragment mit dem höchsten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ist $[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 483,371. Es folgen die Ionen $[M\text{-}HOTMS\text{-}Me\text{-}CH_2CO]^+$ bei *m/z* 411,333 und $[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 393,322. Induziert durch die näher an der Esterfunktion liegende und trimethylsilylierte Hydroxyfunktion werden die Fragmente α_1 und (α_2-HOAc) gebildet. Ion α_1 bei *m/z* 233,102 charakterisiert die Verbindung als 3-Trimethylsiloxytrimethylsilylester. Aufgrund der leichten Abspaltung von Essigsäure wird α_2 selbst nicht beobachet; (α_2-HOAc) tritt bei *m/z* 367,342 auf. Eine Mißinterpretation des Signals (α_2-HOAc) als Hinweis auf eine ungesättigte 3-Acetoxyfettsäure kann durch Berücksichtigung der Signale (α_3-CH_2CO) und (α_3-CH_2CO-HOTMS) bei *m/z* 333,194 und *m/z* 243,145 vermieden werden, die auf eine Substitution durch eine Acyloxyfunktion an Position C-9 hinweisen. Dass es sich um Acetoxyfunktionen handelt, ergibt sich aus den mittels ESI-Massenspektrometrie ermittelten Molekülmassen (s.u.).



Schema 5-8: Charakteristische Fragmente des Trimethylsilylesters von 9-OAc, 3-OTMS 22:0.

Nach dem Fettsäuremethylesterprofil könnten neben der bereits nachgewiesenen Verbindung die folgenden einfach acetylierten C_{22}-Dihydroxyfettsäuren Bestandteile des Blütenöls von *M. coccigera* sein: **7-OAc, 3-OTMS 22:0**, **9-OAc, 5-OTMS 22:0**, sowie **3-OAc, 9-OTMS 22:0**, **3-OAc, 7-OTMS 22:0** und **5-OAc, 9-OTMS 22:0**. Alle Verbindungen sollten ähnliche Retentionszeiten aufweisen.
Das Signal bei *m/z* 261,136 in dem in **Abb. 5-28** wiedergegebenen Spektrum ist auf ein Ion des Typs α_1 ($[TMSO(CO)(CH_2)_3CHOTMS]^+$, $m/z_{calc.}$ 261,134) zurückzuführen. Von den o.a. Verbindungen wäre es nur durch den TMS-Ester von **9-OAc, 5-OTMS 22:0** zu erklären. Ein Fragment des Typs (α_2-HOAc) bei *m/z* 339,312 ($m/z_{calc.}$ 339,308) bestätigt die Koelution eines geringen Anteils dieser Verbindung mit dem TMS-Ester von **9-OAc, 3-OTMS 22:0**. Eine semiquantitative Bestimmung der Anteile ist nur grob möglich, da lediglich die Integrale über die Massenspuren der Fragmente des Typs α_1 oder (α_2-HOAc) hierzu herangezogen werden können. Die relative Intensität dieser Fragmente ist jedoch, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, für die an C-3 deutlich geringer als für die an C-5 funktionalisierten Verbindungen. Unter Auswertung von α_1 ergibt sich ein Anteil von **9-OAc, 5-OTMS 22:0** relativ zu **9-OAc, 3-OTMS 22:0** von unter 8 %.

Der Trimethylsilylester von **7-OAc, 3-OTMS 22:0** eluiert bei RT 28.25 min etwas früher, als die bisher diskutierten Verbindungen. Die Fragmente sind in **Tabelle A-16** zusammengefaßt.

Für die Massenspektren der monoacetylierten C_{22}-Dihydroxyfettsäuren, bei denen die näher an der jeweiligen Carboxyl-Gruppe gelegenen Hydroxygruppen acyliert wären, würden nach der Trimethylsilylierung intensive Fragmente aus α-Spaltungen um die OTMS-Funktionen an den Positionen C-7 oder C-9 erwartet. Nach diesen wurde mittels Massenspuren gesucht. Mit α_4 wird das Fragment bezeichnet, welches die TMS-Ester-Funktion des Fettsäurederivates enthält, α_5 enthält das Alkylende. Außer nach den beiden genannten Fragmenten wurde nach (α_4-HOAc) gesucht.
Die Fragmente α_4 bei *m/z* 375, (α_4-HOAc) bei *m/z* 315 und α_5 bei *m/z* 285 treten bei RT 28.29 auf. Sie lassen sich auf den Trimethylsilylester von **3-OAc, 9-OTMS 22:0** oder **5-OAc, 9-OTMS 22:0**

zurückführen. Ein α-Spaltfragment um die Acetoxyfunktion wird nicht beobachtet, so dass zwischen den zwei möglichen Verbindungen nicht unterschieden werden kann. Auf die Auswertung exakter Massen mußte wegen dem geringen Anteil dieser Komponente in der Probe ebenfalls verzichtet werden.
Signale, die auf den Trimethylsilylester von **3-OAc, 7-OTMS 22:0** hinweisen würden (α_4 bei *m/z* 347, (α_4-HOAc) bei *m/z* 287 und α_5 bei *m/z* 313) treten in dem entsprechenden Retentionszeitbereich nicht auf.

Von den TMS-Estern von **7-OAc, 3-OTMS 20:0**, **9-OAc, 3-OTMS 24:0** und **11-OAc, 5-OTMS 24:0** konnten bei RT 25.70 min, 30.82 min und 30.95 min Reinstoffspektren erhalten werden. Charakteristische Fragmente sind in **Tabelle A-16** zusammengefasst. Hinweise auf die isomeren monoacetylierten Dihydroxyfettsäuren, bei denen ausschließlich die näher an der Esterfunktion gelegene Hydroxygruppe acetyliert ist, wurden nicht gefunden.

Massenspektren von diacetylierten Dihydroxyfettsäuretrimetylsilylestern

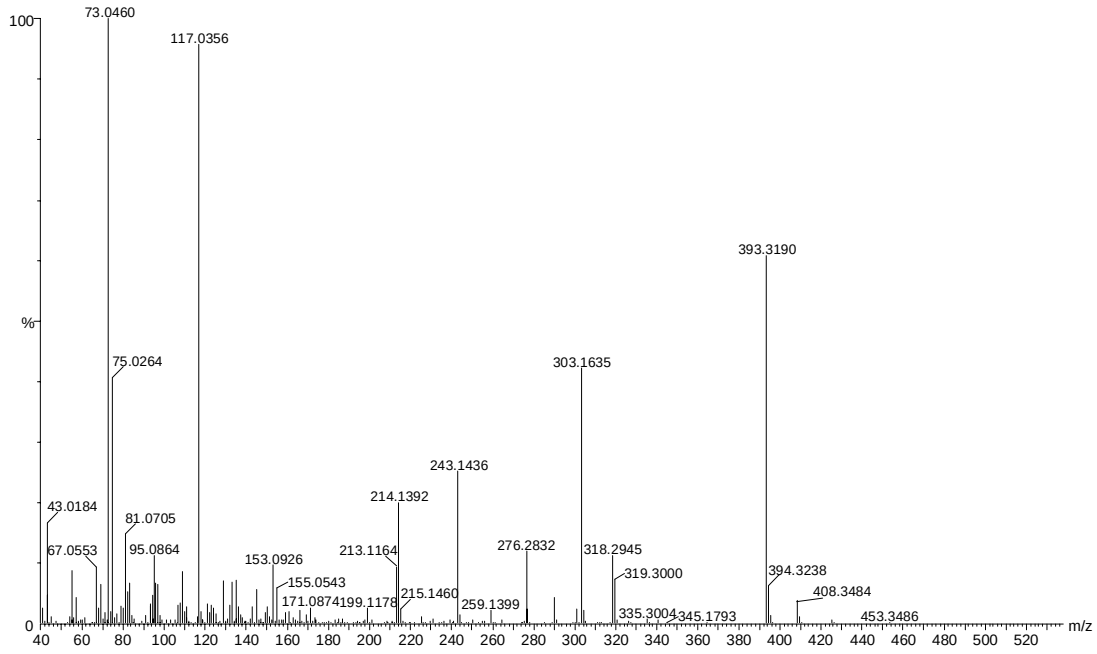
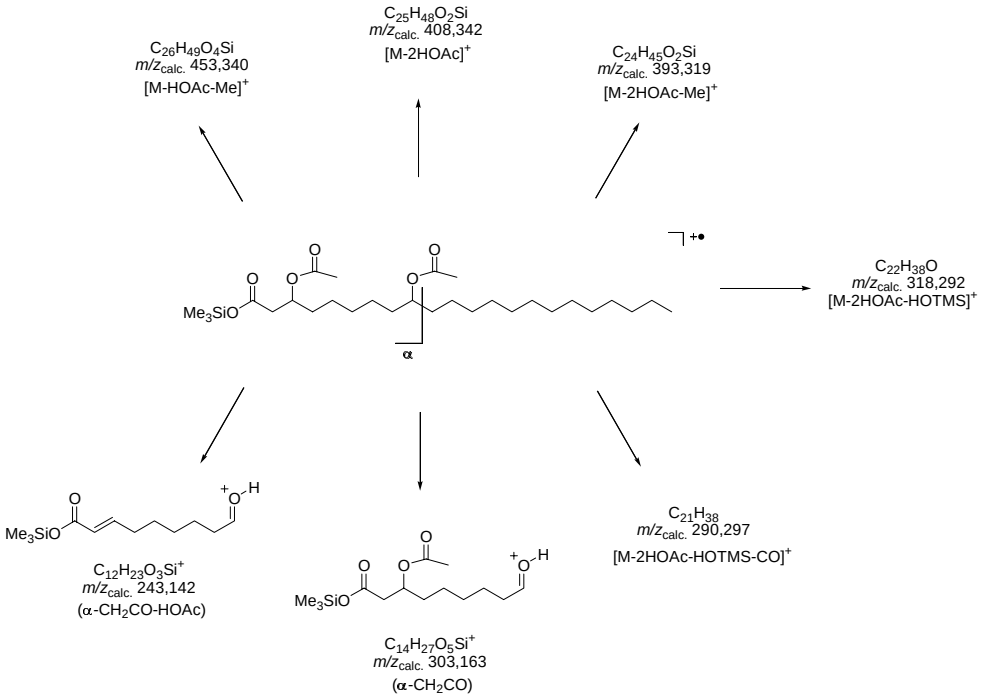


Abb. 5-29: EI-Massenspektrum (GCT) des Trimethylsilylesters von 3,9-diOAc 22:0.



Schema 5-9: Charakteristische Fragmente des TMS-Esters von 3,9-diOAc 22:0.

In **Abb. 5-29** ist das Massenspektrum des Trimethylsilylesters von **3,9-diOAc 22:0** dargestellt; wichtige Fragmente sind in **Schema 5-9** wiedergegeben (s. auch **Tabelle A-17**). Das Ion mit höchstem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ist $[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$ bei *m/z* 453,349. Es folgen die Fragmente $[M\text{-}2HOAc]^+$ (*m/z* 408,348), $[M\text{-}2HOAc\text{-}Me]^+$ (*m/z* 393,319), $[M\text{-}2HOAc\text{-}HOTMS]^+$ (*m/z* 318,295) und $[M\text{-}2HOAc\text{-}HOTMS\text{-}CO]^+$ (*m/z* 290,298). Aus den Fragmenten (α-CH_2CO) und (α-CH_2CO-HOAc) bei *m/z* 303,164 und *m/z* 243,144 läßt sich eine Funktionalisierung der Fettsäurekette durch eine Acyloxygruppe an Position C-9 ableiten. Außerdem zeigen sie, dass das Fragment (α-CH_2CO) einen zusätzlichen Acetoxyrest enthält. Nach den Ergebnissen des Fettsäuremethylesterprofils muß sich dieser an Position C-3 oder C-5 befinden. Für die an C-5 substituierte Verbindung wäre ein Fragment $[TMSO(CO)(CH_2)_3CH(OH)]^+$ ($m/z_{calc.}$ 189,095) zu erwarten, welches hier nicht beobachtet wird. Indirekt kann also darauf geschlossen werden, dass bei RT 29,30 min als Hauptkomponente der TMS-Ester von 22:0-OAc(3,9) eluiert, für den nach den Resultaten der monoacetylierten Verbindungen kein Fragment $[TMSO(CO)CH_2CH(OH)]^+$ zu erwarten wäre.

Weitere intensive Fragmente sind das reine Kohlenwasserstoff-Ion (*m/z* 276,283, $C_{20}H_{36}$, $m/z_{calc.}$ 276,282) und $[C_{11}H_{22}O_2Si]^+$ (*m/z* 214,139, $m/z_{calc.}$ 214,139). Signale bei *m/z* 117, *m/z* 75 und *m/z* 73 wurden bereits erläutert.

Außer den beiden bereits erwähnten C_{22}-Diacetoxyfettsäuren könnte auch **3,7-diOAc 22:0** Bestandteil des Blütenöls von *M. coccigera* sein. Zu erwartende Fragmente sind hier (α-CH_2CO) bei $m/z_{calc.}$ 275,132 und (α-CH_2CO-HOAc) bei *m/z* 215,110. Beide Fragmente konnten in den entsprechenden Massenspuren nicht nachgewiesen werden.

Eine analoge Auswertung der Massenspuren ergab keinen Hinweis auf **3,7-diOAc 20:0**, **3,9-diOAc 24:0** oder **5,11-diOAc 24:0**.

Massenspektren von gemischt acetylierten und trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylestern

Die Massenspektren von gemischt acetylierten und trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylestern wurden schon weiter oben am Beispiel von **9-OAc, 3-OTMS 22:0** und **3-OAc, 9-OTMS 22:0** analysiert. Die in der hier diskutierten Probe erhaltenen Methylester von **9-OAc, 5-OTMS 22:0** und **11-OAc, 5-OTMS 24:0** fragmentieren analog zu dem, ebenfalls in dieser Probe enthaltenen, Methylester von **9-OAc, 3-OTMS 22:0**. Allerdings unterscheiden sich die relativen Intensitäten drastisch. Ursache sind die besonderen chemischen Eigenschaften eines Substituenten in C-3-Position des Methylesters.
Die massenspektrometrischen Daten sind in **Tabelle A-16** eingegliedert.

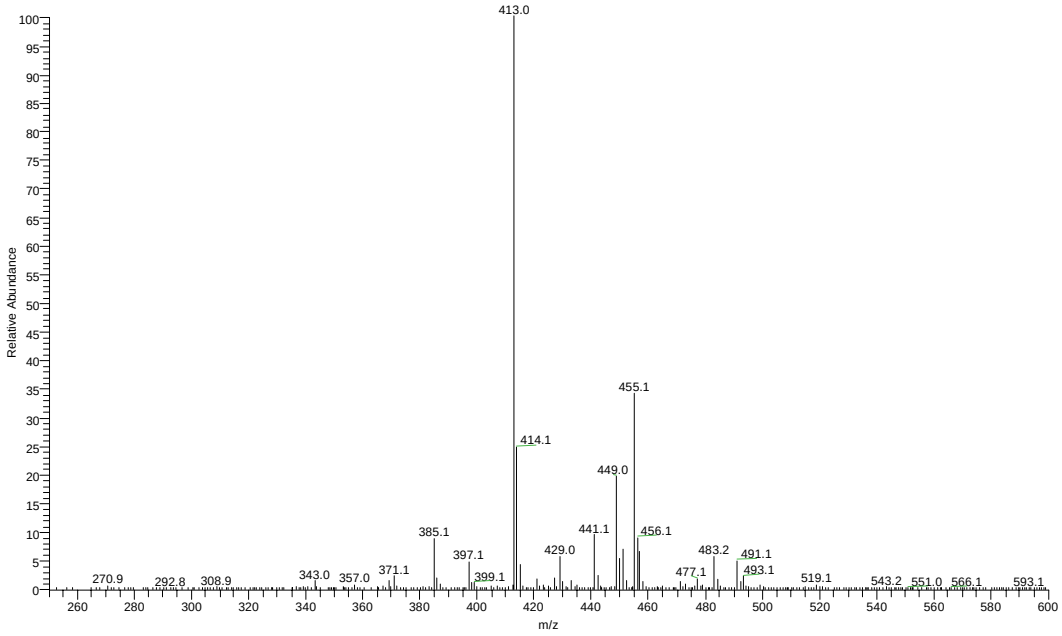


Abb. 5-30: Negativ-ESI-Spektrum des Blütenöls von *M. coccigera.*

Abb. 5-30 zeigt das Negativ-ESI-Spektrum des Blütenöls von *M. coccigera*. Es wurde unter den bereits diskutierten Bedingungen (s. **Abschnitt 5.2.1**) aufgenommen. In dem gezeigten Ausschnitt werden Quasimolekülionen des Typs $[M-H]^-$ und $[M+Cl]^-$ beobachtet, denen mit den GC/MS-Resultaten korrespondierende Strukturen zugewiesen wurden (s. **Tabelle 5-4**). Die ermittelten Molekülmassen bestätigen, dass es sich bei den Acyloxyfunktionen (entsprechend derivatisierter Fettsäuren) um Acetoxyfunktionen handelt. Wie oben ausgeführt, war der Nachweis mit den EI-Massenspektren der Methyl- oder TMS-Ester nicht immer möglich.

m/z	Ion
270,9	[**3-OH 16:0**-H]$^-$
369,1	[**7-OAc 20:0**-H]$^-$
386,3	[**7-OAc, 3-OH 20:0**-H]$^-$
397,1	[**7-OAc 22:0**-H]$^-$ (und [**9-OAc 22:0**-H])$^+$
413,0	[**9-OAc, 3-OH 22:0**-H]$^-$ (und [**7-OAc, 3-OH 22:0**-H]$^-$, [**3-OAc, 9-OH 22:0**-H]$^-$, [**5-OAc, 9-OH 22:0**-H]$^-$, [**9-OAc, 5-OH 22:0**-H]$^-$)
441,1	[**11-OAc, 5-OH 24:0**-H]$^-$ (und [**9-OAc, 3-OH 24:0**-H]$^-$)
449,0	[**9-OAc, 3-OH 22:0**+Cl]$^-$ (und [**7-OAc, 3-OH 22:0**+Cl]$^-$, [**3-OAc, 9-OH 22:0**+Cl]$^-$, [**5-OAc, 9-OH 22:0**+Cl]$^-$, [**9-OAc, 5-OH 22:0**+Cl]$^-$)
455,1	[**3,9-diOAc 22:0**-H]$^-$
477,3	[**11-OAc, 5-OH 24:0**+Cl]$^-$ (und [**9-OAc, 3-OH 24:0**+Cl]$^-$)
483,2	[**5,11-diOAc 24:0**-H]$^-$ (und [**3,9-diOAc 24:0**-H]$^-$)
491,1	[**3,9-diOAc 22:0**+Cl]$^-$
519,1	[**5,11-diOAc 24:0**+Cl]$^-$ (und [**3,9-diOAc 24:0**+Cl]$^-$)

Tabelle 5-4: Ionen im ESI-Spektrum (negativ) des Blütenöls von *M. coccigera*.

Ferner zeigt das Spektrum, dass keine bislang unbekannten, mittels Elektrospray negativ ionisierbaren Substanzen in größeren Mengen vorhanden sind. Im höheren Masse-zu-Ladungs-Bereich des Spektrums werden Clusterionen gefunden, die an dieser Stelle jedoch nicht diskutiert werden können. Auch aus dem Positiv-ESI-Spektrum (nicht dargestellt) ergeben sich keine Hinweise auf größere Mengen von Substanzen, die nicht mittels GC/MS schon nachgewiesen wurden.

