Badania składu chemicznego pyłku

III. Badanie ekstraktu eterowego

Investigations on the chemical composition of pollen

III. The study of ethyl ether extract

A. KWIATKOWSKI

W poprzednich pracach (K. Lubliner-Mianowska 1956, A. Kwiatkowski i K. Lubliner-Mianowska 1957) wspomniano, iż badania chemiczne pyłków i zarodników prowadzone były na ogół z punktu widzenia zainteresowań pszczelarzy (białka i aminokwasy, węglowodany, witaminy, hormony, enzymy, barwniki) bądź też palynologów (sporopolenina). W ostatnich latach biochemicy pracowali również nad znalezieniem czynników alergicznych w miodzie i pyłkach roślinnych, natomiast problem składu chemicznego ekstraktu eterowego poruszany jest w literaturze światowej jedynie sporadycznie.

Pomijając doniesienia o ogólnej zawartości ekstraktu eterowego w pyłkach można stwierdzić, iż badania chemiczne ekstraktu zapoczątkował w 1922 r. Miyaka, donosząc o wykryciu fitosterolu (wg C. Barra 1959). W następnym roku Anderson (1923) spostrzeżenie to potwierdził, znajdując ponadto kilka innych określonych związków chemicznych (węglowodory, składniki wosków i fosfatydy). Dalsze, poważniejsze badania chemiczne podjęto dopiero po 30 latach.

P. Lunden (1954) w swym przeglądzie literaturowym traktującym o chemii pyłków, obejmującym okres do 1954 r., ze szczególnym podkreśleniem prac wykonanych w latach 1945—1954, wymienia zaledwie cztery doniesienia omawiające skład ekstraktu eterowego. W bardziej popularnym przeglądzie prac chemicznych R. Chauvin (1954) wspomina jedynie o autorach, którzy ustalali ogólną zawartość ekstraktu.

Z bardziej ciekawych, współczesnych prac nad chemią ekstraktu eterowego pyłków wymienić należy badania A. Sosa (1952). Ekstrakt eterowy z pyłku *Corylus avellana* w toku systematycznej analizy rozdzielony został na szereg frakcji, z których wydzielono trzy kwasy, dwa sterole, alkohol i węglowodór (tabela 1) oznaczając jednocześnie ilościowo zawartość głównych składników ekstraktu. Wydajność ekstraktu wy-

Tabela 1 - Table 1

Związki znalezione dotychczas w ekstrakcie eterowym pyłków

The chemical compounds being found in ethyl ether extract of pollen

Grupa Chemical group	Nazwa Compound	Wzór Formula	Autor cyt. Author
Węglowodory Hydrocarbons	trikozan	$C_{23}H_{48}$	Sosa (1952)
	pentakozan	$C_{25}H_{52}$	Nilsson (1957)
	heptakozan	$C_{27}H_{56}$	Kiesel i Rubin (wg Lundena 1954)
	nonakozan	$C_{29}H_{60}$	Anderson (1923)
	-	$C_{20}H_{40}$	Spada (1958)
	-	$C_{34}H_{68}$	Spada (1958)
Alkohole Alcohols	heksadekanol	$C_{16}H_{33}OH$	Sosa (1952)
	tetrakozanol	$C_{24}H_{49}OH$	Nilsson (1957)
	pentakozanol	$C_{25}H_{51}OH$	Spada (1958)
	heksakozanol	$C_{26}H_{53}OH$	Nilsson (1957)
	heptakozanol	$C_{27}H_{55}OH$	Spada (1958)
	oktakozanol	$C_{28}H_{57}OH$	Nilsson (1957)
	triakontanol	$C_{30}H_{61}OH$	Anderson (1923)
Sterole Sterols	fitosterol		Miyaka (wg Barr 1959)
	24-metyleno- cholesterol	$C_{28}H_{46}O$	Barbier (1960)
	-	$C_{21}H_{36}O$	Sosa (1952)
	-	$C_{26}H_{44}O$	Sosa (1952)
Kwasy Acids	dodekanowy	$C_{12}H_{24}O_2$	Sosa (1952)
	palmitynowy	$C_{16}H_{32}O_2$	Anderson (1923)
	stearynowy	$C_{18}H_{36}O_2$	Barr (1959)
	oleinowy	$C_{18}H_{34}O_2$	Barr (1959)
	linolowy	$C_{18}H_{32}O_2$	Barr (1959)
	linolenowy	$C_{18}H_{30}O_2$	Barr (1959)
	trikozanowy	$C_{23}H_{46}O_2$	Sosa (1952)