Für alle drei in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden Aliquote der gleichen Probe verwendet. Da es sich bei EI-MS und ESI-MS jedoch um komplementäre massenspektrometrische Methoden handelt, werden für die einzelnen Substanzen unterschiedliche relative Signalintensitäten gefunden. So wurden mittels GC/EI-MS **7-OAc 20:0** und **7-OAc 22:0** als Hauptbestandteile des Blütenöls nachgewiesen. Die relative Intensität der Quasimolekülionen im Negativ-ESI-Spektrum beträgt jedoch maximal 5 %. Ursache ist die durch die zweite polare funktionelle Gruppe stark ansteigte Ionenausbeute, so dass die Signale der mono- oder diacetylierten Dihydroxyfettsäuren im Negativ-ESI-Spektrum dominieren. Die Komplementarität der Methoden bedingt, dass **3-OAc 16:0**, **3-OAc 18:0**, **7-OAc 24:0** und **9-OAc 24:0** als Nebenkomponenten oder Spuren im Blütenöl von *M. coccigera* nur mittels GC/MS erfaßt werden. Andererseits werden Hinweise auf diacetylierte C_{24}-Säuren nur im ESI-Spektrum gefunden. So lassen sich die Ionen bei *m/z* 491,1 und *m/z* 519,1 nach den Resultaten aus den GC/MS-Untersuchungen der Fettsäuremethylester, den Anionen bzw. Chloridaddukten von **5,11-diOAc 24:0** und/oder **3,9-diOAc 24:0** zuordnen.

5.6 Blütenöl aus Acylglycerinen mit acetylierten Dihydroxyacylresten

5.6.1 Das Blütenöl von *Sigmatostalix huebneri* (Orchidaceae)

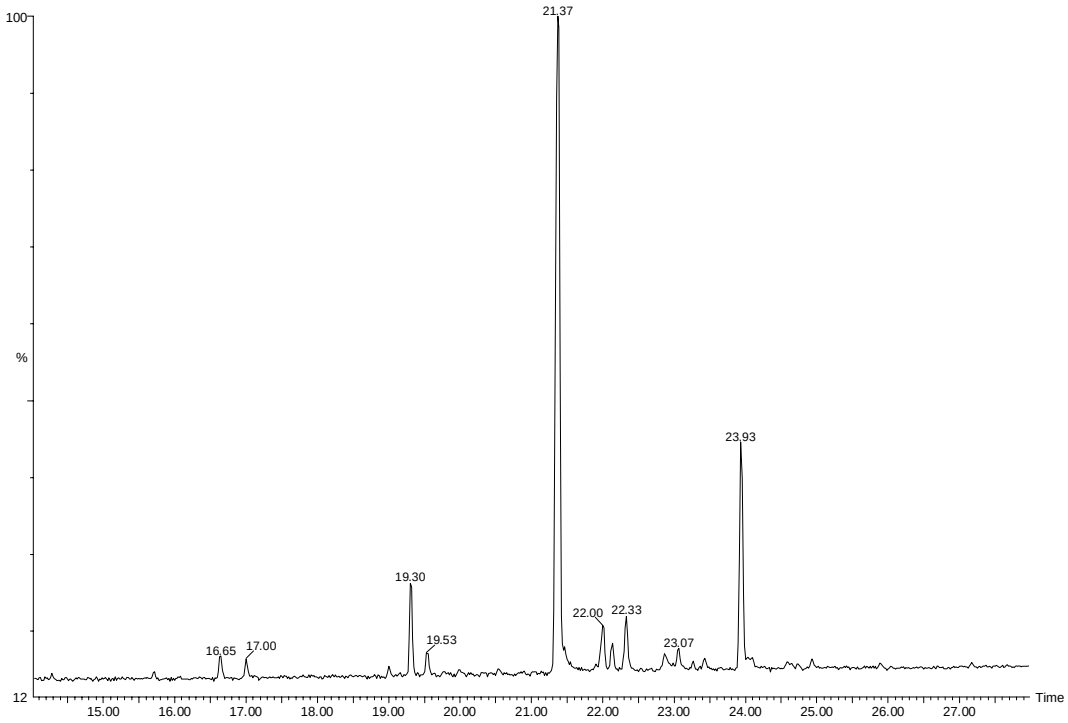


Abb. 5-31: Fettsäuremethylesterprofil des Blütenöls von *S. huebneri*. (Bedingungen: **GCT 4**). Methylester von **RT 16.65 min** 3-OTMS 18:0 (1,6 %), **19.30** 3-OTMS 20:0 (5,7 %), **19.53** 22:0 (1,2 %), **21.37** 3,7-diOTMS 20:0 (63,5 %), **22.00** 3-OTMS 22:0 (3,0 %), **22.13** 3-OAc, 7-OTMS 20:0 (1,5 %), **22.33** 7-OAc, 3-OTMS 20:0 (3,2 %), **23.93** 3,7-diOTMS 22:0 (16,6 %).

Das Blütenöl von *Sigmatostalix huebneri* (Orchidaceae) war nur in sehr begrenzten Mengen zugänglich. Im Fettsäuremethylesterprofil (nach Trimethylsilylierung, s. **Abb. 5-31**) werden überwiegend die Derivate von **3,7-diOH 20:0** (63,5 %) und **3,7-diOH 22:0** (16,6 %) nachgewiesen. Charakteristische Signale der Verbindungen sind in **Tabelle A-12** im Anhang aufgenommen. Daneben werden von der C_{20}-Fettsäure noch Reste der beiden möglichen monoacetylierten Verbindungen (1,5 % und 3,2 %), sowie geringere Mengen der Derivate von **3-OH 18:0** (1,6 %), **3-OH 20:0** (5,7 %) und **3-OH 22:0** (1,2 %), sowie von **22:0** (1,2 %) gefunden. Die Strukturen der Verbindungen bei RT 17.00 min und um RT 23.07 min (insgesamt 3 %) wurden nicht aufgeklärt.

Trimethylsilylierung des Blütenöls

Das nach der Trimethylsilylierung erhaltene Gaschromatogramm lies aufgrund der Signalformen auf eine thermische Zersetzung der Substanzen oder auf eine ungeeignet gewählte Belegung der Säule schließen (DB-5 MS, J & W Scientific). Das Eluieren der Hauptkomponenten erfolgte bei der maximal verwendbaren Temperatur von 300 °C. Weder durch Variationen der Temperaturprogramme, noch durch Verwendung einer Hochtemperatursäule (HT-5, SGE), konnten befriedigende Trenneigenschaften erreicht werden, so dass auf eine Auswertung von GC/MS-Daten an dieser Stelle verzichtet werden muß.

Die ESI-MS-Spektren des Blütenöls von *Sigmatostalix huebneri* (Orchidaceae)

Abb. 5-32 zeigt den Ausschnitt mit den Quasimolekülionen aus dem Positiv-ESI-Massenspektrum des Sekrets von *S. huebneri*. Die Signale sind auf vier unterschiedliche Moleküle oder Gruppen von isobaren Verbindungen, im Folgenden mit M_1 bis M_4 bezeichnet, zurückzuführen: $[M_1+H]^+$, $[M_1+NH_4]^+$, $[M_1+Na]^+$, $[M_1+K]^+$ bei *m/z* 545,2, *m/z* 562,2, *m/z* 567,2, *m/z* 583,2; $[M_2+NH_4]^+$, $[M_2+Na]^+$ bei *m/z* 590,3, *m/z* 595,2; $[M_3+NH_4]^+$, $[M_3+Na]^+$ bei *m/z* 604,3, *m/z* 609,2 und $[M_4+NH_4]^+$, $[M_4+Na]^+$ bei *m/z* 632,2 und *m/z* 637,2. Bei den Signalen im unteren Masse-zu-Ladungs-Bereich handelt es sich um Fragmentionen.

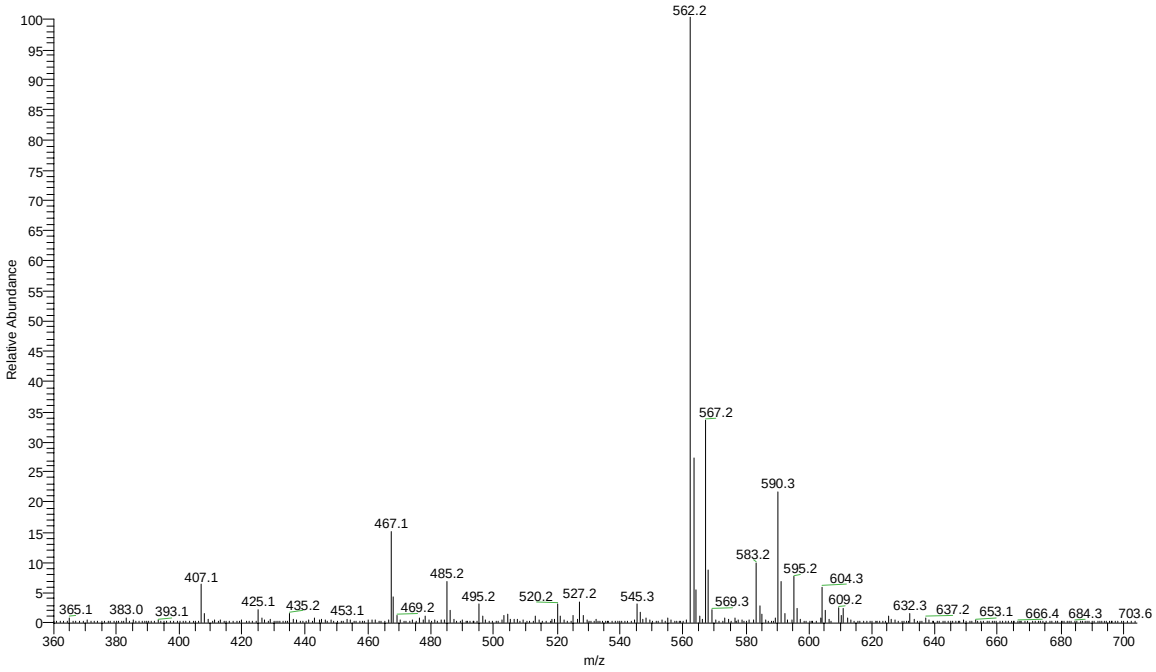


Abb. 5-32: Positiv-ESI-Massenspektrum des Blütenöls von *S. huebneri*.

Die Auswertung der ESI-CID-Massenspektren ergab, unter Berücksichtigung der Resultate aus den GC/MS-Untersuchungen, dass es sich bei M_3 und M_4 um Triacylglycerine, jeweils mit einem 3,7-Diacetoxyarachidoyl- oder -behenoyl- und zwei Acetylresten handelt. Bei M_1 und M_2 handelt es sich um Mischungen aus Diacyl- und Triacylglycerinen. Bei den Diacylglycerinen sind jeweils ein 3,7-Diacetoxyarachidoyl- oder -behenoyl- und ein Acetylrest an das Glycerinrückgrat gebunden, bei den Triacylglycerinen jeweils ein monoacetylierter Dihydroxyarachidoyl- oder -behenoyl- und zwei Acetylreste. Aus den CID-Spektren ergeben sich Hinweise darauf, dass die Diacylglycerine jeweils den größeren Anteil bilden.

Wie die im Fettsäuremethylesterprofil in geringeren Mengen gefundenen Derivate von **22:0**, **3-OH 18:0**, **3-OH 20:0** und **3-OH 22:0** im Blütenöl vorliegen, läßt sich aus den ESI-Spektren nicht eindeutig ermitteln. Es werden zwar bei *m/z* 476,3 und *m/z* 504,3 Signale mit schwacher Intensität gefunden, die darauf hindeuten, dass **3-OAc 20:0** und **3-OAc 22:0** ähnlich wie bei *D. barberae* oder *L. ciliata* mit jeweils einem weiteren Acetylrest in Diacylglycerinen gebunden sind, jedoch waren die Signale zu schwach um CID-Spektren aufzunehmen.

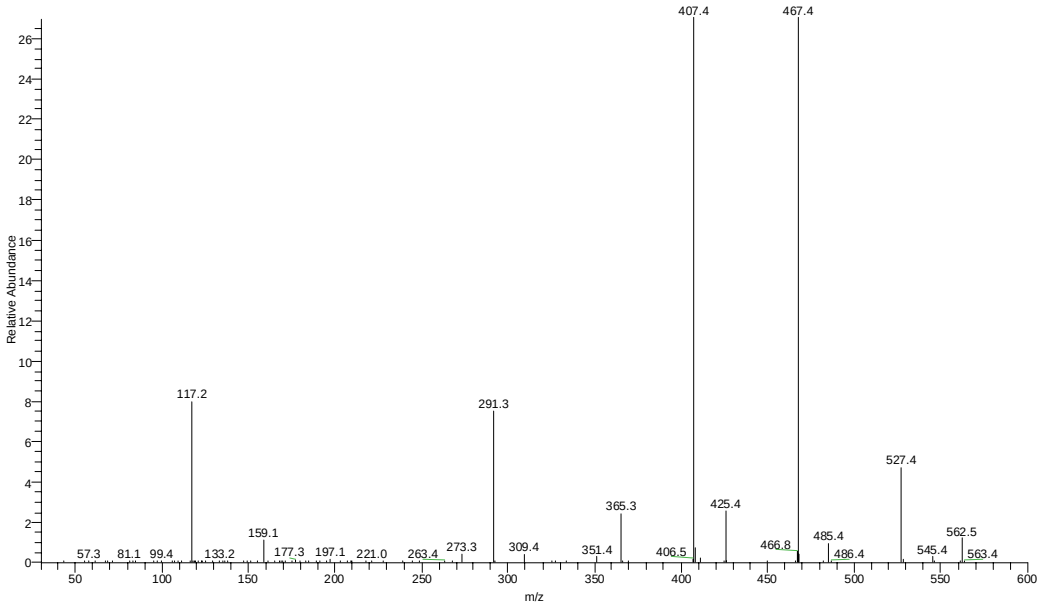


Abb. 5-33: CID-Spektrum (18 eV) von $[M_1+NH_4]^+$ bei *m/z* 562,2.

In **Abb. 5-33** ist das CID-Spektrum (18 eV) der Ionen bei *m/z* 562,2 dargestellt. Aus den Fragmenten $\mathbf{f}_{DAG}$ bei *m/z* 117,2 (8,0 %) und $\mathbf{f}_{TAG}$ bei *m/z* 159,2 (1,0 %) läßt sich ableiten, dass ein Gemisch aus einem Diacyl- und einem Triacylglycerin mit einem bzw. zwei Acetylgruppen, gebunden an das Glycerinrückgrat vorliegt (s. **Abschnitt 5.2.1**). Aus den Untersuchungen der Fettsäuremethylester und der Masse der Quasimolekülionen läßt sich schließen, dass im ersten Fall als verbleibende Acylfunktion der diacetylierte, im zweiten der monoacetylierte 3,7-Dihydroxyarachidoylrest gebunden sein könnte. Für den diacetylierten Acylrest wird dies durch das entsprechende Acyliumion $\mathbf{a}_{DAG}$ *bei m/z* 411,3 (0,2 %) und sich davon abgeleitenden Fragmenten ($\mathbf{a}_{DAG}$-HOAc) bei *m/z* 351,4 (0,2 %) und ($\mathbf{a}_{DAG}$-2HOAc) bei *m/z* 291,3 (7,5 %) bestätigt. Bei dem Triacylglycerin wird $\mathbf{a}_{TAG}$ selbst nicht gefunden, ($\mathbf{a}_{TAG}$-H_2O) entspricht ($\mathbf{a}_{DAG}$-HOAc) bei

m/z 351,4. Gleiches gilt für ($\mathbf{a}_{DAG}$-2HOAc), bzw. ($\mathbf{a}_{TAG}$-HOAc-H_2O) bei *m/z* 291,3. Das Fragment bei *m/z* 309,4 (0,4 %) läßt sich auf ($\mathbf{a}_{TAG}$-HOAc) zurückführen. Fragmente im hohen Massenbereich resultieren aus der Abspaltung kleiner Neutralteilchen: $[M+H]^+ = [M+NH_4\text{-}NH_3]^+$ bei *m/z* 545,4 (0,3 %), $[M+H\text{-}H_2O]^+$ bei *m/z* 527,4 (4,7 %), $[M+H\text{-HOAc}]^+$ bei *m/z* 485,4 (0,9 %), $[M+H\text{-}H_2O\text{-HOAc}]^+$ bei *m/z* 467,4 (61,6 %), [M+H-2HOAc] bei *m/z* 425,4 (2,5 %), [M+H-H_2O-2HOAc] bei *m/z* 407,4 (100 %) und [M+H-3HOAc] bei *m/z* 365,3 (2,4 %). Aussagen darüber, welcher Acylrest an welche Position des Glycerinrückgrats gebunden ist, und welche der Hydroxygruppen des langkettigen Acylrests im Triacylglycerin bevorzugt acetyliert ist, sind nicht möglich.
Analog zu den oben gemachten Ausführungen ergibt sich aus dem Stoßspektrum des Ammoniumadduktes bei *m/z* 590,3, dass ein Gemisch eines Diacylglycerins mit einem Acetyl- und einem 3,7-Diacetoxybehenoylrest vorliegt. Beiden Verbindungen gemeinsame Signale sind $[M+H]^+$ bei *m/z* 573,3 (0,4 %), $[M+H\text{-}H_2O]^+$ bei *m/z* 555,4 (4,9 %), $[M+H\text{-HOAc}]^+$ bei *m/z* 513,4 (1,2 %), $[M+H\text{-}H_2O\text{-HOAc}]^+$ bei *m/z* 495,4 (68,5 %), $[M+H\text{-2HOAc}]^+$ bei *m/z* 453,4 (2,2 %), [M+H-H_2O-2HOAc] bei *m/z* 435,4 (100 %) und $[M+H\text{-3HOAc}]^+$ bei *m/z* 393,4 (2,2 %). Die Acyliumionen sind $\mathbf{a}_{DAG}$ bei *m/z* 439,3 (0,1 %), ($\mathbf{a}_{DAG}$-HOAC) bzw. ($\mathbf{a}_{TAG}$-H_2O) bei *m/z* 379,4 (0,4 %), ($\mathbf{a}_{TAG}$-HOAc) bei 337,3 (0,5 %) und ($\mathbf{a}_{DAG}$-2 HOAc) bzw. ($\mathbf{a}_{TAG}$-H_2O-HOAc) bei *m/z* 319,3 (7,2 %). Die Fragmente $\mathbf{f}_{DAG}$ bei *m/z* 117,2 (8,0 %) und $\mathbf{f}_{TAG}$ bei *m/z* 159,2 (1,5 %) bestätigen wie gehabt das Vorliegen eines Gemisches aus Di- und Triacylglycerin.
Der Vergleich der relativen Intensitäten von *m/z* 117,2 (jeweils 8,0 %) und *m/z* 159,2 (1,0 % bzw. 1,5 %) läßt den Schluß zu, dass die Diacylglycerine überwiegen, zumal das Signal *m/z* 159 bei unten besprochenen Triacylglycerinspektren Basepeak ist (s.u.), während *m/z* 117 bei den strukturanalogen Diacylglycerinen mit einer 3-Acetoxyfettsäure und einem Essigsäurerest aus z.B. dem Blütenöl von *D. barberae* (s. **Abschnitt 5.2.1**) im Durchschnitt nur 11 % beträgt.

Bei den Ionen $[M_3+NH_4]^+$ mit *m/z* 604,3 und $[M_4+NH_4]^+$ mit *m/z* 632,2 handelt es um die Ammonium-addukte von Triacylglycerinen mit jeweils zwei Acetyl- und einem 3,7-Diacetoxyarachidoyl- oder einem 3,7-Diacetoxybehenoylrest. Das Fragmentierungsverhalten ist analog dem oben diskutierten, die spektralen Daten sind in **Tabelle A-18** zusammengefaßt.