nosiła 15%. W 100 g pyłku znaleziono 5 g kwasów tłuszczowych i 2,6 g części nie zmydlających się; w których były węglowodory, zasady, ketony, alkohole i sterole.

Dalszą, obszerną pracę ogłosił M. Nilsson (1957), który ze współpracownikami wykrył w pyłku *Pinus montana*, *Zea mays* i *Alnus glutinosa* kilka alkoholi i węglowodorów. Związki tego typu znalazł również A. Spada i inni (1958) w pyłku *Cedrus deodara* i *Cedrus atlantica*.

C. B a r r i inni (1959) wychodząc z dużej ilości surowca (7,89 kg pyłku *Zea mays*) wypreparowali pięć kwasów, które zostały zidentyfikowane po przeprowadzeniu w estry p-bromofenacylowe (kwasy nasycone) lub w hydroksy- i bromopochodne (kwasy nienasycone).

Jak już wspomniano, wielu autorów prowadzących dosyć szczegółowe badania chemiczne pyłku pomija milczeniem skład ekstraktu eterowego, zadowalając się w najlepszym razie oznaczeniem ogólnej zawartości. Tego rodzaju stanowisko jest zrozumiałe, gdy weźmie się pod uwagę trudności związane ze zbiorem większej ilości czystego pyłku u przeważającej większości gatunków roślin i gdy zna się trudności związane z klasyczną analizą jakościową i ilościową mieszanin naturalnych, zawierających związki wchodzące w skład ekstraktu eterowego. Badania dotychczasowe obejmują gatunki obficie pyłące i łatwe do zbioru, stąd powtarzające się oznaczenia w *Pinus*, *Corylus*, *Zea* itp.

CEL I METODY PRACY

Celem niniejszej pracy jest rozszerzenie znajomości składu chemicznego ekstraktu eterowego pyłku, przy jednoczesnym wypróbowaniu nowoczesnych metod fizyko-chemicznych umożliwiających określenie składu jakościowego i ilościowego w sposób dokładny, a jednocześnie stosunkowo szybki. Korzystając z możliwości pracy w nowoczesnie wyposażonym laboratorium Państwowego Instytutu Badań Technologicznych w Helsinkach zbadano bardziej szczegółowo skład ekstraktu w zebranych przez doc. K. L u b l i n e r - M i a n o w s k ą pyłkach *Corylus avellana*, *Alnus incana*, *Pinus silvestris*, *Pinus montana*, *Papaver rhoeas* i *Equisetum arvense*. Wyniki chemiczne nie zostały skomentowane paleonologicznie na skutek przedwczesnej i niespodziewanej śmierci doc. K. L u b l i n e r - M i a n o w s k i e j.

Nie dysponując dostateczną ilością substancji wzorcowych zrezygnowano ze szczegółowej identyfikacji większości indywidualów chemicznych (wyjątkiem są kwasy tłuszczowe), zadowalając się określeniem charakteru lub przynależności chemicznej grup związków spotykanych w ekstrakcie eterowym.

Pyłek ekstrahowano eterem etylowym w aparacie Soxhleta przez 20 godzin, ekstrakt zmydlało 0,5 n alkoholowym roztworem wodorotlenku potasu z małą ilością benzenu. Po zakończeniu zmydlania do roztworu dodawano eteru naftowego i nieco wody, powodując rozdział na substancje nie zmydlające się (warstwa węglowodorowa) i zmydlające się (warstwa wodna).