5.7 Zusammenfassung, Vergleich von Blütenölkompositionen und Überlegungen zur Entstehung von Blütenölen und Ölblumen

5.7.1 Verschiedene Typen von Blütenölen

Ein Anliegen der Arbeit war, zu überprüfen, ob sich die pflanzliche Diversität der Ölblumen auch in den Zusammensetzungen der Blütenöle widerspiegelt. Anhand ausgewählter Beispiele konnte dargelegt werden, dass die Sekrete unterschiedlicher zusammengesetzt sind, als bisher bekannt. Insgesamt wurden in dieser Arbeit sechs Typen von Blütenölen vorgestellt, die in **Tabelle 5-5** zusammengefaßt sind. Die Proben stammen aus sieben von bislang acht Pflanzenfamilien, in denen Ölblumen nachgewiesen wurden.

Typ A	(3*R*)-3-Acyloxyfettsäuren
Typ A_1	(3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren mit gerader C-Anzahl (*Angelonia pubescens*, Scrophulariaceae)
Typ A_2	(3*R*)-3-Acyloxyfettsäuren mit gerader C-Anzahl, 3-Acetoxy- oder 3-(3-Methylbutanoyl)oxygruppe (*Nierembergia scoparia*, Solanaceae)
Typ A_3	(3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren mit gerader und ungerader C-Anzahl (*Krameria lanceolata*, Krameriaceae)
Typ B	Acylglycerine mit (3*R*)-3-Acetoxyacylresten
Typ B_1	(3*R*)-3-Acetoxyacylrest an sekundärer Hydroxyfunktion des Glycerins (*Diascia barberae*, Scrophulariaceae)
Typ B_2	(3*R*)-3-Acetoxyacylrest an primärer Hydroxyfunktion des Glycerins (*Lysimachia ciliata*, Primulaceae)
Typ C	(3*R*)-3-Actoxyfettsäuren (Typ A_1) und Acylglycerine (Typ B_1) in ähnlichen Anteilen (*Trimezia martinicensis*, Iridaceae)
Typ D	Mono- oder Diacylglycerine mit einem (nicht weiter funktionalisiertem) lang- und einem kurzkettigen Acylrest (*Sisyrinchium micranthum*, Iridaceae)
Typ E	Acetylierte Mono- und Dihydroxyfettsäuren (*Malpighia coccigera*, Malpighiaceae)
Typ F	Acylglycerine mit acetylierten Dihydroxyacylresten (*Sigmatostalix huebneri*, Orchidaceae)

Tabelle 5-5: Verschiedene Typen von Blütenölen.

Ein Zusammenhang zwischen Pflanzenfamilie und Art des sekretierten Blütenöls besteht bei den untersuchten Proben nicht. So gehören die hier vorgestellten Blütenöle der beiden Iridaceen *Trimezia martinicensis* und *Sisyrinchium micranthum* den Typen C und D an, was die These von S. Vogel untermauert, dass sich auch innerhalb der Familie Iridaceae mehrfach Ölblumen ausgebildet haben [2]. Die Sekrete der beiden Scrophulariaceen *Angelonia pubescens* und *Diascia barberae* sind den Typen A und B zugehörig.

5.7.2 Neue Erkenntnisse zu Bestandteilen von Blütenölen

5.7.2.1 Typ A

3-Acetoxyfettsäuren wurden bereits in der Literatur als Inhaltsstoffe der Blütenöle von *Krameria* species (Krameriaceae) beschrieben [10]. Für die bislang nicht untersuchten Blütenöle von *Angelonia pubescens* (Scrophulariaceae), *Nierembergia scoparia* (Solanaceae) und *Krameria lanceolata* (Krameriaceae) konnte unter Verwendung neuer analytischer Methoden gezeigt werden, dass sie ebenfalls überwiegend aus 3-Acyl-oxyfettsäuren bestehen. Erstmalig wurden die absoluten Konfigurationen zu (3*R*) bestimmt. Bei *N. scoparia* wurde u.a. (3*R*)-3-Hydroxypalmitinsäure, acyliert mit 3-Methylbuttersäure anstelle der sonst üblichen Essigsäure nachgewiesen. Unbekannt war außerdem, dass unverzweigte (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren mit ungerader C-Anzahl in signifikanten Mengen in Blütenölen vorkommen können, wie für *K. lanceolata* gezeigt wurde. Zur massenspektrometrischen Untersuchung von 3-Hydroxyfettsäuren auf Methylverzweigungen wurden erstmalig ihre Pyrrolidide eingesetzt.

5.7.2.2 Typ B/C

Blütenöle, die überwiegend Diacylglycerine mit einem 3-Acetoxyacyl- und einem Acetylrest enthalten, waren bei *Calceolaria* species (Scrophulariaceae), sowie *Lysimachia vulgaris* und *Lysimachia punctata* (beide Primulaceae) bekannt [2,3].
In den bislang nicht näher untersuchten Sekreten von *Diascia barberae* (Scrophulariaceae), *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) und *Trimezia martinicensis* (Iridaceae) konnten von uns ebenfalls Acylglycerine mit jeweils einem 3-Acetoxyacylrest und bis zu zwei weiteren Acetylresten nachgewiesen werden. Erstmalig wurde hierzu ein analytisches Verfahren verwendet, welches auf einer Kombination von *FAME-Profiling*, GC/MS-Analytik der Sekretbestandteile nach Trimethylsilylierung und ESI-MS, sowie ESI-MS/MS-Untersuchungen der nichtderivatisierten Sekrete beruht. Diese Methode kommt ohne eine zeitaufwändige chromatografische *offline*-Trennung aus und ermöglichte entgegen der bisherigen Verfahren zum einen einen parallelen Nachweis von 3-Acyloxyfettsäuren neben deren Acylglycerinen und zum zweiten Aussagen darüber, ob die 3-Acetoxyacylfunktionen in den Acylglycerinen an eine primäre oder sekundäre Hydroxyfunktion des Glycerinrückrats gebunden sind. In der Literatur geäußerte Vermutungen, dass die Fettsäuren vermutlich willkürlich verteilt seien [2], konnten

widerlegt werden. Es handelt sich bei allen hier untersuchten Hauptbestandteilen um 1,2-Diacylglycerine. Bei denen aus den Sekreten von *D. barberae* und *T. martinicensis* sind die 3-Acetoxyacylreste nahezu ausschließlich an die 2-Position des Glycerinrückgrats, bei *L. ciliata* an die 1-Position gebunden.
Erstmalig wurden die absolute Konfiguration in den 3-Acetoxyacylgruppen zu (3*R*) bestimmt.

5.7.2.3 Typ D

Das Sekret von *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) ist das erste, für das eine Zusammensetzung aus überwiegend Diacylglyerinen mit nicht funktionalisierten Acylresten nachgewiesen wurde. Auch hier sind bei den Hauptkomponenten ein langkettiger (Palmitoyl-) und eine kurzkettiger Acylrest (überwiegend Acetyl- oder Butanoylrest) gebunden.

5.7.2.4 Typ E

In dem Blütenöl von *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae) wurden als Hauptbestandteile in der Kette funktionalisierte Acetoxyfettsäuren und monoacetylierte Dihydroxyfettsäuren der Kettenlängen C_{20}-C_{24} gefunden. Die Substituenten befinden sich ausschließlich an ungeradzahlig zu nummerierenden C-Atomen. Die sehr langkettigen, bisfunktionalisierten Fettsäuren (> C_{18}) waren bisher nicht als Naturstoffe bekannt, die in der Kette hydroxylierten (und acetylierten) Fettsäuren wurden erstmalig als Bestandteile von Blütenölen nachgewiesen.

5.7.2.5 Typ F

In dem Blütenöl von *Sigmatostalix huebneri* (Orchidaceae) wurden erstmalig Acylglycerine mit acetylierten, sehr langkettigen Dihydroxyacylresten, welche ein Substitutionsmuster, vergleichbar mit den Fettsäuren aus Typ E besitzen, nachgewiesen. Die massenspektrometrischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich auch hier bei den Hauptkomponenten um Diacylglycerine mit je einem (sehr) langkettigen und einem kurzkettigen Acylrest handelt.

5.7.3 Vergleich der Blütenölzusammensetzungen, Betrachtungen zur Biosynthese von Blütenölen und zur Entstehung der Ölblumen

Die Analysen der Blütenöle haben ergeben, dass die Zusammensetzungen unterschiedlicher sind, als bisher angenommen. Dennoch gibt es Ähnlichkeiten in den chemischen Strukturen der Sekretbestandteile, die auf Parallelen in den Biosynthesen hinweisen.

Wie im Folgenden dargelegt wird, läßt sich die Bildung der Bestandteile aus Blütenölen durch leichte Modifikationen in den Biosyntheseapparaten für Fette und Wachse, bzw. deren Adaption erklären. Unter Berücksichtigung, dass jede höhere Pflanze einen Transportmechanismus für den Export lipophiler (Wachs-)Bestandteile aus der Zelle zur Kutikula besitzt, läßt sich hieraus vom metabolischen Standpunkt eine Theorie entwickeln, wie eine mehrfache, parallele Entstehung von Blütenölen, bzw. Ölblumen in phylogenetisch nicht miteinander verwandten Pflanzenfamilien möglich war.

5.7.3.1 Typ A

Eine Akkumulation von acylierten 3-Hydroxyfettsäuren wird im Pflanzenreich ausschließlich in Blütenölen gefunden. Da sich die Hydroxyfunktionen ohne Ausnahme an Position C-3 befinden, kann begründet angenommen werden, dass sie analog zur plastidischen *de novo* Fettsäurebiosynthese oder zur peroxisomalen β-Oxidation eingeführt werden. Im ersten Fall wäre ein (3*R*)-3-Hydroxyacyl-ACP-, im zweiten Fall ein (3*S*)-3-Hydroxyacyl-CoA-Intermediat zu erwarten (s. **Abschnitt 2.1**). Die von uns ermittelten (3*R*)-Konfigurationen der Säuren stützen die erste Annahme. In Einklang mit einer plastidischen Biosynthese ist auch die von S. Vogel geschilderte Beobachtung, dass die entsprechenden Organellen in ölsekretierenden Zellen gehäuft auftreten [2]. Ein weiterer Hinweis auf einen engen Zusammenhang zwischen Fettsäurebiosynthese und der Biosynthese der (acylierten) 3-Hydroxyfettsäuren aus Blütenölen ist, dass bei den hier vorgestellten Analysen der Sekrete von *Angelonia pubescens* (Scrophulariaceae), *Nierembergia scoparia* (Solanaceae) und *Krameria lanceolata* (Krameriaceae) hauptsächlich acylierte (3*R*)-3-Hydroxyfettsäuren mit Kettenlängen von C_{16} und C_{18} gefunden wurden. Es handelt sich hierbei um Kettenlängen, die gewöhnlich durch eine plastidische FAS erzeugt werden.

Die acylierten (3*R*)-3-Hydroxyfettsäuren wurden in den Sekreten phylogenetisch nicht verwandter Pflanzenfamilien nachgewiesen, d.h. die akkumulative Biosynthese dieser Verbindungen ist wahrscheinlich mehrfach unabhängig voneinander aufgetreten. Wenn dies so ist, sollte es einen einfachen Auslöser gegeben haben, der sich mehrfach ereignet haben kann. Betrachtet man in diesem Zusammenhang das in **Abschnitt 2.1.4** erläuterte Experiment von R.D. Simoni *et al*., die gezeigt haben, dass eine FAS mit einem artfremden ACP anteilig 3-Hydroxyfettsäuren erzeugen kann [42], wäre ein solcher möglicher Auslöser eine Mutation in der Sequenz des ACP. Eine solche Mutation müßte die übrige Fettsäurebiosynthese der Pflanze nicht beeinflussen, da verschiedene Isoformen des ACP gewebespezifisch exprimiert werden [23]. Weitere mögliche Auslöser für die Produktion von 3-Hydroxyfettsäuren könnten Mutationen der β-Hydroxyacyl-ACP-Reduktase oder einer Acyl-ACP-Thioesterase sein.

Die hier postulierte Umwandlung größerer Mengen von Intermediaten der Fettsäurebiosynthese in pflanzliche Sekundärmetabolite ist in der Natur nicht ohne Beispiel. Speziell besteht eine ausgeprägte Ähnlichkeit zwischen der Biosynthese von Alkan-2-olen aus epikutikularen Wachsen und der postulierten Biosynthese der acylierten (3*R*)-3-Hydroxyfettsäuren aus Blütenölen. Wie in **Kapitel 2.2** näher erläutert, wurden 3-Ketoacyl-ACP-Derivate als Zwischenstufen der Biosynthese von Alkan-2-olen nachgewiesen. Eine Reduktion der 3-Ketoacyl-ACP-Derivate, wie sie z.B. durch die lösliche β-Ketoacyl-ACP-Reduktase der pflanzlichen *de novo* Fettsäurebiosynthese katalysiert wird, und anschließende Acetylierung würde zu den Bestandteilen der Blütenöle führen. Genau wie die 3-Acetoxyfettsäuren aus Blütenölen kommen auch Alkan-2-ole in Pflanzen nicht verwandter Familien vor. Die Biosynthese beider pflanzlicher Lipidklassen erfolgt in epidermalen Zellen.

Analog zu den Wachsbestandteilen müssen auch Blütenöle durch die Zellmembran und die Zellwand der Pflanze transportiert werden, bevor sie unter der Kutikula zur Darbietung an die Bestäuber eingelagert werden können. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der chemischen Verbindungen und der geringen Spezifität der nsLTPs, für die eine Beteiligung am Export epikutikularer Wachsbestandteile diskutiert wird (s. **Abschnitt 2.2**), scheint es möglich, dass die Blütenöle über den gleichen oder einen analogen Weg aus der Zelle herausgeschleust werden können. Die Möglichkeit zur Adaption bereits vorhandener Transportmechanismen dürfte die Parallelentwicklung von Ölblumen begünstigt haben.

Bislang nicht diskutiert wurde die Acylierung der (3*R*)-3-Hydroxyfettsäuren durch kurzkettige Carbonsäuren. Bei *A. pubescens* und *K. lanceolata* wird eine Acylierung ausschließlich durch Essigsäure beobachtet, bei *N. scoparia* auch durch 3-Methylbuttersäure. Vom biosynthetischen Blickwinkel betrachtet, weist der 3-Methylbuttersäurerest auf eine Verknüpfung der Biosynthese von Blütenölen mit dem Aminosäuremetabolismus oder der Mevalonsäurebiosynthese hin. So ist seit langem bekannt, dass Leucin durch Transaminierung und oxidative Decarboxylierung in 3-Methylbuttersäure überführt werden kann [147]. Kürzlich wurde bei Myxobakterien ein weiterer Biosyntheseweg für 3-Methylbuttersäure nachgewiesen. Sie kann hier in Form ihres CoA-Esters aus Hydroxymethylglutaryl-CoA, einem Zwischenprodukt der Mevalonsäurebiosynthese, durch Decarboxylierung, Dehydratisierung und Hydrierung erhalten werden [168,169]. Mevalonsäure besitzt u.a. bei der Synthese von vielen Blütenduftstoffen eine wichtige Bedeutung, die wie Blütenöle als Lockstoffe für Bestäuber dienen können.
Welche biologische Bedeutung die Acylierung der (3*R*)-3-Hydroxyfettsäuren durch kurzkettige Fettsäuren hat, kann an dieser Stelle nur spekulativ erörtert werden. Möglich ist, dass die Acylierung den Export aus der Zelle begünstigt. A. Zachowski *et al.* haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die Affinität von nsLTPs durch die Einführung

einer Hydroxyfunktion gegenüber der nicht funktionalisierten Fettsäure gemindert wird [77]. Alternativ ist auch denkbar, das die Acylierung wichtig für eine Verminderung der Kristallisationsfähigkeit der sekretierten Säuren ist. 3-Hydroxyfettsäuren sind im Gegensatz zu ihren acetylierten Derivaten bei Raumtemperatur leicht kristallisierende Verbindungen.

Abschließend zur Diskussion von Typ A Blütenölen sind die nicht-verzweigten, acetylierten 3-Hydroxyfettsäuren mit ungerader C-Anzahl aus dem Blütenöl von *K. lanceolata* zu erwähnen. Wie schon in **Abschnitt 5.1.3** erläutert, kann ihre Bildung unter Verwendung von Propionyl-CoA als Starter-Molekül in einer zur *de novo* Fettsäurebiosynthese analogen Reaktionsfolge erklärt werden. Untersuchungen von R. J. Heath haben gezeigt, dass die β-Ketoacyl-Synthase III von *E. coli* Propionyl-CoA mit der gleichen Aktivität wie Acetyl-CoA mit Malonyl-ACP kondensieren kann [170]. D.h. der Biosyntheseapparat für Blütenöle von *K. lanceolata* muß sich von denen von *A. pubescens* und *N. scoparia* nicht unterscheiden; es muß lediglich Propionyl-CoA als Starter-Molekül zur Verfügung stehen.

Im Rahmen einer eher Metabolismus-orientierten Arbeit sei an dieser Stelle angemerkt, dass es zu den Elaiophoren oftmals anatomisch sehr ähnlich gebaute Nektarien gibt. Dies ist z.B. für die Nektar-produzierende Spezies *Lysimachia ephemerum* und die Ölblume *Lysimachia vulgaris* (beide Primulaceae) der Fall, wie detailliert von S. Vogel beschrieben wird [3]. D.h. prinzipiell wäre ein Übergang von Nektarblumen zu Ölblumen alleine durch eben diskutierte leichte Veränderung im Fett-/Wachsmetabolismus möglich, wenn zur Sekretion des Blütenöls die ursprünglichen Nektarien Verwendung finden.

5.7.3.2 Typ B/C

Die in Acylglycerinen gebundenen (3*R*)-3-Acetoxyacylreste aus den Blütenölen von *Diascia barberae* (Scrophulariaceae), *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) und *Trimezia martinicensis* (Iridaceae) entsprechen den Fettsäuren aus Typ A Blütenölen. Es kann somit eine analoge Herkunft angenommen werden. Demgemäß würden bei diesen Blütenölen aktivierte Derivate von (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren vor ihrer Sekretion an ein Glycerinrückgrat geknüpft. Eine Modifikation eines bereits in einem Glycerolipid gebundenen Acylrests, analog zur Rizinolsäurebiosynthese (s. **Abschnitt 2.4**), erscheint eher unwahrscheinlich.
Gewöhnlich erfolgt die Biosynthese von Acylglycerinen durch sukzessive Wirkung zweier Acyltransferasen GPAT und LPAAT (s. **Abschnitt 3**). Wenn dies auch bei hier diskutierten Bestandteilen aus Blütenölen der Fall ist, würde die (3*R*)-3-Acetoxyfettsäure bei *D. barberae* und *T. martinicensis* durch eine LPAAT und bei *Lysimachia ciliata* durch eine GPAT übertragen.

Die unterschiedlichen Substitutionsmuster sind in Übereinstimmung mit der Annahme einer in beiden Pflanzenfamilien voneinander unabhängig erworbenen Fähigkeit, diesen Verbindungstyp darstellen zu können.
Das Blütenöl von *T. martinicensis* wurde einem eigenen Typ C zugeordnet, da es sich anteilig aus Typ A_1 und Typ B_1 Blütenölen zusammensetzt. Dies deutet darauf hin, dass der Export der 3-Acetoxyfettsäuren und eine vorherige Veresterung, vermutlich mit Glycerin-3-phosphat, in Konkurrenz miteinander stehen.

5.7.3.3 Typ D

Wie bei Typ B und C sind auch im Blütenöl von Typ D Diacylglycerine die Hauptkomponenten. Wiederum sind ein langkettiger, aber hier nicht funktionalisierter, und ein kurzkettiger Acylrest gebunden. Da sich dieses ungewöhnliche Substitutionsmuster unabhängig von der Art der gebundenen Acylreste (nicht-funktionalisiert, mit 3-Acetoxyfunktion, dihydroxyliert und acetyliert) mehrfach herausgebildet hat, ist anzunehmen, dass es eine essentielle biologische Bedeutung hat. Zum einen könnte die Struktur wichtig für die Erkennung der Glycerolipide sein, die aus der Zelle heraus transportiert und nicht z.B. zu Triacylglycerinen, Glycodiacylglycerinen oder Phospholipiden weiterverarbeitet werden. Zum zweiten muß die Struktur kompatibel mit dem Mechanismus für den Export aus der Zelle sein.

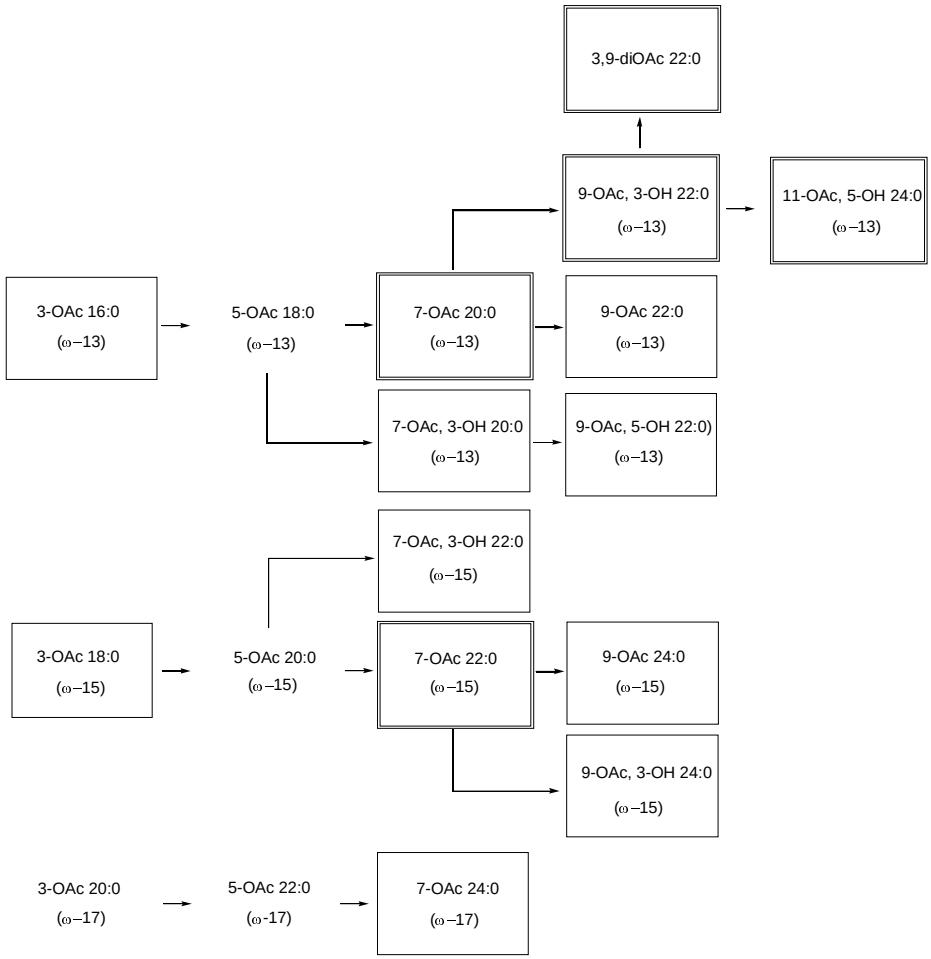
5.7.3.4 Typ E

Die (acetylierten) Mono- und Dihydroxyfettsäuren aus dem Blütenöl von *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae) besitzen Substituenten ausschließlich an Positionen, die mit einer polyketidanalogen Biosynthese im Einklang stehen. Dargestellt ist dies in **Schema 5-10**, welches die wichtigsten Sekretbestandteile, geordnet hinsichtlich ihrer angenommenen Biosynthese, zusammenfaßt. Zusätzlich sind drei postulierte, aber nicht detektierte Intermediate aufgenommen.

Da sich die Acetoxyfunktionen der mit als Hauptkomponenten gefundenen, acetylierten und sehr langkettigen Monohydroxyfettsäuren (VLCHFA, *very long chain hydroxy fatty acid*) an den Positionen (ω-13), (ω-15) und (ω-17) befinden, kann unter Berücksichtigung der bisherigen Analyseergebnisse angenommen werden, dass 3-Acetoxyfettsäuren der Kettenlängen C_{16}, C_{18} und C_{20} als Intermediate ihrer Biosynthese auftreten. Dies wird dadurch untermauert, dass **3-OAc 16:0** und **3-OAc 18:0** als Bestandteile des Sekrets gefunden werden. Die acetylierten VLCHFAs würden dann durch Kettenverlängerung der 3-Acetoxyfettsäuren entstehen.

Wie schon bei den (3*R*)-3-Acetoxyfettsäuren gibt es auch hier Parallelen zur Wachsbestandteilen; die Kettenverlängerungen der 3-Acetoxyfettsäuren könnten durch

nicht-plastidische Elongasen der Wachsbiosynthese katalysiert werden. So umfaßt die Bildung von sehr langkettigen β-Ketoacylderivaten aus epikutikularen Wachsen C_2-Kettenverlängerungen von Ketoacylderivaten, die Hydroxyacylderivaten nicht unähnlich sind. Wie ebenfalls in **Abschnitt 2.2** beschrieben, kann anhand der Substitutionsmuster zahlreicher anderer Wachsbestandteile vermutet werden, dass auch hier Kettenverlängerungen von Hydroxy- oder Ketoacylderivaten um C_2-Einheiten an der Biosynthese beteiligt sind.



Schema 5-10: Polyketidartige Substitutionsmuster der partiell acetylierten Hydroxyfettsäuren aus dem Blütenöl von *M. coccigera*. Doppelt gerahmt sind die Hauptkomponenten (nach GC/MS), einfach gerahmt Nebenkomponenten, ohne Rahmen sind postulierte, aber nicht detektierte Intermediate der Biosynthese.

Auch die näher am Carboxylkohlenstoffatom gelegenen, zumeist nicht acetylierten Hydroxyfunktionen bei den Dihydroxyfettsäuren aus dem Blütenöl von *M. coccigera* befinden sich ausschließlich an ungeradzahlig zu nummerierenden C-Atomen, namentlich

an C-3 und C-5. D.h. auch sie könnten durch Kondensation eines Acyl-CoA(ACP)-Derivates mit Malonyl-CoA(ACP), hier allerdings katalysiert durch eine Elongase oder Polyketidsynthase und anschließende Reduktion eingeführt werden. Bei den an C-5 hydroxylierten Verbindungen wäre anschließend noch ein vollständiger C_2-Elongationscyclus zu ihrer Biosynthese erforderlich.

Wiederum gibt es bei Wachsbestandteilen Verbindungen oder Verbindungsreihen, die auf eine ähnliche Genese einer Hydroxy- oder Ketofunktion hinweisen. Zu nennen sind aus **Tabelle 2-1** in **Abschnitt 2.2** die Alkan-2-ole aus *Juniperus scopulorum*, die sekundären Alkohole aus *Papaver* species, die Alkan-1,3-diole aus *Ricinus communis* L. und *Cucumis sativus* L., die 3-Hydroxyaldehyde aus *Ricinus communis* L., β-Diketone, β-Alkandiole und β-Ketoalkohole aus zahlreichen in **Tabelle 2-1** aufgelisteten Spezies, Alkandiole aus *Papaver* Spezies, *Myricaria germanica* und *Osmunda regalis*, Ketoalkohole und Ketoaldehyde aus *Osmunda regalis*, δ-Lactone aus *Cerinte minor* und Hydroxyfettsäuren aus *Juniperus scopulorum*.

Die hier beschriebenen Ähnlichkeiten von Bestandteilen aus epikutikularen Wachsen und Blütenölen lassen vermuten, dass auch bei *M. coccigera* die akkumulative Biosynthese von 3-Hydroxyfettsäuren letztendlich der Auslöser für die Bildung von sekretionsfähigen Ölen war. Nach der Acetylierung könnten die Verbindungen von Enzymsystemen, deren ursprüngliche Bedeutung in der Wachsbiosynthese lag und vielleicht noch liegt, als Substrate erkannt und vor der Sekretion weiter prozessiert worden sein.

5.7.3.5 Typ F

Die in Typ F gefundenen, mit Glycerin veresterten und partiell acetylierten Dihydroxyfettsäuren **3,7-diOH 20:0** und **3,7-diOH 22:0**, besitzen Substitutionsmuster, die im Einklang mit der bei *M. coccigera* diskutierten Biosynthese stehen. Wie bei Typ B und D werden die dihydroxylierten Fettsäuren vor der Sekretion an Glycerin gebunden.

5.8 Quintessenz

Blütenöle und Ölblumen konnten sich in phylogenetisch nicht verwandten Pflanzenfamilien unabhängig voneinander entwickeln, da die Biosynthese nur leichter Veränderungen im Fett-/Wachsmetabolismus bedurfte und Transportmechanismen für den Export lipohiler Substanzen aus epidermalen Zellen höherer Pflanzen *per se* vorhanden sind. Die Produktion von Wachsen, welche ursprünglich dem Schutz der Pflanze dienen, erlangte hiermit neue Bedeutung. Durch die Synthese wachsähnlicher, durch Bestäuber ausbeutbare Substanzen konnte ein Reproduktionsvorteil erlangt werden.

6 Experimentalteil

6.1 Verwendete Geräte und experimentelle Bedingungen

6.1.1 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

MD 800

Massenspektrometer: Fisons Instruments, Manchester, U.K.
Single-Quadrupole-Analysator
Gaschromatograph: GC 8000 Series (Fisons Instruments)

Allgemeine Bedingungen:

Ionisation:	Elektronenstoß-Ionisation
EI-Voltage:	70 eV
Quellen-Temperatur:	200 °C
m/z-Bereich:	40-800
Injektions-Modus:	splitlos

Experimentelle Bedingungen **MD 1**:

Injektor-Temperatur:	300 °C
Kapillarsäule:	DB-5 MS (J & W Scientific, Folsom, U.S.A) 5%-Diphenyl-95%-dimethylpolysiloxan 20 m × 0.18 mm I.D. × 0.18 μm Filmdicke
Trägergas:	Helium bei konstantem Druck von 100 kPa (Fluß: 1 mL/min bei 60 °C, Septum-Spülung: 3 mL/min)
Temperaturprogramm:	60 °C—(1 min)→ 60 °C —(15 °C/min)→ 200 °C —(5 °C/min)→ 300 °C —(20 min)→ 300 °C

Experimentelle Bedingungen **MD 2**:

Injektor-Temperatur:	300 °C
Kapillarsäule:	SP-2560 (Supelco, Belafonte, U.S.A.) Biscyanopropylpolysiloxan 100 m × 0.25 mm I.D. × 0.2 μm Filmdicke
Trägergas:	Helium bei konstantem Druck von 200 kPa (Fluß: 1 mL/min bei 45 °C, Septum-Spülung: 3 mL/min)
Temperaturprogramm:	45 °C—(5 °C/min)→ 225 °C —(40 min)→ 225 °C

Experimentelle Bedingungen **MD 3**:

Temperaturprogramm:	60 °C—(1 min) → 60 °C —(25 °C/min)→ 110 °C —(10 °C/min)→ 290 °C —(20 min)→ 300 °C

(übrige Bedingungen analog **MD 1**)

Experimentelle Bedingungen **MD 4**:

Temperaturprogramm:	60 °C—(1 min)→ 60 °C —(15 °C/min)→ 200 °C —(5 °C/min)→ 300 °C—(20 min)→ 300 °C

(übrige Bedingungen analog **MD 1**)

Experimentelle Bedingungen **MD 5**:

Injektor-Temperatur:	250 °C

(übrige Bedingungen analog **MD 2**)

Experimentelle Bedingungen **MD 6**

Injektor-Temperatur:	250 °C
Kapillarsäule:	HT-5 (SGE, Melbourne, Australien) 5 %-Polycarboran-95%-dimethylpolysiloxan 30 m × 0.32 mm I.D. × 0.5 μm Filmdicke nicht belegte Vorsäule: 5 m
Trägergas:	Helium bei konstantem Druck von 28 kPa (4 psi) (Fluß: 1 mL/min bei 60 °C, Septum-Spülung: 3 mL/min)
Temperaturprogramm:	60 °C—(1 min)→ 60 °C —(15 °C/min)→ 200 °C —(5 °C/min)→ 300 °C—(20 min)→ 300 °C

GCT

Massenspektrometer: Micromass, Manchester, U.K.
Reflectron Time-of-Flight-Analysator mit 4 GHz *Time-Digital* Converter
Gaschromatograph: Agilent 6890, Wilmington, U.S.A.

Allgemeine Bedingungen:

Ionisation:	Elektronenstoß-Ionisation
EI-Voltage:	70 eV
Quellen-Temperatur:	180 °C
m/z-Bereich:	40-800
Injektor-Temperatur:	300 °C
Injektions-Modus:	splitlos

Experimentelle Bedingungen **GCT 1**:

Kapillarsäule:	DB-5 MS (J & W Scientific, Folsom, U.S.A) 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm Filmdicke
Trägergas:	Helium bei konstantem Fluß von 1 mL/min
Temperaturprogramm:	60 °C—(1 min)→ 60 °C —(15 °C/min)→ 200 °C —(5 °C/min)→ 300 °C—(20 min) → 300 °C

Experimentelle Bedingungen **GCT 2**:

Temperaturprogramm:	60 °C—(1 min)→ 60 °C —(15 °C/min)→ 150 °C —(2 °C/min)→ 300 °C—(10 min)→ 300 °C

(übrige Bedingungen analog **GCT 1**)

Experimentelle Bedingungen **GCT 3**

Kapillarsäule:	DB-5 MS (J & W Scientific, Folsom, U.S.A) 20 m × 0.18 mm I.D. × 0.18 μm Filmdicke
Trägergas:	Helium bei konstantem Fluß von 1 mL/min
Temperaturprogramm:	60 °C—(1 min)→ 60 °C —(15 °C/min)→ 150 °C —(2 °C/min)→ 300 °C—(10 min)→ 300 °C

Experimentelle Bedingungen **GCT 4**:

Temperaturprogramm: 60 °C—(1 min)→ 60 °C —(15 °C/min)→ 200 °C
—(5 °C/min)→ 300 °C—(20 min)→ 300 °C

(übrige Bedingungen analog **GCT 3**)

6.1.2 ESI-Massenspektrometrie

Massenspektrometer:	Finnigan TSQ 7000, San Jose, USA
	Triple-Quadrupole-Analysator
Einlaß:	Spritzenpumpe, 5 µL/min Flußrate
sheath gas:	N_2
Elektrospray-Spannung:	4,5 kV
Kapillaren-Temperatur:	200 °C
Stoßgas:	He

6.1.3 Andere Geräte

NMR

Varian, Palo Alto, U.S.A.
Modell Mercury VX 300 (300 MHz)

Polarimeter

JASCO Cooperation, Tokyo, JAPAN
Modell DIP-1000

6.2 Probennahme und Pflanzenmaterial

Die Probennahme erfolgte in Abhängigkeit vom Elaiophortyp. Bei Epithel-Elaiophoren erwies sich die Verwendung von Glaskapillaren (6,66 µL, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) als zweckmäßig. Sofern intakt vorhanden wurde die Kutikula durch leichten Druck zum Platzen gebracht und das austretende Öl mit einer Kapillare aufgenommen. Bei den Trichom-Elaiophoren befand sich das Öl in kleinen Tröpfchen auf den Trichomspitzen bzw. als dünner Ölfilm dazwischen. Hier erwies sich eine Aufnahme mit Zellulosefasern als geeignet. Das Öl wurde direkt nach der Besammlung in 67 Vol% *tert*.-Butylmethylether und 33 Vol% MeOH gelöst, bzw. damit aus den Zellulosephasern extrahiert. Die Lagerung erfolgte unter Inertgas bei -18 °C.

Mit Ausnahme des Sekrets von *Krameria lanceolata* (Krameriaceae, Herkunft: USA, Dr. B. B. Simpson, University of Texas at Austin) wurden alle in dieser Arbeit analysierten Blütenöle von in Deutschen Botanischen Gärten im Freiland oder in Gewächshäusern kultivierten Pflanzen erhalten.

Von *Nierembergia scoparia* (Solanaceae), *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) und *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) wurden Herbarbelege angefertigt und beim Konservator des Botanischen Gartens München Nymphenburg (Dr. Gerlach, Menzinger Str. 65, 80638 München) hinterlegt. *N. scoparia* und *S. micranthum* sind dem neotropischen Florenreich, *L. ciliata* dem holarktischen zuzuordnen; die genaue Herkunft der Pflanzen war zum Zeitpunkt der Drucklegung nicht bekannt.

Weitere in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen wurden unter den folgenden Eingangsnummern im botanischen Garten München katalogisiert: *Angelonia pubescens* (Scrophulariaceae, Herkunft: Brasilien, Eingangsnummer: 01/2487), *Diascia barberae* (Scrophulariaceae, Herkunft: Südafrika, Eingangsnummer 01/446), *Trimezia martinicensis* (Iridaceae, Herkunft: Venezuela, Eingangsnummer: 97/2965), *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae, Herkunft: Jungferninseln, Eingangsnummer: 03/3693) und *Sigmatostalix huebneri*, (Orchidaceae, Herkunft: Venezuela, Eingangsnummer: 98/3519).

6.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) zur sauren Methanolyse

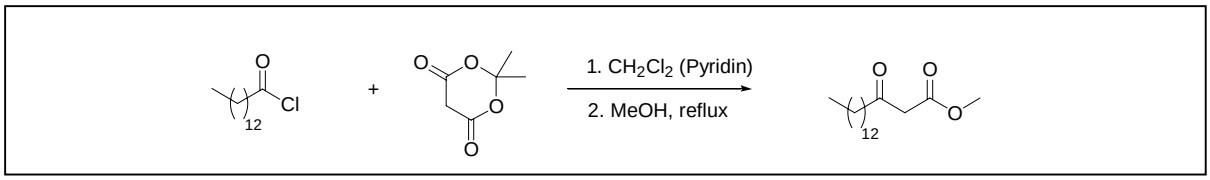
0,1-1,0 mg Blütenöl werden in einem Pyrex-Röhrchen in 700 µL *tert*.-Butylmethylether und 600 µL Methanol gelöst und 600 µL 20 %iges Bortrifluorid in Methanol (Merck, Darmstadt) zugegeben. Nach Überschichten mit Stickstoff wird das Röhrchen mit einem Deckel mit Teflonseptum verschlossen und im Wasserbad für 30 min bis 4 h auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 1,5 mL *i*-Octan und 1,5 mL entsalztes Wasser zugegeben und ausgeschüttelt. Die organische Phase wird zweimal mit Wasser gewaschen und über

Natriumsulfat getrocknet. Nach Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff wird der Rückstand in Dichlormethan zur Lagerung oder für die gaschromatographischen Untersuchungen aufgenommen.

6.4 AAV zur Trimethylsilylierung

0,1-1,0 mg einer zu trimethylsilylierenden Probe (Blütenöl, Hydroxyfettsäuremethylester oder Hydroxyfettsäurepyrrolidide) werden in 40 µL CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 10 µL *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid über 2 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Proben werden wie erhalten oder nach Verdünnung mit Dichlormethan für die GC/MS-Untersuchungen eingesetzt.