Związki nie ulegające zmydlaniu identyfikowano metodami chromatografii cienkowarstwowej. Przy pomocy standartowego aparatu firmy „Desaga“ (NRF) płytki szklane o wymiarach 20 × 20 cm pokrywano warstwą żelu krzemionkowego o grubości 0,25 mm (Silicagel „G“ nach

T a b e l a 2 ~ T a b l e 2

Wyniki ekstrakcji i zmydlenia

Results of extraction and saponification

Nazwa pyłku Name of pollen	Ilość Amount of pollen	Wydajność ekstraktu Yield of extract	Zawartość części nie zmydlających Contain of non-saponif.	Zawartość części zmydlających Contain of saponif.
	g	%		
<i>Corylus avellana</i>	24,0	6,8	60	40
<i>Alnus incana</i>	9,2	9,3	65	35
<i>Pinus silvestris</i>	17,4	7,3	55	45
<i>Pinus montana</i>	7,2	7,9	55	45
<i>Equisetum arvense</i>	5,0	3,1	75	25
<i>Papaver rhoeas</i>	9,0	12,6	60	40

Stahl, Merck) i наносzono równolegle kilkanaście substancji badanych i wzorcowych, po czym rozwijano jednym lub dwoma (czasem trzema) rozpuszczalnikami. Dla identyfikacji związków lub grup używano substancji wzorcowych firmy Fluka, bądź też preparatów własnych. Jako identyczny uważano związek (grupę), gdy w dwu różnych układach rozpuszczalników szybkość migracji substancji badanej i wzorca były jednakowe, a plamy pod wpływem trzech co najmniej indykatorów zachowywały się identycznie.

Przy rozwijaniu chromatogramów najczęściej używano następujących rozpuszczalników:

- dla oznaczenia węglowodorów: eter naftowy, benzen, n-heptan;
- przy oznaczaniu związków bardziej polarnych:
mieszanina eteru naftowego i chloroformu w stos. obj. 70 : 30,
mieszanina eteru naftowego i etylowego w stos. obj. 70 : 30,
mieszanina eteru naftowego z eterem etylowym i kwasem octowym w stosunku objętościowym 70÷30 : 2.

Najczęściej chromatogram rozwijano mieszaniną bardziej polarną przez 20—30 minut, suszono w temp. 100°C i ponownie rozwijano rozpuszczalnikiem (czy mieszaniną) mniej polarnym, uzyskując wyraźniejszy obraz badanej mieszaniny.

Jako indykatorów używano par jodu, roztworu Rodaminy „B“, kwasu siarkowego lub chromowego z następnym ogrzaniem do 130°C, obserwacji w nadfiolecie. Prócz tych typowych metod stosowano płytki impregnowane undekanem (chromatografia w fazie odwróconej, szczególnie przydatna przy identyfikacji związków bardziej polarnych), płytki nasyczone fluoresceiną itp.

Wyniki jakościowe interpretowano ilościowo porównując wielkość

i intensywność plam. Pomiary takie są, według G ä n s h i r t a (E. S t a h l 1962, str. 47), jedynie ilościowe, lecz próby testowe wykazały dostateczną dokładność. Różnice określano z dokładnością do 5%, przyjmując całość nie zmydlających się związków za 100%.

Fracje ulegające zmydleniu badane były szczegółowo metodami chromatografii gazowej przy użyciu fraktometru f-my Perkin-Elmer typ F6 z jonizującym detektorem płomieniowym. Stosowano kolumny długości 1m, typ SE 30 (Silicone Gum Rubber) i „Q” (Apiezon „L”). Jako gaz nośny służył azot wchodzący z nadciśnieniem 0,5 atm., temperatura kolumn 250°C (blok iniekcyjny ok. 290°C); przy oznaczaniu estrów kwasów tłuszczowych o mniejszej drobinie (do 16 atomów węgla) stosowano programowany wzrost temperatury, poczynając od 170°C, dzięki czemu były one wyraźniej odbierane. Ponieważ posiadano tylko wzorce nasyconych kwasów tłuszczowych, badaniu poddano wyłącznie tę grupę związków.