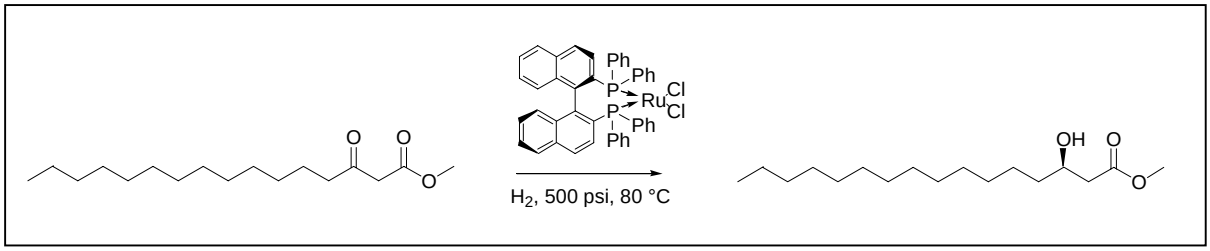
6.5 Darstellung von 3-Ketopalmitinsäuremethylester



Die Darstellung von 3-Ketopalmitinsäuremethylester erfolgte in Anlehnung an Vorschriften von U. Valcavi und Y. Oikawa [142,143]. In einem 50 mL Zweihalskolben, versehen mit Tropftrichter mit Druckausgleich und Rückflußkühler, sowie Trockenrohr mit Calciumchlorid werden 1,44 g (144,13 g/mol, 10 mmol) Meldrums Säure in 12 mL Dichlormethan und 1,4 mL Pyridin (0,983 g/mL, 79,10 g/mol, 17,4 mmol) gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Tropfenweise werden 2,9 mL Myristinsäurechlorid (246,82 g/mol, 0,91 g/mL, 10,7 mmol) bei dieser Temperatur zugegeben. Es wird 1 h bei 0 °C und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die orange Lösung wird zweimal mit 2 N Salzsäure, sowie einmal mit 5 %iger $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel abgedampft. Der verbliebene orange Feststoff wird in 25 mL Methanol aufgenommen und 3 h zum Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und das Produkt durch Chromatographie an Kieselgel (Hexan:Essigester, 6:1) gereinigt. Die Ausbeute betrug in einer typischen Reaktion 1,74 g (61 %).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ=0,88 (t, J=6,8, 3H); 1,23-1,30 (m, 22H); 1,61 (m, 2H); 2,53 (t, J=7,31, 2H); 3,45 (s, 2H); 3,74 (s, 3H).

6.6 Darstellung von (3*R*)-3-Hydroxypalmitinsäuremethylester



In einem Schlenkkolben werden 500 mg 3-Ketopalmitinsäuremethylester (284,44 g/mol, 1,76 mmol) in 15 mL eines Gemisches aus 96 Vol% Methanol und 4 Vol% Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen unter Vakuum entgast und unter Ausschluß von Luftsauerstoff zu 10 mg festem Dichloro[(*R*)-(+)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]ruthenium (II) ($[RuCl_2(C_{44}H_{32}P_2)]_x$, 794,67 g/mol, 0,013 mmol, Strem Chemicals, USA) gegeben. Die Reduktion erfolgt in einem Druckreaktor unter einer Wasserstoffatmosphäre von 500 psi (entsprechen 34,5 bar) über 24 Stunden bei 80 ºC [144]. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in einem Gemisch aus 20 Teilen Hexan und 5 Teilen Essigester aufgenommen und das Produkt mit dem gleichen Laufmittel unter Verwendung einer Kieselgelkartusche (2 g) vom Katalysator abgetrennt.
Die Ausbeute betrug 486 mg (97 %) in einer Reinheit > 99 % (GC). Als spezifischer Drehwert (24 °C) wurden -14.2° gemessen (Lit.: -14.3° [36]). Der Enantiomerenüberschuß wurde nach Überführung in die (3*R*)-[(2*S*)-Phenylpropanoyloxy]hexadecansäuremethylester mittels GC (Bedingungen: **MD 1**) zu 93 % bestimmt. Der Schmelzpunkt wurde bei 82 °C gemessen (Lit: 83-85 °C [142]).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ=0,88 (t, J=6,9, 3H); 1,23-1,30 (m, 22H); 1,44 (m, 2H), 2,41 (dd, J_1=16,5, J_2=8,8, 1H); 2.52 (dd, J_1=16,5, J_2=3,3, 1H); 3,71 (s, 3H), 4,0 (m, 1H).

6.7 AAV zur Racemisierung von 3-Hydroxyfettsäuren

0,1-1,0 mg eines Hydroxyfettsäuremethylestergemisches werden in 1 mL Dietylether gelöst und 100 µL einer Lösung aus 300 mg (293,8 g/mol, 1,0 mmol) Kaliumdichromat in 1 mL Wasser und 150 µL konzentrierter Schwefelsäure zugegeben. Bei Raumtemperatur werden 4 Stunden intensiv gerührt, die Etherphase zweimal mit wenig Wasser gewaschen und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen.
Der Rückstand wird in 1 mL Methanol gelöst, die Lösung auf 5 ºC abgekühlt und portionsweise 50 mg Natriumborhydrid (37,8 g/mol, 1,3 mmol) zugegeben. Nach 45 min bei 5 ºC wird ein Tropfen Schwefelsäure hinzugegeben und dreimal mit *i*-Octan ausgeschüttelt. Die *i*-Octan-Phase wird mit Wasser gewaschen, und über Natriumsulfat getrocknet.

6.8 Darstellung von racemischer 3-Hydroxypalmitinsäure

2,00 g 3-Ketopalmitinsäuremethylester (284,44 g/mol, 7,03 mmol) werden in 40 mL Methanol gelöst. Nach dem Abkühlen auf 5 °C werden in kleinen Portionen insgesamt 480 mg Natriumborhydrid (37,83 g/mol, 12,7 mmol) zugegeben. Es werden weitere 10 min gerührt und anschließend 1 mL Aceton zugetropft. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeengt, in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen und erneut zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird in wenig Methanol gelöst und 3,5 mL einer Lösung von 40 g Natriumhydroxid in 800 mL Methanol bei Raumtemperatur zugetropft. Nach 10 min wird der Niederschlag abfiltriert, die Lauge weiter eingeengt, und erneut filtriert. Der gesamte Rückstand wird in Wasser gelöst, mit 2 N Salzsäure auf pH 2 angesäuert und mit Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird aus heißem *i*-Octan umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 732 mg (36 %) in einer Reinheit > 99 % (GC/MS).

6.9 Darstellung von kurzkettigen Carbonsäurechloriden

Jeweils 100 µL 2-Methylbuttersäure (0,936 g/mL, 102,13 g/mol, 0,91 mmol), 3-Methylbuttersäure (0,937 g/mL, 0,91 mmol) oder Valeriansäure (0,939 g/mL, 0,91 mmol) werden bei 0 °C mit 200 µL Thionylchlorid (1,63 g/mL, 2,74 mmol) vermischt, auf Raumtemperatur auftauen und weitere 6 Stunden stehen gelassen. Die Gemische werden durch Überleiten von Stickstoff vorsichtig eingeengt und die Rückstande in jeweils 1,5 mL Benzol aufgenommen.

6.10 Acylierung der 3-Hydroxypalmitinsäure

Jeweils eine Spatelspitze 3-Hydroxypalmitinsäure werden mit 100 µL der Carbonsäurechloridlösungen (s.o.) und weiteren 100 µL Pyridin aufgenommen. Die Lösungen werden 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend Lösungsmittel und überschüssige Reagenzien im Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wird mit 500 µL 2N Salzsäure aufgenommen und mit Diethylether ausgeschüttelt. Die Diethyletherphase wird über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Eine Ausbeutebestimmung erfolgte nicht.

6.11 AAV zur Methylierung mit Diazomethan

Methylierungen mit Diazomethan werden im Aldrich MNNG Diazomethan Generator vorgenommen. 147 mg (147,09 g/mol, 1 mmol) 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (MNNG) werden mit 0,5 mL Wasser in das innere Rohr der Apparatur gegeben. Das Substrat wird gelöst in 3 mL Diethylether in das äußere Rohr gefüllt und die verschlossene Apparatur im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Tropfenweise werden 0,6 mL 5N Natriumhydroxidlösung zu der

MNNG Suspension getropft. Nach 1 h wird die Apparatur aus dem Kältebad genommen, weitere 12 h bei Raumtemperatur geschlossen gehalten und schließlich das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen.

6.12 AAV zur Darstellung von Fettsäurepyrrolididen

Die Darstellung der Fettsäurepyrrolidide erfolgt in Anlehnung an ein Verfahren von B.A. Andersson *et al.* [154]. Hierzu werden 0,1-1,0 mg Fettsäuremethylester in 1 mL frisch destilliertes Pyrrolidin und 100 µL Eisessig gegeben und eine Stunde lang auf 80 ºC erwärmt. Nach dem Abkühlen wird mit 2 mL *i*-Octan und 2 mL *tert*.-Butylmethylether ausgeschüttelt und die untere Phase verworfen. Anschließend wird einmal mit verdünnter Salzsäure und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet.

6.13 AAV zur Darstellung von Fettsäuremethylestern mit Trimethylsulfoniumhydroxid

0,1-1,0 mg des von anderen Lösungsmitteln befreiten Blütenöls werden in 100-1000 µL 1,1,2-Trichlor-1,2,2-trifluorethan (TCTFE) gelöst und mit 50 µL 0,25 N Trimethylsulfoniumhydroxid-(TMSH-) Lösung (Fluka, Buchs, Schweiz) versetzt. 1 µL der Lösung wird ohne weitere Aufarbeitung in den Injektor des Gaschromatographen eingebracht, wo bei 250 °C die Pyrolyse stattfindet.

6.14 AAV zur Darstellung von Dimethyldisulfidaddukten ungesättigter Fettsäuren

0,1-1,0 mg Fettsäuremethylestergemisch werden in 200 µL Dimethyldisulfid gelöst, 50 µL Iod in Diethylether (60 mg/mL) zugegeben und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 2 mL *i*-Octan wird mit verdünnter Natriumthiosulfatlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet [163].

7 Literaturverzeichnis

[1] S. Vogel: In *XI. Abstracts of the International Botanical Congress*; *Seattle*: 1969:229.

[2] S. Vogel: *Ölblumen und ölsammelnde Bienen* Stuttgart: Franz Steiner Verlag; 1974.

[3] S. Vogel: *Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Zweite Folge.* Stuttgart: Franz Steiner Verlag; 1986.

[4] S. Vogel: *Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Dritte Folge* Stuttgart: Franz Steiner Verlag; 1990.

[5] S. B. Vinson, H. J. Williams, G. W. Frankie, G. Shrum: **Floral Lipid Chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) and a Use of Floral Lipids by *Centris* Bees (Hymenoptera: Apidae)**. *Biotropica* 1997, **29**:76-83.

[6] M. G. Reis, A. D. de Faria, V. Bittrich, M. C. E. Amaral, A. J. Marsaioli: **The chemistry of Flower Rewards - *Oncidium* (Orchidaceae)**. *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, **11**:600-608.

[7] M. G. Reis, A. D. de Faria, M. C. E. Amaral, A. J. Marsaioli: **Oncidinol - a novel diacylglycerol from *Ornithophora radicans* Barb. Rodr. (Orchidaceae) floral oil**. *Tetrahedron Letters* 2003, **44**:8519-8523.

[8] B. B. Simpson, J. L. Neff, D. S. Seigler: ***Krameria,* free fatty acids and oil-collecting bees**. *Nature* 1977, **267**:150-151.

[9] D. Seigler, B. B. Simpson, C. Martin, J. L. Neff: **Free 3-acetoxy fatty acids in floral glands of *Krameria* species**. *Phytochemistry* 1978, **17**:995-996.

[10] B. B. Simpson, D. S. Seigler, J. L. Neff: **Lipids from the Floral Glands of *Krameria***. *Biochem. Sys. Ecol.* 1979, **7**:193-194.

[11] A. A. Cocucci: **Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae)**. *Pl. Syst. Evol.* 1991, **174**:17-35.

[12] S. L. Buchmann, M. D. Buchmann: **Anthecology of *Mouriri myrtilloides* (Melastomataceae: Memecyleae), an Oil Flower in Panama**. *Biotropica* 1981, **13**: 7-24.

[13] B. B. Simpson, J. L. Neff: **Floral rewards: alternatives to pollen and nectar**. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1981:301-322.

[14] K. E. Steiner, V. B. Whitehead: **The Association Between Oil-producing Flowers and Oil-collecting Bees in the Drakensberg of Southern Afrika**. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 1988, **25**:259-277.

[15] K. E. Steiner, V. B. Whitehead: **Pollinator Adaption to Oil-secreting Flowers - *Rediviva* and *Diascia***. *Evolution* 1990, **44**:1701-1707.

[16] K. E. Steiner: **The *Diascia* (Scrophulariaceae) window: an orientation cue for oil-collecting bees**. *Bot. J. Linnean Soc.* 1990, **102**:175-195.

[17] S. Vogel, A. Cocucci: **Pollination of *Basistemon* (Scrophulariaceae) by oil-collecting bees in Argentina**. *Flora* 1995, **190**:353-363.

[18] I. C. Machado, S. Vogel, A. V. Lopez: **Pollination of *Angelonia cornigera* Hook. (Scrophulariaceae) by Long-Legged, Oil-Collecting Bees in NE Brazil**. *Plant Biol.* 2002, **4**:352-359.

[19] J. H. Cane, G. C. Eickwort, F. R. Wesley, J. Spielholz: **Foraging, Grooming and Mate-seeking Bahaviors of *Macropis nuda* (*Hymenoptera,* Melittidae) and Use of *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) Oils in Larval Provisions and Cell Linings**. *Amer. Midl. Natur.* 1983, **110**:257-264.

[20] J. Ohlrogge, J. Browse: **Lipid Biosynthesis**. *Plant Cell* 1995, **7**:957-970.

[21] J. L. Harwood: **Fatty Acid Metabolism**. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1988, **39**:101-183.

[22] A. R. Slabas, T. Fawcett: **The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis**. *Plant Mol. Biol.* 1992, **19**:169-191.

[23] J. B. Ohlrogge, J. G. Joworski, D. Post-Beittenmiller: ***De Novo* Fatty Acid Biosynthesis**. In *Lipid Metabolism in Plants*. Edited by T. S. Moore: CRC Press; 1993:3-32.

[24] S. Rawsthorne: **Carbon flux and fatty acid synthesis in plants**. *Prog. Lipid Res.* 2002, **41**:182-196.

[25] C. Somerville, J. Browse, J. G. Jaworski, J. B. Ohlrogge: **Lipids**. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Edited by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones: American Society of Plant Physiologists; 2000:456-527.

[26] B. Gerhard: **Catabolism of Fatty Acids (α- and β-Oxidation)**. In *Lipid Metabolism in Plants*. Edited by T. S. Moore: CRC Press; 1993:527-565.

[27] K. Weil: **3-(*R*)-Hydroxyfettsäuren als Produkte selektiven Fettsäureabbaus**. Dissertation. Universität Würzburg: 2001.

[28] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt: *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2002.

[29] I. A. Graham, P. J. Eastmond: **Pathways of straight and branched fatty acid catabolism in higher plants**. *Prog. Lipid Res.* 2002, **41**:156-181.

[30] J. K. Reddy, G. P. Mannaerts: **Peroxisomal Lipid Metabolism**. *Ann. Rev. Nutr.* 1994, **14**:343-370.

[31] L. A. Staehelin, E. H. Newcomb: **Membrane Structure and Membranous Organelles**. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Edited by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones: American Society of Plant Physiologists; 2000:1-50.

[32] K. Weil, P. Gruber, F. Heckel, D. Harmsen, P. Schreier: **Selective (*R*)-3-hydroxylation of FA by *Stenotrophomonas maltophilia***. *Lipids* 2002, **37**:317-323.

[33] K. Weil, H.-U. Humpf, W. Schwab, P. Schreier: **Absolute Configuration of 3-Hydroxy Acids Formed by *Stenotrophomonas maltophilia*: Application of Multidimensional Gas Chromatography and Circular Dichroism Spectroscopy**. *Chirality* 2002, **14**:51-58.

[34] H.-W. Wollenweber, S. Schramek, H. Moll, E. T. Rietschel: **Nature and linkage type of fatty acids present in lipopolysaccharides of phase I and II *Coxiella burnetii***. *Arch. Microbiol.* 1985, **142**:6-11.

[35] E. T. Rietschel, H. Gottert, O. Lüderitz, O. Westphal: **Nature and Linkages of the Fatty Acids Present in the Lipid A Component of *Salmonella* Lipopolysaccharides**. *Eur. J. Biochem.* 1972, **28**:166-173.

[36] A. P. Tulloch, J. F. T. Spencer: **Extracellular Glycolipids of *Rhodotorula* species**. *Can. J. Chem.* 1964, **42**:166-173.

[37] M. Utaka, H. Watabu, H. Higashi, T. Sakai, S. Tsuboi, S. Torii: **Asymmetric Reduction of Aliphatic Short- to Long-Chain β-Keto Acids by Use of Fermenting Bakers' Yeast**. *J. Org. Chem.* 1990, **55**:3917-3921.

[38] H. Schildknecht, K. Koob: **Myrmicacin, das erste Insekten-Herbicid**. *Angew. Chem.* 1971, **110**:110; **Myrmicacin, the first insect herbicide**. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1971, **10**:124-125.

[39] J. Magnusson: **Antifungal activity of lactic acid bacteria**. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences in Uppsala: 2003.

[40] W. Herz, R. P. Sharma: **Sesquiterpene Lactones of *Eupatorium hyssopifolium*. A Germacranolide with an Unusual Lipid Ester Side Chain**. *J. Org. Chem.* 1976, **41**:1015-1020.

[41] M. G. de Carvalho, C. R. X. Velloso, R. Braz-Filho, W. F. da Costa: **Acyl-lupeol Esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae).** *J. Braz. Chem. Soc.* 2001, **12**:556-559.

[42] R. D. Simoni, R. S. Criddle, P. K. Stumpf: **Purification and Properties of Plant and Bacterial Acyl Carrier Proteins**. *J. Biol. Chem.* 1967, **242**:576-581.

[43] R. Jetter, S. Schäffer, M. Riederer: **Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L.** *Plant Cell Environ.* 2000, **23**:619-628.

[44] L. Kunst, A. L. Samuels: **Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax**. *Prog. Lipid Res.* 2003, **42**:51-80.

[45] R. Jetter, M. Riederer: **Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds**. *J. Chem. Ecol.* 2000, **26**:399-412.

[46] M. A. Jenks, R. J. Joly, P. J. Peters, P. J. Rich, J. D. Axtell, E. A. Ashworth: **Chemically Induced Cuticle Mutation Affecting Epidermal Conductance to Water Vapor and Disease Susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench**. *Plant Physiol.* 1994, **105**:1239-1245.

[47] C. Markstädter, W. Federle, R. Jetter, M. Riederer, B. Hölldobler: **Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants**. *Chemoecol.* 2000, **10**:33-40.

[48] T. J. Walton: **Waxes, Cutin and Suberin**. In *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 4. Lipids, Membranes and Aspects of Photobiology*. Edited by J. L. Harwood, J. R. Bowyer: Academic Press; 1990:105-158.

[49] J. P. Salaün, C. Helvig: **Cytochrome P450-dependent oxidation of fatty acids**. *Drug Metabol. Drug Interact.* 1995, **12**:261-283.

[50] K. Wellesen, F. Durst, F. Pinot, I. Benveniste, K. Nettesheim, E. Wisman, S. Steiner-Lange, H. Saedler, A. A. Yephremow: **Functional analysis of the LACERTA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid ω-hydroxylation in development**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, **98**:9694-9699.

[51] M. Newcomb, P. H. Toy: **Hypersensitive Radical Probes and the Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Hydroxylation Reactions**. *Acc. Chem. Res.* 2000, **33**:449-455.

[52] K. J. Evenson, D. Post-Beittenmiller: **Fatty Acid-Elongating Activity in Rapidly Expanding Leek Epidermis**. *Plant Physiol.* 1995, **109**:707-716.

[53] P. E. Kolattukudy, T.-Y. J. Liu: **Direct evidence for biosynthetic relationships among hydrocarbons, secondary alcohols, and ketones in *Brassica oleracea***. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970, **41**:1369-1374.

[54] P. E. Kolattukudy, J. S. Buckner, T.-Y. J. Liu: **Biosynthesis of Secondary Alcohols and Ketones from Alkanes**. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973, **156**:613-620.

[55] P. von Wettstein-Knowles: **Waxes, Cutin, and Suberin**. In *Lipid Metabolism in Plants*. Edited by T. S. Moore: CRC Press; 1993:127-166.

[56] R. Jetter, M. Riederer: **Cuticular waxes from the leaves and fruit capsules of eight Papaveraceae species**. *Can. J. Bot.* 1996, **74**:419-430.

[57] D. H. S. Horn, Z. H. Kranz, J. A. Lamberton: **The composition of *Eucalyptus* and some other leaf waxes**. *Aust. J. Chem.* 1964, **17**:464-476.

[58] P. von Wettstein-Knowles: **Biosynthetic Relationships between β-diketones and Esterified Alkan-2-ols Deduced from Epicuticular Wax of Barley Mutants**. *Mol. Gen. Genet.* 1976, **144**:43-48.

[59] A. P. Tulloch: **Epicuticular waxes from *Agropyron dasystachyum, Agropyron riparium* and *Agropyron elongatum***. *Phytochemistry* 1983, **22**:1605-1613.

[60] P. von Wettstein-Knowles, A. G. Netting: **Composition of epicuticular waxes on barley spikes**. *Carlsberg Res. Commun.* 1976, **41**:225-235.

[61] P. von Wettstein-Knowles, J. D. Mikkelsen, J. O. Madsen: **Nonan-2-ol esters in *Sorghum* leaf epicuticular wax and their collection by preparative gas chromatography**. *Carlsberg Res. Commun.* 1984, **49**:611-618.

[62] A. P. Tulloch, L. Bergter: **Epicuticular wax of *Juniperus scopulorum***. *Phytochemistry* 1981, **20**:2711-2716.

[63] A. P. Tulloch, L. L. Hoffman: **Leaf wax of *Triticum aestivum***. *Phytochemistry* 1973, **12**:2217-2223.

[64] C. P. Vermeer, P. Nastold, R. Jetter: **Homologous very-long-chain 1,3-alkanediols and 3-hydroxyaldehydes in leaf cuticular waxes of *Ricinus communis* L.** *Phytochemistry* 2003, **62**:433-438.

[65] M. Fauth, P. Schweizer, A. Buchala, C. Markstädter, M. Riederer, T. Kato, H. Kauss: **Cutin Monomers and Surface Wax Constituents Elicit H_2O_2 in Conditioned Cucumber Hypocotyl Segments and Enhance the Activity of Other H_2O_2 Elicitors**. *Plant Physiol.* 1998, **117**:1373-1380.

[66] R. Jetter: **Long-chain alkanediols from *Myricaria germanica* leaf cuticular waxes**. *Phytochemistry* 2000, **55**:169-176.

[67] S. Schulz, C. Arsene, M. Tauber, J. McNeil: **Composition of the lipids from sunflower pollen (*Helianthus annuus*)**. *Phytochemistry* 2000, **54**:325-336.

[68] R. Jetter, M. Riederer, A. Seyer, C. Mioskowski: **Homologous long-chain alkanediols from *Papaver* leaf cuticular waxes**. *Phytochemistry* 1996, **42**: 1617-1620.

[69] R. Jetter, M. Riederer: **Long-chain alkanediols, ketoaldehydes, ketoalcohols and ketoalkyl esters in the cuticular waxes of *Osmunda regalis* fronds**. *Phytochemistry* 1999, **52**:907-915.

[70] J. D. Mikkelsen: **Structure and biosynthesis of β-diketones in barley spike epicuticular wax**. *Carlsberg Res. Commun.* 1979, **44**:133-147.

[71] R. Jetter, M. Riederer: **Homologous long-chain δ-lactones in leaf cuticular waxes of *Cerinthe minor***. *Phytochemistry* 1999, **50**:1359-1364.

[72] U. Lundqvist, P. von Wettstein-Knowles: **Phenotypic diversity of barley spike waxes resulting from mutations at locus *cer*-n**. *Carlsberg Res. Commun.* 1983, **48**:321-344.

[73] P. von Wettstein-Knowles: **Effects of Inhibitors on Synthesis of Esterified Alkan-2-ols in barley spike epicuticular wax**. *Carlsberg Res. Commun.* 1985, **50**:239-262.

[74] J. D. Mikkelsen: **Biosynthesis of esterified alkan-2-ols and β-diketones in barley spike epicuticular wax: synthesis of radioactive intermediates**. *Carlsberg Res. Commun.* 1984, **49**:391-416.

[75] R. Jetter, S. Schäfer: **Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development**. *Plant Physiol.* 2001, **126**:1726-1737.

[76] G. W. Han, J. Y. Lee, H. K. Song, C. Chang, K. Min, J. Moon, D. H. Shin, M. L. Kopka, M. R. Sawaya, H. S. Yuan, et al.: **Structural Basis of Non-specific Lipid**

Binding in Maize Lipid-transfer Protein Complexes Revealed by High-resolution X-ray Crystallography. *J. Mol. Biol.* 2001, **308**:263-278.

[77] A. Zachowski, F. Guerbette, M. Grosbois, A. Jolliot-Croquin, J.-C. Kader: **Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein**. *Eur. J. Biochem.* 1998, **257**:443-448.

[78] M. A. Bernards: **Demystifying suberin**. *Can. J. Bot.* 2002, **80**:227-240.

[79] N. Weber, K. Vosmann, E. Fehling, K. D. Mukherjee, D. Bergenthal: **Analysis of Hydroxylated Fatty Acids from Plant Oils**. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1995, **72**: 361-368.

[80] M. Bafor, M. A. Smith, L. Jonsson, K. Stobart, S. Stymne: **Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-been (*Ricinus communis*) endosperm**. *Biochem. J.* 1991, **280**:507-514.

[81] F. J. van de Loo, P. Broun, S. Turner, C. Somerville: **An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog**. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1995, **92**:6743-6747.

[82] N. Engeseth, S. Stymne: **Desaturation of oxygenated fatty acids in *Lesquerella* and other oil seeds**. *Planta* 1996, **198**:238-245.

[83] C. R. Smith, T. L. Wilson, T. K. Miwa, H. Zobel, R. L. Lohmar, I. A. Wolff: **Lesquerolic Acid. A New Hydroxy Acid from *Lesquerella* Seed Oil**. *J. Org. Chem.* 1961, **26**:2903-2905.

[84] L. H. Princen: **Potential wealth in new crops: research and development**. In *Crop Resources*. Edited by D. S. Seigler: Academic Press; 1977:1-15.

[85] K. L. Mikolajczak, F. R. Earle, I. A. Wolff: **Search for New Industrial Oils. VI. Seed Oils of the Genus *Lesquerella***. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1962, **39**:78-80.

[86] K. L. Mikolajczak, C. R. Smith, I. A. Wolff: **Glyceride Structure of *Cardamine impatiens* L. Seed Oil**. *Lipids* 1968, **3**:215-220.

[87] M. Ono, F. Yamada, N. Noda, T. Kawasaki, K. Miyahara: **Determination by Mosher´s Method of the Absolute Configurations of Mono- and Dihydroxyfatty Acids Originated from Resin Glycosides.** *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1993, **41**:1023-1026.

[88] B. Hernández-Carlos, R. Bye, R. Pereda-Miranda: **Orizabins V-VIII, Tetrasaccharide Glycolipids from the Mexican Scammony Root (*Ipomoea orizabensis*)**. *J. Nat. Prod.* 1999, **62**:1096-1100.

[89] I. Kitagawa, N. I. Baek, K. Kawashima, Y. Yokokawa, M. Yoshikawa, K. Ohashi, H. Shibuya: **Chemical Structures of Five New Resin-Glycosides, Merremosides a,b,c,d, and e, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae)**. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1996, **44**:1693-1699.

[90] I. Kitagawa, N. I. Baek, Y. Yokokawa, M. Yoshikawa, K. Ohashi, H. Shibuya: **Chemical Structures of Four New Resin-Glycosides, Merremosides f, g, h1, and h2, from the Tuber of Merremia mammosa (Convolvulaceae)**. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1996, **44**:1693-1699.

[91] X.-M. Du, N.-Y. Sun, M. Nishi, T. Kawasaki, Y.-T. Guo, K. Miyahara: **Components of the Ether-Insoluble Resin Glycoside Fraction from the Seed of *Cuscuta australis***. *J. Nat. Prod.* 1999, **62**:722-725.

[92] N. Noda, N. Takahashi, K. Miyahara, C.-R. Yang: **Stoloniferins VIII-XII, resin glycosides, from *Ipomoea stolonifera***. *Phytochemistry* 1998, **48**:837-841.

[93] X.-M. Du, K. Kohinata, T. Kawasaki, Y.-T. Guo, K. Miyahara: **Components of the ether-insoluble resin glycoside-like fraction from *Cuscuta Chinensis***. *Phytochemistry* 1998, **48**:843-850.

[94] B. A. Vick: **Oxygenated Fatty Acids of the Lipoxygenase Pathway**. In *Lipid Metabolism in Plants*. Edited by T. S. Moore: CRC Press; 1993:167-191.

[95] M. Frentzen: **Acyltransferases and Triacylglycerols**. In *Lipid Metabolism in Plants*. Edited by T. S. Moore: CRC Press; 1993:3-32.

[96] K. Ichihara, T. Asahi, S. Fuji: **1-Acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase in maturing safflower seeds and its contribution to the non-random fatty acid distribution of triacylglycerol**. *Eur. J. Biochem.* 1987, **167**:339-347.

[97] M. Frentzen, M. Neuburger, J. Joyard, R. Douce: **Intraorganelle localization and substrate specificities of the mitochondrial acyl-CoA:*sn*-glycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase and acyl-CoA:1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase from potato tubers and pea leaves**. *Eur. J. Biochem.* 1990, **187**:395-402.

[98] J. Abian: **The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry**. *J. Mass Spectrom.* 1999, **34**:157-168.

[99] H. Budzikiewicz: *Massenspektrometrie*. Weinheim: VCH; 1992.

[100] **Micromass® GCT^{TM} Users Guide**.

[101] R. J. Cotter: **The New Time-of-flight Mass Spectrometry**. *Anal. Chem. News & Features* 1999:445-451.

[102] R. J. Cotter: **Time-of-flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules**. *Anal. Chem.* 1992, **64**:1027-1039.

[103] M. Guilhaus: **Principals and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry**. *J. Mass Spectrom.* 1995, **30**:1519-1532.

[104] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski: **Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry**. *Mass. Spectrom. Rev.* 1999, **19**:65-107.

[105] M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby: **Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry**. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, **11**:951-962.

[106] R. B. Cole: **Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry**. *J. Mass Spectrom.* 2000, **35**:763-772.

[107] S. J. Gaskell: **Electrospray: Principles and Practice**. 1997, **32**:677-688.

[108] J. F. d. l. Mora, G. J. V. Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J. B. Fenn: **Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry**. *J. Mass Spectrom.* 2000, **35**:939-952.

[109] J. Schiller, K. Arnold: **Mass Spectrometry in Structural Biology**. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Edited by R. A. Meyers: John Wiley & Sons Ltd.; 2000.

[110] T. Matsuo, Y. Seyama: **Introduction to Modern Biological Mass Spectrometry**. *J. Mass Spectrom.* 2000, **35**:114-130.

[111] E. de Hoffmann: **Tandem Mass Spectrometry: a Primer**. *J. Mass Spectrom.* 1996, **31**:129-137.

[112] R. G. Cooks: **Collision-induced Dissociation: Readings and Commentary**. *J. Mass Spectrom.* 1995, **30**:1215-1221.

[113] M. L. Gross: **Charge-remote fragmentations: method, mechanism and applications**. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1992, **118**:137-165.

[114] W. J. Griffiths, Y. Yabg, J. Sjövall, J. Å. Lindgren: **Electrospray/Collision-induced Dissociation Mass Spectrometry of Mono-, Di- and Tri-hydroxylated Lipoxygenase Products, Including Leukotrienes of the B-Series and Lipoxins**. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, **10**:183-196.

[115] C. Cheng, D. Giblin, M. L. Gross: **Structural Determination of Oxofatty Acids by Charge-Remote Fragmentations**. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, **9**:216-224.
[116] J. L. Kerwin, A. M. Wiens, L. H. Ericsson: **Identification of Fatty Acids by Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry**. *J. Mass Spectrom.* 1996, **31**:184-192.
[117] F. F. Hsu, J. Turk: **Distinction Among Isomeric Unsaturated Fatty Acids as Lithiated Adducts by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using Low Energy Collisionally Activated Dissociation on a Triple Stage Quadrupole Instrument**. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999, **10**:600-612.
[118] J. L. Kerwin, J. Torvik: **Identification of Monohydroxy Fatty Acids by Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry**. *Anal. Biochem.* 1996, **237**:56-64.
[119] W. D. Lehmann: *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1995.
[120] G. Gutnikov: **Fatty Acid profiles of lipid samples**. *J. Chrom. B* 1995, **671**:71-89.
[121] J. K. G. Kramer, V. Fellner, M. E. R. Dugan, F. D. Sauer, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz: **Evaluating Acid and Base Catalysts in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total *trans* Fatty Acids**. *Lipids* 1997, **32**:1219-1228.
[122] H. T. Badings, C. de Jong: **Glass capillary gas chromatography of fatty acid methyl esters. A study of conditions for the quantitative analysis of short- and long-chain fatty acids in lipids**. *J. Chrom.* 1983, **279**:493-506.
[123] K. Eder, A. M. Reichelmayr-Lais, M. Kirchgessner: **Studies on the methanolysis of small amounts of purified phospholipids for gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters**. *J. Chrom.* 1992, **607**:55-67.
[124] W. R. Morrison, L. M. Smith: **Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol**. *J. Lipid Res.* 1964, **5**:600-608.
[125] C. D. Bannon, J. D. Craske, N. T. Hai, N. L. Harper, K. L. O´Rourke: **Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride - methanol**. *J. Chrom.* 1982, **247**:63-69.
[126] C. D. Bannon, G. J. Breen, J. D. Craske, N. T. Hai, N. L. Harper, K. L. O´Rourke: **Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. Literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide-catalyzed methanolysis of fat and oils**. *J. Chrom.* 1982, **247**:71-89.
[127] E. Schulte, K. Weber: **Schnelle Herstellung der Fettsäuremethylester aus Fetten mit Trimethylsulfoniumhydroxid oder Natriummethylat**. *Fat. Sci. Technol.* 1989, **91**:181-183.
[128] K. Vosmann, E. Schulte, E. Klein, N. Weber: **Reactions of Lipids Containing Hydroxy Groups with Trimethylsulfonium Hydroxide: Formation of *O*-Methyl Derivatives**. *Lipids* 1996, **31**:349-352.
[129] K.-D. Müller, H. P. Nalik, E. N. Schmid, H. Husmann, G. Schomburg: **Fast Identification of Mycobacterium Species by GC Analysis with Trimethylsulfonium Hydroxide (TMSH) for Transesterification**. *J. High. Res. Chrom.* 1993, **16**:161-165.
[130] L. Matter, D. Schenker, H. Husmann, G. Schomburg: **Characterization of Animal Fats via the GC Pattern of Fame Mixtures Obtained by Transesterification of the Triglycerides**. *Chromatographia* 1989, **27**:31-36.

[131] K. Vosmann, E. Schulte, E. Klein, N. Weber: **Formation of *N*- and *O*-methyl derivatives of lipids containing amino, amide or hydroxy groups by the pyrolytic reaction with trimethylsulfonium hydroxide**. *Fett/Lipid* 1998, **100**:334-342.

[132] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larson: **Gas chromatography-mass spectrometry methods for analysis of 2- and 3-hydroxylated fatty acids: Application for endotoxin measurement**. *J. Microbiol. Methods* 1993, **17**:91-102.

[133] Z. Mielniczuk, S. Alugupalli, E. Mielniczuk, L. Larson: **Gas chromatography-mass spectrometry of lipopolysaccharide 3-hydroxy fatty acids: comparison of pentafluorobenzoyl and trimethylsilyl methyl ester derivatives**. *J. Chrom.* 1992, **623**:115-122.

[134] W. R. Mayberry: **Hydroxy Fatty Acids in *Bacterioides* Species: D-(-)-3-Hydroxy-15-Methylhexadecanoate and Its Homologs**. *J. Bacteriol.* 1980, **143**:582-587.

[135] H. W. Mueller: **Diazomethane as a highly selective fatty acid methylating reagent for use in gas chromatographic analysis**. *J. Chrom. B* 1996, **679**:208-209.

[136] P. C. Schmid, H. H. O. Schmid: **Reactions of Diazomethane with Glycerolipids in the Presence of Serum or Inorganic Salts**. *Lipids* 1994, **29**:883-887.

[137] D. P. Schwartz, R. S. Bright: **A Column Procedure for the Esterification of Organic Acids with Diazomethane at the Microgram Level**. *Anal. Biochem.* 1974, **61**:271-274.

[138] N. J. Cartwright: **The Structure of Serratamic Acid**. *Biochem. J.* 1957, **67**:663-669.

[139] Y. Nakagawa, K. Kishida, Y. Kodani, T. Matsuyama: **Optical Configuration Analysis of Hydroxy Fatty Acids in Bacterial Lipids by Chiral Column High-Performance Liquid Chromatography**. *Microbiol. Immunol.* 1997, **41**:27-32.

[140] W. Gradowska, L. Larsson: **Determination of absolute configurations of 2- and 3-hydroxy fatty acids in organic dust by gas-chromatography-mass spectrometry**. *J. Microbiol. Methods* 1994, **20**:55-67.

[141] S. Hammarström: **Microdetermination of Stereoisomers of 2-Hydroxy and 3-Hydroxy Fatty Acids**. *Methods Enzymol.* 1975, **35**:326-334.

[142] U. Valcavi, C. Albertoni, A. Brandt, G. B. Corsi, P. Farina, P. Foresta, G. Pascucci, M. T. Ramacci: **New Potential Immunoenhancing Compounds. Synthesis and pharmalogical evaluation of new long-chain 2-amido-2-deoxy-D-glucose derivatives**. *Arzneim.-Forsch. / Drug Res.* 1989, **39**:1190-1195.

[143] Y. Oikawa, K. Sugano, O. Yonemitsu: **Meldrum´s Acid in Organic Synthesis. 2. A General and Versatile Synthesis of β-Keto Esters**. *J. Org. Chem.* 1978, **43**:2087-2088.

[144] B. Heiser, E. A. Broger, Y. Crameri: **New Efficient Methods for the Synthesis and *In-Situ* Preparation of Ruthenium(II) Complexes of Atropisomeric Diphosphines and Their Application in Asymmetric Catalytic Hydrogenations**. *Tetrahedron: Asymmetry* 1991, **2**:51-62.

[145] D. J. Ager, S. A. Laneman: **Reduction of 1,3-dicarbonyl systems with ruthenium-bisarylbisphosphine catalysts**. *Tetrahedron: Asymmetry* 1997, **8**:3327-3355.

[146] D. Fabritius, H. J. Schäfer, A. Steinbüchel: **Identification and production of 3-hydroxy-Δ^9-*cis*-1,18-octadecenedioic acid by mutants of *Candida tropicalis***. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996, **45**:342-348.

[147] R. S. van der Hoeven, J. C. Steffens: **Biosynthesis and Elongation of Short- and Medium-Chain-Length Fatty Acids**. *Plant Physiol.* 2000, **122**:275-282.