Do alkalicznego roztworu wodnego dodawano nadmiaru alkoholowego roztworu chlorku wapnia, uzyskując strącenie mydeł wapniowych kwasów tłuszczowych. Osad suszono, proszkowano i ekstrahowano benzenem dla usunięcia zaokludowanych zanieczyszczeń (J. R e i l l y, 1940), po czym ponownie wysuszone mydła estryfikowano bezpośrednio absolutnym metanolem z 10% dodatkiem kwasu siarkowego (D. D o w n i n g, 1960). Surowe estry prowadzono przez kolumny wypełnione tlenkiem

T a b e l a 3 - T a b l e 3

Wyniki analizy składników nie zmydlających się

Results of analysis non-saponifiable fraction

	Corylus avellana	Alnus incana	Pinus silvestris	Pinus montana	Equisetum arvense	Papaver rhoeas
	%					
Węglowodory Hydrocarbons	45	20	20	40	15	25
Ketony Ketons	10	20	-	5	-	5
Monoalkohole Monoalcohols	25	15	55	20	15	20
Sterole Sterols	5	10	5	ślady traces	-	5
Podobne do wit. D ₃ Similar like vitamin D ₃	-	15	10	10	5	10
Diole Dialcohols	-	-	5	5	-	-
Nieznane Unknown	15	20	5	20	65	35

T a b e l a 4 - T a b l e 4
Skład kwasów tłuszczowych
The composition of fatty-acids fraction

Nazwa kwasu Name of acid	Wzór Formula	Alnus incana	Pinus silvestris	Pinus montana	Equisetum arvense	Papaver rhoeas
		%				
Laurynowy	$C_{12}H_{24}O_2$	-	-	-	-	5
Mirystynowy	$C_{14}H_{28}O_2$	-	-	1	-	ślady traces
Palmitynowy	$C_{16}H_{32}O_2$	26	20	29	22	68
Stearynowy	$C_{18}H_{36}O_2$	14	64	26	47	15
Arachidowy	$C_{20}H_{40}O_2$	18	16	40	20	6
Behenowy	$C_{22}H_{44}O_2$	36	-	4	11	2
Trikozanowy	$C_{23}H_{46}O_2$	6	-	-	-	-
Lignocerynowy	$C_{24}H_{48}O_2$	-	-	-	-	3
Cerotynowy	$C_{26}H_{52}O_2$	-	-	-	-	1

U w a g a: Frakcja kwasowa pyłku leszczyny uległa zniszczeniu w czasie estryfikacji.

N o t i e: Fatty-acids fraction of hazel was destroyed during esterification.

glinu (obojętny, prod. firmy Merck), eluując czterochlorkiem węgla. Wyciek zawierał wyłącznie związki dające przy chromatografii gazowej pasma odpowiadające estrom metylowym określonych kwasów tłuszczowych.

Wyniki uzyskane przy pomocy fraktometru F6 interpretowano ilościowo metodą bezpośredniego pomiaru powierzchni pasm wg R. K a i s e r a (1960).

DISKUSJA WYNIKÓW

Grupy związków, wymienione w tabeli 3, w rzeczywistości można scharakteryzować nieco szczegółowiej. I tak frakcja węglowodorowa pyłku *Papaver rhoeas* wykazuje obecność bardzo dużej ilości związków nienasyconych, podczas gdy pyłki *Pinus (silvestris i montana)* oraz *Equisetum arvense* zawierają niemal wyłącznie węglowodory nasycone. Ekstrakt z pyłku *Corylus avellana* zawiera węglowodory nienasycone (40%) oraz nasycone (5%).

Zróznicowanie widać również we frakcji alkoholi jednowodorotlenowych. Pyłek *Papaver rhoeas* zawiera alkohole o drobinie zbliżonej do alkoholu behenylowego (C_{22}) i nienasycone o cechach linaloolu (10 atomów węgla, 2 podwójne wiązania). Pyłek *Corylus avellana* nie zawiera

alkoholi nienasyconych, natomiast wyłącznie alkohole nasycone o 26—30 atomach węgla w cząsteczce. Związki nie zmydlające się z *Pinus silvestris* w przewodzie składają się z alkoholi, przy czym około 50% części nie zmydlających się stanowi alkohol cerylowy (C_{26}). Widoczna tu jest duża różnica z *Pinus montana*, której pyłek zawiera tylko kilkanaście procent alkoholu cerylowego we frakcji nie zmydlającej się. *Alnus incana* zawiera co najmniej dwa alkohole nasycone o drobinach zawierających 26—30 atomów węgla.