[148] Y. Kimura, R. Sato, K. Mimura, M. Sato: **Propionyl Coenzyme A Carboxylase Is Required for Development of *Myxococcus xanthus***. *J. Bacteriol.* 1997, **179**: 7098-7102.

[149] W. W. Christie: **Structural analysis of fatty acids**. In *Advances in Lipid Methology - Four*. Edited by W. W. Christie: The Oily Press; 1997:119-169.
[150] E. Ayanoglu, R. D. Walkup, D. Sika, C. Djerassi: **Phospholipid Studies of Marine Organisms: III. New Phospholipid Fatty Acids from *Petrosia ficiformis***. *Lipids* 1982, **17**:617-625.
[151] A. Dasgupta, E. Ayanoglu, C. Djerassi: **Phospholipid Studies of Marine Organisms: New Branched Fatty Acids From *Strongylophora durissima***. *Lipids* 1984, **19**:768-776.
[152] R. D. Walkup, G. C. Jamieson, M. R. Ratcliff, C. Djerassi: **Phospholipid Studies of Marine Organisms: 2. Phospholipids, Phospholipid-Bound Fatty Acids and Free Sterols of the Sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) forma *fulva* (Pallas) (= *Verongia thiona*). Isolation and Structure Elucidation of Unprecedented Branched Fatty Acids**. *Lipids* 1981, **16**:631-646.
[153] P. Michelsen, B. A. Anderson: **Pyrrolidide derivatives for mass spectrometric studies of isomeric hydroxy fatty acids**. *Chemica Scripta* 1984, **24**:200-202.
[154] B. A. Andersson, R. T. Holman: **Pyrrolidides for Mass Spectrometric Determination of the Position of the Double Bond in Monounsaturated Fatty Acids**. *Lipids* 1974, **9**:185-190.
[155] J. Eagles, G. R. Fenwick, R. Self: **Remote Group Derivatives: Limitations on the Effectiveness of Pyrrolidide Derivatives of Oxygen-containing Fatty Acids**. *Biomed. Mass Spectrom.* 1979, **6**:462-464.
[156] W. W. Christie on World Wide Web URL: http://www.lipid.co.uk
[157] G. Lyubachevskaya, E. Boyle-Roden: **Kinetics of 2-monoacylglycerol acyl migration in model chylomicra**. *Lipids* 2000, **35**:1353-1358.
[158] J. J. Myher, A. Kuksis, L. Marai, S. K. F. Yeung: **Microdetermination of Molecular Species of Oligo- and Polyunsaturated Diacylglycerols by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Their *tert*-Butyl Dimethylsilyl Ethers**. *Anal. Chem.* 1978, **50**:557-561.
[159] P. Zöllner: **Structure determination of diacylglycerols as their nicotinyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry**. *Eur. J. Mass Spectrom.* 1997, **3**:309-315.
[160] G. W. Wood: **Complex Lipids**. In *Biochemical Applications of Mass Spectrometry. First Supl. Vol.* Edited by G. R. Waller, O. C. Dermer: John Wiley & Sons; 1980: 173-209.
[161] H. Hirschmann: **The Nature of Substrate Asymmetry in Steroselective Reactions**. *J. Biol. Chem.* 1960, **235**:2762-2767.
[162] K. L. Duffin, J. D. Henion, J. J. Shieh: **Electrospray and Tandem Mass Spectrometric Characterization of Acylglycerol Mixtures That Are Dissolved in Nonpolar Solvents**. *Anal. Chem.* 1991, **63**:1781-1788.
[163] H. Imai, K. Yamamoto, A. Shibahara, S. Miyatani, T. Nakayama: **Determing Double-Bond Positions in Monoenoic 2-Hydroxy Fatty Acids of Glycosylceramides by Gas Chromatograpy-Mass Spectrometry**. *Lipids* 2000, **35**:233-236.
[164] P. J. Holloway: **The chemical constitution of plant cutins**. In *The Plant Cuticle*. Edited by D. F. Cutler, K. L. Alvin, C. E. Price: Academic Press; 1980:45-85.
[165] H. C. Gérard, S. F. Osman, W. F. Fett, R. A. Moreau: **Separation, Identification and Quantification of Monomers from Cutin Polymers by High Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection**. *Phytochem. Anal.* 1992, **3**:139-144.

[166] H. C. Gérard, R. A. Moreau, W. F. Fett, S. F. Osman: **Separation and Quantitation of Hydroxy and Epoxy Fatty Acids by High-Performance Liquid Chromatography with an Evaporative Light-Scattering Detector**. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1992, **69**:301-304.

[167] F. Gelin, J. K. Volkman, J. W. d. Leeuw, J. S. S. Damste: **Mid-chain hydroxy long-chain fatty acids in microalgae from the genus *Nannochloropsis***. *Phytochemistry* 1996, **45**:641-646.

[168] T. Mahmud, H. B. Bode, B. Silakowski, R. M. Kroppenstedt, M. Xu, S. Nordhoff, G. Höfle, R. Müller: **A Novel Biosynthetic Pathway Providing Precursors for Fatty Acid Biosynthesis and Secondary Metabolite Formation in Myxobacteria**. *J. Bio. Chem.* 2002, **277**:32768-32774.

[169] T. Kaneda: **Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function and Taxonomic Significance**. *Microbiol. Rev.* 1991, **55**:288-302.

[170] R. J. Heath, C. O. Rock: **Inhibition of β-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) by Acyl-Acyl Carrier Protein in *Escherichia coli***. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**:10996-11000.

Anhang

Bemerkungen

Bei der tabellarischen Zusammenfassung werden (a) gemessene *m/z*-Verhältnisse ohne Klammern, (b) Intensitäten in runden Klammern und (c) exakte berechnete Massen in eckigen Klammern angegeben.

Tabellarische Zusammenfassungen ausgewählter Massenspektren

M	N	$[M+N+NH_4]^+$	$[M+N+Na]^+$	$[M+N-H]^-$
(3*R*)-OAc 14:0	**(3*R*)-OAc 16:0**	618,8 (1,4)	623,4 (2,9)	599,5 (4,6)
(3*R*)-OAc 16:0 **(3*R*)-OAc 14:0**	**(3*R*)-OAc 16:0** **(3*R*)-OAc 18:0**	646,5 (5,0)	651,5 (9,4)	627,5 (11,7)
(3*R*)-OAc 16:0 **(3*R*)-OAc 14:0**	**(3*R*)-OAc 18:0** **(3*R*)-OAc 20:0**	674,6 (4,1)	679,5 (6,7)	655,5 (8,3)
(3*R*)-OAc 18:0 **(3*R*)-OAc 16:0**	**(3*R*)-OAc 18:0** **(3*R*)-OAc 20:0**	702,6 (2,2)	707,5 (3,8)	683,5 (3,3)
(3*R*)-OAc 18:0	**(3*R*)-OAc 20:0**	730,7 (1,1)	735,6 (1,3)	711,5 (1,1)
(3*R*)-OAc 20:0	**(3*R*)-OAc 20:0-**	758,7 (0,7)	763,6 (0,6)	--- (---)

Tabelle A-1: Clusterionen der 3-Acetoxyfettsäuren aus dem Blütenöl von *A. pubescens* im Positiv- und im Negativ-ESI-Spektrum (TSQ 7000).

Verbindung	$[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$	$\mathbf{u_1}$	$\mathbf{u_2}$	**a**	(**a**-HOAc)
2-[(3*R*)-3-Acetoxy-palmitoyl]glycerin (**II**)[1]	457,319 [457,317] (2,7)	327,274 [327,272] (1,4)	311,241 [311,241] (22,3)	297,242 [297,243] (0,1)	237,222 [237,222] (43,0)
2-[(3*R*)-3-Acetoxy-stearoyl]glycerin (**VIII**)[1]	485,351 [485,348] (3,0)	355,306 [355,303] (1,6)	339,275 [339,272] 18,6	--- [325,274] n.b.	265,256 [265,253] (32,0)

b=[M-R´COOH]	(**b**-Me)=$[M\text{-R´COOH-Me}]^+$	**c**	$\mathbf{u_3}$	$\alpha_{\mathbf{2\text{-}MAG}}$
218,114 [218,116] (100)	203,092 [203,092] (14,2)	129,072 [129,074] (85,6)	117,038 [117,037] (5,1)	103,057 [103,058] (22,8)
218,117 [218,116] (100)	203,095 [203,092] (14,6)	129,074 [129,074] (86,0)	117,039 [117,037] (7,1)	103,059 [103,058] (31,0)

Tabelle A-2: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von 2-Monoacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacylrest, vermessen als Bistrimethylsilylether.

[1] Bestandteil des Blütenöls von *D. barberae.*

Verbindung	$[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$	($\alpha\mathbf{1}_{\mathbf{1\text{-}MAG}}$-HOAc)	$\alpha\mathbf{2}_{\mathbf{1\text{-}MAG}}$	**a**	(**a**-HOAc)
1-[(3*R*)-Acetoxy-palmitoyl]glycerin (**IV**)[1,2]	457,318 [457,317] (1,5)	369,284 [369,283] (100)	205,110 [205,108] (1,5)	297,244 [297,243] (0,1)	237,221 [237,222] (15,1)
1-[(3*R*)-Acetoxy-stearoyl]glycerin (**XII**)[2]	485,351 [485,348] (2,4)	397,313 [397,314] (100)	205,109 [205,108] (1,9)	--- [325,274] n.b.	265,253 [265,253] (11,5)

Tabelle A-3: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von 1-Monoacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacylrest, vermessen als Bistrimethylsilylether.

[1] Bestandteil des Blütenöls von *D. barberae*.

[2] Bestandteil des Blütenöls von *L. ciliata.*

Verbindung	[M-Me-HOAc]$^+$	$\mathbf{u_1}$	$\mathbf{u_2}$	**a**	(**a**-HOAc)
2-[(3*R*)-3-Acetoxymyristoyl]-1-acetylglycerin (**I**)[1]	399,260 [399,257] (6,4)	299,244 [299,241] (2,4)	283,212 [283,209] (60,6)	269,225** [269,212] (1,0)	209,192 [209,191] (100)
2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin (**V**)[1]	427,287 [427,288] (9,7)	327,273 [327,272] (2,9)	311,237 [311,241] (86,7)	297,245 [297,243] (0,3)	237,217 [237,222] (100)
1-[(3*R*)-Acetoxypalmitoyl]-2-acetylglycerin (**XI**)[2]	427,287 [427,287] (34,3)	327,273 [327,272] (4,3)	311,239 [311,241] (54,8)	297,247 [297,243] (0,5)	237,220 [237,222] (90,0)
2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-1-acetylglycerin (**IX**)[1]	455,322 [455,319] (10,0)	355,306 [355,303] (3,3)	339,272 [339,272] (84,4)	325,283** [325,274] (0,2)	265,253 [265,253] (100)
1-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-2-acetylglycerin (**XIII**)[2]	455,322 [455,319] (22,8)	355,307 [355,303] (4,4)	339,273 [339,272] (51,0)	325,279 [325,274] (0,3)	265,253 [265,253] (73,7)

d	**[M-R´COOH]$^+$**	**e**	**c**	$\alpha_{\mathbf{1,2\text{-}DAG}}$	$\mathbf{u_3}$
189,097 [189,095] (21,1)	188,090 [188,087] (8,3)	145,070 [145,069] (52,6)	129,075 [129,074] (47,4)	103,060 [103,058] (8,8)	117,039 [117,037] (47,9)
189,092 [189,095] (26,6)	188,086 [188,087] (9,2)	145,065 [145,069] (64,4)	129,070 [129,074] (51,4)	103,057 [103,058] (6,3)	117,035 [117,037] (50,8)
189,094 [189,095] (35,3)	188,090 [188,087] (0,4)	145,067 [145,069] (39,2)	129,072 [129,074] (44,1)	103,058 [103,058] (10,3)	117,035 [117,037] (100)
189,095 [189,095] (39,8)	188,088 [188,087] (13,1)	145,068 [145,069] (69,4)	129,072 [129,074] (67,5)	103,058 [103,058] (9,4)	117,037 [117,037] (51,3)
189,095 [189,095] (48,7)	188,091 [188,087] (0,8)	145,069 [145,069] (44,5)	129,074 [129,074] (55,2)	103,059 [103,058] (12,6)	117,036 [117,037] (100)

Tabelle A-4: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von 1,2-Diacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und einem Acetylrest, vermessen als Trimethylsilylether.

* Aufgrund geringer Analytmenge Abweichungen in den Intensitäten.

** Abweichung von gemessener und berechneter Masse über 5 mDa.

[1] Bestandteil des Blütenöls von *D. barberae.*

[2] Bestandteil des Blütenöls von *L. ciliata.*

Verbindung	[M-Me-HOAc]$^+$	(α**1**$_{1,3\text{-DAG}}$ -HOAc)	α**2**$_{1,3\text{-DAG}}$	**u**$_2$	**a**	(**a**-HOAc)
3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin (**VI**)[1,2]	427,289 [427,288] (8,6)	369,282 [369,283] (15,4)	175,076 [175,079] (100)	311,240 [311,240] (2,0)	297,249* [297,243] (0,1)	237,222 [237,222] (25,9)
3-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-1-acetylglycerin (**XII**)[2]	455,323 [455,319] (9,2)	397,317 [397,313] (15,9)	175,078 [175,079] (100)	339,274 [339,272] (0,3)	--- [325,274] n.b.	265,255 [265,253] (16,0)

d	**u**$_3$
189,094 [189,095] (10,8)	117,037 [117,037] (13,3)
189,096 [189,095] (14,6)	117,0389 [117,037] (10,8)

Tabelle A-5: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von 1,3-Diacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und einem Acetylrest, vermessen als Trimethylsilylether.

* Abweichung von gemessener und berechneter Masse über 5 mDa.

1 Bestandteil des Blütenöls von *D. barberae.*

2 Bestandteil des Blütenöls von *L. ciliata.*

Verbindung	[M-2HOAc]$^+$	**a**	(**a**-HOAc)	[M-R´COOH]$^+$
2-[(3*R*)-3-Acetoxymyristoyl]-1,3-diacetylglycerin (**II**)[1]	324,240* [324,230] (0,3)	269,219* [269,212] (0,5)	209,190 [209,191] (53,1)	159,061 [159,066] (100)
2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1,3-diacetylglycerin (**VII**)[1]	352,267* [352,261] (0,3)	297,245 [297,243] (0,5)	237,222 [237,222] (65,3)	159,063 [159,066] (100)
2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-1,3-diacetylglycerin (**X**)[1]	--- [380,293] n.b.	325,300* [325,274] (0,1)	265,263* [265,253] (30,0)	159,065 [159,066] (100)

Tabelle A-6: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von Triacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und zwei Acetylresten.

1 Bestandteil des Blütenöls von *D. barberae.*

* Abweichung von gemessener und berechneter Masse über 5 mDa.

Verbindung	$[M+NH_4]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-HOAc]^+$
2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin / 1-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]glycerin (**III/IV**)	406,3 (0,1)	389,3 (0,1)	371,3 (1,5)	329,3 (0,1)
2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]glycerin (**VIII**)	434,3 (0,1)	417,3 (0,1)	399,3 (2,3)	357,3 (0,1)

$[M+H-H_2O-HOAc]^+$	**a**	(**a**-HOAc)
311,3 (100)	297,2 (0,1)	237,2 (1,5)
339,3 (100)	325,2 (0,1)	265,2 (1,6)

Tabelle A-7: Charakteristische Fragmente in den ESI-Massenspektren von Monoacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacylrest aus dem Blütenöl von *D. barberae* (TSQ 7000, 19 eV).

Verbindung	$[M+NH_4]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-HOAc]^+$
2-[(3*R*)-3-Acetoxymyristoyl]-1-acetylglycerin (**I**)	420,3 (0,2)	403,3 (0,2)	385,3 (2,3)	343,3 (0,2)
2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin / 3-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1-acetylglycerin (**V**/**VI**)	448,3 (0,2)	431,3 (0,1)	413,3 (2,1)	371,3 (0,2)
2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl]-1-acetylglycerin (**IX**)	476,3 (0,5)	459,3 (0,1)	441,3 (2,7)	399,3 (0,2)

$[M+H-H_2O-HOAc]^+$	$[M-2HOAc]^+$	**a**	(**a**-HOAc)	**f**=$[M-R´COOH]^+$
325,2 (100)	283,2 (6,2)	269,2 (1,2)	209,2 (11,6)	117,1 (12,6)
353,3 (100)	311,3 (5,6)	297,2 (1,2)	237,2 (11,5)	117,1 (11,7)
381,3 (100)	339,3 (5,5)	325,2 (1,1)	265,2 (11,3)	117,1 (10,8)

Tabelle A-8: Charakteristische Fragmente in den ESI-Massenspektren von Diacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und einem Acetylrest aus dem Blütenöl von *D. barberae* (TSQ 7000, 19 eV).

Verbindung	$[M+NH_4]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H-HOAc]^+$	$[M+H-2HOAc]^+$
2-[(3*R*)-3-Acetoxymyristoyl]-1,3-diacetylglycerin (**II**)	462,3 (1,0)	445,3 (2,7)	385,3 (1,5)	325,2 (53,9)
2-[(3*R*)-3-Acetoxypalmitoyl]-1,3-diacetylglycerin (**VII**)	490,3 (1,6)	473,3 (2,7)	413,3 (2,0)	353,3 (51,6)
2-[(3*R*)-3-Acetoxystearoyl)]-1,3-diacetylglycerin (**X**)	518,4 (3,8)	501,3 (0,8)	441,3 (3,9)	381,3 (50,8)

a	(**a**-HOAc)	**f**=$[M-R´COOH]^+$
269,2 (22,8)	209,2 (86,8)	159,1 (100)
297,2 (18,1)	237,2 (92,6)	159,1 (100)
325,2 (21,9)	265,2 (95,2)	159,1 (100)

Tabelle A-9: Charakteristische Fragmente in den ESI-Massenspektren von Triacylglycerinen mit einem (3*R*)-3-Acetoxyacyl- und zwei Acetylresten aus dem Blütenöl von *D. barberae* (TSQ 7000, 19 eV).

Verbindung	$[M-15]^+$	a	b	c
1,2-DAG [16:1(9t), 2:0] (**XVI**)**	427,300* [427,288] (0,6)	237,226 [237,222] (2,6)	311,241 [311,241] (6,1)	145,071 [145,069] (5,8)
1,2-DAG [16:0, 2:0] (**XVII**)	429,303 [429,304] (5,2)	239,236 [239,238] (26,4)	313,253 [313,256] (100)	145,066 [145,069] (75,9)
1,2-DAG [16:0, 4:0] (**XX**)	457,334 [457,335] (1,7)	239,236 [239,238] (5,1)	313,254 [313,256] (22,3)	145,065[a] [145,069] (100)
1,2-DAG [16:0, i-5:0] (**XXI**)**	471,351 [471,351] (4,5)	239,240 [239,238] (8,3)	313,256 [313,256] (35,6)	145,067 [145,069] (82,8)

d	e	$\alpha_{1,2\text{-DAG}}$
117,040 [117,037] (20,7)	189,095 [189,095] (20,6)	103,060 [103,058] (5,0)
117,037 [117,037] (87,4)	189,092 [189,095] (30,8)	103,057 [103,058] (22,9)
145,065[a] [145,069] (100)	217,125 [217,126] (6,1)	103,058 [103,058] (4,5)
159,086 [159,084] (28,8)	231,142 [231,142] (11,4)	103,058 [103,058] (11,5)

Tabelle A-10: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) der trimethylsilylierten 1,2-Diacylglycerine aus dem Blütenöl von *S. micranthum*.

[a] Im Falle des TMS-Ethers des 1,2-DAG [16:0, 4:0] sind die Fragmente **c** und **d** isobar, was die abweichende relative Intensität des Signals erklärt.

* Abweichung von gemessener und berechneter Masse über 5 mDa.

** Geringe Substanzmenge. (Abweichungen in den relativen Intensitäten sind technisch bedingt möglich.)

Verbindung	$[M-Me]^+$	$[M-MeO]^+$	$[M-Me-MeOH]^+$	α_1	(α_1-MeOH)	α_2	**u**
7-OTMS 20:0[1]	399,335* [399,329] (0,4)	383,339 [383,335] (0,2)	367,308 [367,303] (1,2)	231,137 [231,142] (100)	199,117 [199,115] (2,7)	285,261 [285,261] (62,3)	202,139 [202,139] (1,2)
7-OTMS 22:0[1,a]	427,337* [427,361] (0,4)	411,371 [411,366] (0,2)	395,341* [395,335] (1,3)	231,138 [231,142] (100)	199,118 [199,115] (2,5)	313,293 [313,293] (67,3)	202,142 [202,139] (1,2)
7-OTMS 24:0[1,b]	455,404* [455,392] (0,2)	439,390* [439,397] (0,2)	423,374* [423,366] (0,9)	231,143 [231,142] (100)	199,121* [199,115] (2,3)	341,327 [341,324] (37,2)	202,143 [202,139] (1,8)

Tabelle A-11: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von trimethylsilylierten Monohydroxyfettsäuremethylestern mit Ausnahme der 3-Hydroxyfettsäuremethylester.

[1] Derivat aus dem Blütenöl von *M. coccigera.*

[1,a] Aus den zusätzlich auftretenden Fragmenten α_1 bei *m/z* 259,174 (1,8 %, $m/z_{calc.}$ 259,173) und α_2 bei *m/z* 285,262 (0,9 %, $m/z_{calc.}$ 285,261) kann auf Koelution des Methylesters von **9-OTMS 22:0** geschlossen werden; aus den Integralen über die Spuren der Fragmente α_1 und α_2 wurde als Mittelwert ein Anteil von 5 % berechnet.

[1,b] Aus den zusätzlich auftretenden Fragmenten α_1 bei *m/z* 259,175 (0,3 %, $m/z_{calc.}$ 259,173) und α_2 bei *m/z* 313,301* (0,2 %, $m/z_{calc.}$ 313,293) kann auf die Koelution des Methylesters von **9-OTMS 24:0** geschlossen werden; aus den Integralen über die Spuren der Fragmente α_1 und α_2 wurde als Mittelwert ein Anteil von 3 % berechnet.

* Abweichung von gemessener zu berechneter Masse über 5 mDa.

Verbindung	$[M-Me]^+$	$[M-Me-HOTMS]^+$	α_1	α_2	α_3	α_4
3,7-bisOTMS 20:0[1,2]	487,372* [487,364] (0,2)	397,311 [397,314] (16,6)	175,082 [175,079] (5,0)	429,369* 429,358 (0,4)	319,175 [319,176] (16,5)	285,254* [285,261] (80,4)
3,7-bisOTMS 22:0[2]	515,403* [515,395] (0,3)	425,349 [425,345] (14,6)	175,084 [175,079] (9,0)	457,395 [457,399] (0,4)	319,180 [319,176] (18,5)	313,292 [313,297] (64,7)
5,9-bisOTMS 22:0[1,a,**]	--- [515,3952] n.b.	425,349 [425,345] (3,4)	203,111 [203,110] (77,9)	429,365* [429,358] (2,8)	347,209 [347,207] (48,9)	285,263 [285,261] (83,1)
3,9-bisOTMS 22:0[1]	515,398 [515,395] (0,1)	425,344 [425,345] (53,7)	175,078 [175,079] (11,0)	457,397* [457,388] (0,1)	347,206 [347,207] (38,1)	285,252* [285,261] (100)
3,9-bisOTMS 24:0[1,b,**]	543,431 [543,427] (0,1)	453,381 [453,376] (15,5)	175,081 [175,079] (6,2)	--- 485,421 n.b.	347,210 [347,207] (13,7)	313,294 [313,293] (65,4)

(α_2-HOTMS)	(α_3-MeOH)	(α_3-HOTMS)	(α_3-MeOH-HOTMS)	(α_3-2HOTMS)	(α_3-MeOH-2 HOTMS)	**u**
339,311 [339,308] (0,6)	287,140* [287,150] (81,07)	229,130 [229,126] (4,0)	197,102 [197,100] (2,1)	139,077 [139,076] (1,4)	--- [107,050] n.b.	247,118 [247,119] (16,2)
367,344 [367,340] (0,8)	287,146 [287,150] (78,6)	229,130 [229,126] (5,7)	197,101 [197,100] (2,6)	139,076 [139,076] (1,6)	--- [107,050] n.b.	247,122 [247,122] (17,0)
339,309 [339,308] (1,9)	--- 315,181 n.b.	257,160 [257,157] (11,8)	225,133 [225,131] (1,2)	167,111 [167,107] (4,0)	135,084 [135,081] (10,6)	--- 275,213 n.b.
367,343 [367,340] (0,2)	315,176 [315,181] (68,9)	257,156 [257,157] (11,3)	225,134 [225,131] (0,9)	167,106 [167,107] (3,1)	135,080 [135,081] (8,5)	247,117 [247,119] (11,7)
395,379* [395,371] (0,4)	315,185 [315,181] (32,72)	257,160 [257,157] (6,6)	--- 225,131 n.b.	167,109 [167,107] (2,7)	135,090* [135,081] (8,1)	247,122 [247,119] (5,6)

Tabelle A-12: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylestern.

[1] Derivat aus dem Blütenöl von *M. coccigera*.

[2] Derivat aus dem Blütenöl von *S. huebneri*.

[a] Aus den zusätzlich auftretenden Fragmenten α_1 bei *m/z* 175,083 (1,2 %, $m/z_{calc.}$ 175,079), α_3 bei *m/z* 319,178 (4,5 %, $m/z_{calc.}$ 319,176), α_4 bei *m/z* 313,294 (19,6 %, $m/z_{calc.}$ 313,293), (α_3-MeOH) bei *m/z* 287,154* (23,5 %, $m/z_{calc.}$ 287,145) und **u** bei *m/z* 247,122 (2,7 %, $m/z_{calc.}$ 247,119) kann auf Koelution des Methylesters von **3,7-bisOTMS 22:0** geschlossen werden; aus den Integralen über die Spuren der Fragmente des Typs α_4 wurde ein Anteil von 21% berechnet.

[b] Aus den zusätzlich auftretenden Fragmenten α_1 bei *m/z* 203,112 (28,1 %, $m/z_{calc.}$ 203,110), α_3 bei *m/z* 375,243 (2,9 %, $m/z_{calc.}$ 375,239), α_4 bei *m/z* 285,263 (37,6 %, $m/z_{calc.}$ 285,261), dem Fehlen des Fragments (α_3-MeOH) bei $m/z_{calc.}$ 343,213 kann auf Koelution des Methylesters von **5,11-bisOTMS 24:0** geschlossen werden; aus den Integralen über die Spuren der Fragmente des Typs α_4 wurde ein Anteil von 35% berechnet.

[*] Abweichungen von gemessener zu berechneter Masse über 5 mDa.

[**] Geringe Substanzmenge. (Technisch bedingt sind Schwankungen in den relativen Intensitäten, das Fehlen von schon unter optimalen Bedingungen intensitätsschwachen Signale und Massenungenauigkeiten möglich.)

Verbindung	$[M\text{-}HOAc]^+$	$[M\text{-}HOAc\text{-}MeOH]^+$	α	(α-HOAc)
7-OAC 20:0[1]	324,303 [324,303] (0,3)	292,277 [292,277] (17,6)	201,114 [201,113] (2,3)	159,098 [159,102] (100)
7-OAc 22:0[1,a]	352,337 [352,334] (0,4)	320,307 [320,308] (37,6)	201,114 [201,113] (2,7)	159,097 [159,102] (100)

Tabelle A-13: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von Acetoxyfettsäure-methylestern mit mittig angeordneter Acetoxyfunktion.

[1] Derivat aus dem Blütenöl von *M. coccigera*.

[a] Aus dem Fragment (α-C_2H_2CO) bei *m/z* 187,135 (5,0 %, $m/z_{calc.}$ 187,134) kann auf Koelution des Methylesters von **9-OTMS 22:0** geschlossen werden; aus den Spuren der Fragmente des Typs (α-CH_2CO) wurde ein Anteil von 3% berechnet.

Verbindung	$[M\text{-}HOAc]^+$	$[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$	$[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS]^+$	$[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}HOMe]^+$
9-OAc, 5-OTMS 22:0[1]	440,371 [440,368] (0,1)	425,346 [425,345] (32,2)	350,322 [350,319] (0,4)	318,298* [318,292] (0,3)
9-OAc, 3-OTMS 22:0[1,]	440,372 [440,368] (0,1)	425,346 [425,345] (100)	350,327* [350,319] (0,3)	318,304* [318,292] (0,4)
11-OAc, 5-OTMS 24:0[1]	--- [468,400] n.b.	453,381 [453,376] (4,4)	378,358* [378,350] (0,4)	346,338* [346,324] (0,5)

$[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}HOMe\text{-}CO]^+$	$[M\text{-}HOAc\text{-}HOTMS\text{-}HOMe\text{-}C_3H_6O]^+$	α_1	(α_2-HOAc)	(α_3-CH_2CO)	(α_3-CH_2CO-HOTMS)
290,300 [290,297] (0,1)	276,287 [276,282] (0,4)	203,109 [203,110] (100)	339,310 [339,308] (6,7)	275,272 [275,168] (0,1)	185,118 [185,118] (0,2)
290,302 [290,297] (0,2)	276,285 [276,282] (3,0)	175,080 [175,079] (21,9)	367,343 [367,340] (0,3)	275,173 [275,168] (1,0)	185,117 [185,118] (1,1)
--- 318,329 n.b.	304,319* [304,313] (0,3)	203,109 [203,110] (100)	367,344 [367,340] (4,1)	303,301* [303,199] (0,1)	213,153 [213,149] (0,7)

Tabelle A-14: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von gemischt acetylierten und trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuremethylestern.

[1] Derivat aus dem Blütenöl von *M. coccigera*.

[*] Abweichung von gemessener und berechneter Masse über 5 mDa.

Verbindung	$[M\text{-}HOAc]^+$	$[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$	[M-HOAc-HOTMS]	(α-CH_2CO)
7-OAc 20:0[1]	382,331 [382,327] (1,6)	367,303 [367,303] (64,5)	292,280 [292,277] (5,7)	217,125 [217,126] (100)
7-OAc 22:0[1,a]	410,361 [410,358] (1,9)	395,335 [395,335] (67,5)	320,309 [320,308] (7,8)	217,125 [217,126] (100)
7-OAc 24:0[1,b,**]	438,399* [438,389] (1,1)	423,373* [423,366] (34,9)	348,344 [348,339] (6,3)	217,129 [217,126] (57,9)

$[TMSO(CO)]^+$	$[CH_3CO]^+$
117,035 [117,037] (88,7)	43,019 [43,018] (8,5)
117,035 [117,037] (94,9)	43,019 [43,018] (8,5)
117,038 [117,037] (100)	43,021 [43,018] (22,7)

Tabelle A-15: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von Fettsäure-trimethylsilylestern mit mittig angeordneter Acetoxyfunktion.

[1] Derivat aus dem Blütenöl von *M. coccigera*.

[a] Aus dem zusätzlich auftretenden Fragment (α-CH_2CO) bei *m/z* 245,158 (2,6 %, $m/z_{calc.}$ 245,157) kann auf Koelution des Trimethylsilylesters von **9-OAc 22:0** geschlossen werden; aus den Integralen über die Massenspuren der Fragmente des Typs (α-CH_2CO) wurde ein Anteil von 3 % berechnet.

[b] Aus dem zusätzlich auftretenden Fragment (α-CH_2CO) bei *m/z* 245,156 (1,8 %, $m/z_{calc.}$ 245,157) kann auf Koelution des Trimethylsilylesters von **9-OAc 24:0** geschlossen werden; aus den Integralen über die Massenspuren der Fragmente des Typs (α-CH_2CO) wurde ein Anteil von 6 % berechnet.

[*] Abweichung von gemessener zu berechneter Masse über 5 mDa.

[**] Geringe Substanzmenge. (Technisch bedingt sind Schwankungen in den relativen Intensitäten, das Fehlen von schon unter optimalen Bedingungen intensitätsschwachen Signalen und Massenungenauigkeiten möglich.)

Verbindung	[M-HOAc-Me]$^+$	[M-HOTMS-Me-CH_2CO]$^+$	[M-HOAc-HOTMS-Me]$^+$	(α_3-CH_2CO)
7-OAc, 3-OTMS 20:0[1,**]	455,344[*] [455,338] (41,7)	383,298 n.b.[**]	365,297[*] [365,287] (1,7)	305,172[*] [305,160] (0,7)
7-OAc, 3-OTMS 22:0[1,**]	483,375[*] [483,369] (42,8)	411,329 n.b.[**]	393,319 n.b.[**]	305,172[*] [305,160] (0,5)
9-OAc, 3-OTMS 22:0[1,a]	483,371 [483,369] (26,8)	411,333 [411,329] (4,9)	393,322 [393,319] (5,3)	333,194 [333,191] (3,8)
9-OAc, 3-OTMS 24:0[1,**]	511,412[*] [511,400] (12,8)	439,367[*] [439,361] (3,1)	421,359* [421,350] (5,2)	333,198[*] [333,192] (3,4)
11-OAc, 5-OTMS 24:0[1,]	511,410[*] [511,400] (2,0)	439,361 n.b.	421,356[*] [421,350] (1,8)	361,223 n.b.

(α_3-HOTMS-CH_2CO)	α_1
215,122[*] [215,110] (2,2)	233,105 [233,103] (57,8)
215,120[*] [215,100] (2,0)	233,105 [233,103] (56,6)
243,145 [243,142] (2,0)	233,102 [233,103] (71,5)
243,152[*] [243,142] (2,0)	233,107 [233,103] (48,4)
271,183[*] [271,173] (1,4)	261,136 [261,134] (100)

Tabelle A-16: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von gemischt acetylierten und trimethylsilylierten Dihydroxyfettsäuretrimethylsilylestern.

[1] Derivat aus dem Blütenöl von *M. coccigera*.

[a] Aus den zusätzlich augtretenden Fragmenten α_1 bei *m/z* 261,136 (6,8 %, $m/z_{calc.}$ 261,134) und (α_2-HOAc) bei *m/z* 339,312 (0,6 %, $m/z_{calc.}$ 339,308) kann auf die Koelution von **9-OAc, 5-OTMS 22:0** geschlossen werden; aus den Integralen über die Spuren der Fragmente des Typs α_1 wurde ein Anteil von 8 % berechnet.

[**] Geringe Substanzmenge. (Technisch bedingt sind Schwankungen in den relativen Intensitäten, das Fehlen von schon unter optimalen Bedingungen intensitätsschwachen Signalen und Massenungenauigkeiten möglich.)

Verbindung	$[M\text{-}HOAc\text{-}Me]^+$	$[M\text{-}2HOAc]^+$	$[M\text{-}2HOAc\text{-}Me]^+$	$[M\text{-}2HOAc\text{-}HOTMS]^+$
3,9-diOAc 22:0[1]	425,349*	408,348*	393,319	318,295
	[425,340]	[408,342]	[393,319]	[318,292]
	(0,6)	(3,7)	(60,7)	(11,2)

$[M\text{-}2HOAc\text{-}HOTMS\text{-}CO]^+$	(α-CH_2CO)	(α-CH_2CO-HOAc)
290,298	303,164	243,144
[290,297]	[303,163]	[243,142]
(4,3)	(42,1)	(25,1)

Tabelle A-17: Charakteristische Fragmente in den EI-Massenspektren (GCT) von diacetylierten Dihydroxyfettsäuretrimethylsilylestern.

[1] Derivat aus dem Blütenöl von *M. coccigera*.

* Abweichung von gemessener zu berechneter Masse über 5 mDa.

Verbindung	$[M+H]^+$	$[M+H\text{-}HOAc]^+$	$[M+H\text{-}2HOAc]^+$	$[M+H\text{-}3HOAc]^+$	$\mathbf{a}_{TAG}$
M_1	587,4	527,4	467,4	407,3	411,4
	(0,6)	(18,0)	(9,2)	(10,3)	(0,8)
M_2	615,5	555,3	495,4	435,4	439,5
	(0,6)	(15,7)	(8,8)	(28,2)	(0,5)

($\mathbf{a}_{TAG}$-HOAc)	($\mathbf{a}_{TAG}$-2HOAc)	$\mathbf{f}_{TAG}$
351,4	291,4	159,2
(4,3)	(60,3)	(100)
379,3	319,4	159,2
(6,6)	(75,1)	(100)

Tabelle A-18: Fragmente in den ESI-CID-Spektren von Triacylgylcerinen mit einem Diacetoxyacyl- und zwei Acetylresten aus dem Blütenöl von *S. huebneri* (TSQ 7000, 18 eV).

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. L. Wessjohann (Institut für Pflanzenbiochemie und Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Herrn Dr. G. Gerlach (Botanischer Garten München) für die Überlassung des interessanten Themas und die bei der Ausarbeitung gewährten Unterstützung.

Herrn Dr. J. Schmidt danke ich für die gute Zusammenarbeit in den Massenspektrometrie-Laboratorien der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie am IPB, sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. W. Schliemann gebührt Dank für die Möglichkeit Verantwortung für das GC/TOF-Massenspektrometer der Abteilung Sekundärstoffwechsel des IPB übernehmen zu dürfen und der damit verbundenen Vermittlung von Personalmitteln aus der Abteilung von Herrn Prof. D. Strack.

Frau J. Babczinsky (Bot. Garten München) danke ich für die mir im Botanischen Garten München gewährte Unterstützung, für das Sammeln zahlreicher Ölproben, das Anfertigen der Herbarbelege und das gute Arbeitsklima im Labor.

Fr. Ch. Kuhnt (IPB) gilt besonderer Dank für die Zusammenarbeit im GC/MS-Labor und allzeit gewährte Unterstützung bei technischen Fragen.

Herrn Dr. A. Gröger (Bot. Garten München) danke ich für Hilfen bei botanischen Fragestellungen.

Frau G. Schmidt (IPB) danke ich für die Durchführung der Noyori-Reduktion.

Meinen Kollegen danke ich für das immer hervorragende Arbeitsklima.

Frau Dr. B. B. Simpson (University of Texas at Austin) hat uns dankenswerterweise eine Ölprobe von *Krameria lanceolata* (Krameriaceae) für unsere Untersuchungen überlassen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft ist für die Teilfinanzierung des Projekts zu danken (Projekt.-Nr.: GE 828/4-2).

Lebenslauf

Name	Lars Seipold
geboren	01.01.1973 in Köln
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1979-1983	Grundschule in Köln
1983-1992	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium in Köln (Abschluß: allgemeine Hochschulreife)

Wehrpflicht

1992-1994	Zivildienst Städtische Krankenhäuser der Stadt Köln

Hochschulausbildung

1994-1999	Studium der Chemie an der Universität zu Köln
06/1999-03/2000	Diplomarbeit zum Thema „Komplexierungseigenschaften und Bedeutung für die Siderophor-vermittelte Eisenaufnahme von Ferribactin 9446 aus *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446“ im Arbeitskreis von Prof. Dr. H. Budzikiewicz und PD Dr. K. Taraz (Abschlußnote: sehr gut)
04/2000-08/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Massenspektrometrie an der Universität zu Köln (Arbeitskreis Prof. Schmalz)
08/2000-heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen Garten München (Betreuer: Dr. Gerlach) und am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Betreuer: Prof. Dr. L. Wessjohann)

Halle a.d. Saale, 26. Januar 2004

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Der benutzten Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

_____

Lars Seipold, Halle a.d. Saale, 26. Januar 2004