We wszystkich ekstraktach — z wyjątkiem *Equisetum arvense* — znaleziono sterole. Ponieważ nie posiadano kompletu wzorców steroli,

Ryc. 1. Kwasy tłuszczowe znalezione w pyłku *Papaver rhoeas*
Fatty acids being found in pollen of *Papaver rhoeas*.

Chromatografia gazowa estrów metylowych prowadzona była na fraktometrze Perkin-Elmer, typ F6 z jonizacyjnym detektorem płomieniowym. Temperatura 250°C, kolumna SE 30 (silicon gum rubber), próbka 0,2 mikrolitra, czas pomiaru 35 minut, czułość 2, przy C_{16} — 8. Estrы metylowe podano z małą domieszką chloroformu. Pomiędzy C_{16} i C_{18} występuje nieznane pasmo (wzorca C_{17} nie posiadano). C_{18} i C_{20} składają się z mieszaniny kwasów normalnych i izo-normalnych

Gas-chromatography of methyl esters on the Fractometer Perkin-Elmer F6 with FID. Temperature: 250°C, column SE 30 (silicon gum rubber), sample 0.2 microliter, time 35 minutes, sensibility 2, by C_{16} sensibility 8. Methyl esters were used with a little amount of chloroform. Between the pics of C_{16} and C_{18} it is found an unknown one standard for C_{17} fatty acid was absent). The pics of C_{18} and C_{20} are composed of mixtures of n- and iso-acids.

trudno jest z całą pewnością stwierdzić ich przynależność jakościową. Niemniej sterole z pyłków przesuwały się na płytkach z szybkością zbliżoną (niemal identyczną) do posiadanych wzorców beta-sitosterolu i stigmasterolu, dając identyczne reakcje wobec indykatorów. Ciekawym spostrzeżeniem jest znalezienie w pyłku *Pinus silvestris* i *Pinus montana* plam odpowiadających betulinie $C_{30}H_{50}(OH)_2$.

W substancjach nie zmydlających się znaleziono też związki mniej polarne od alkoholi, zachowujące się w warunkach chromatografii cienkowarstwowej identycznie z witaminą D_3 (jako wzorzec służył produkt farmaceutyczny). Substancji tych nie znaleziono w pyłku *Corylus avellana*, inne natomiast zawierają je w dosyć dużych ilościach, np. *Alnus incana* około 15%.

Dużą grupę stanowią związki nie dające się określić metodami chromatografii cienkowarstwowej, szczególnie obficie występujące w pyłku *Equisetum arvense* (65% części nie zmydlających się). Związki te metodami bezpośrednimi nie dają się eluować i pozostają w miejscu startu, przy rozwijaniu zaś w fazie odwróconej dają długie smugi (pasma) bez widocznych punktów czy plam. Po rozwinięciu w smugi, związki te bardzo intensywnie barwią się parami jodu, co wskazuje na ich nienasycony charakter.

Kwasy tłuszczowe, wyodrębnione z części zmydlających się, wykazują dużą różnorodność jakościową i ilościową (tabela 4). O ile w przypadku pyłku *Papaver rhoeas* zidentyfikowano 8 kwasów (w tym jeden w nikłej ilości), o tyle pyłek *Pinus silvestris* zawiera tylko trzy, różniąc się też od *Pinus montana* (5 kwasów). Z tabeli 4 widać też, iż każdy gatunek pyłku ma inny kwas tłuszczowy występujący w przewodzie.

W pracy niniejszej nie określono ilości kwasów tłuszczowych w części zmydlającej się, co wynika z metod bezpośredniej estryfikacji, celowej przy nikłych ilościach badanej substancji. O ile jednak można sądzić w sposób pośredni, ekstrakt pyłku *Equisetum arvense* zawiera bardzo niewiele kwasów tłuszczowych, natomiast ekstrakt pyłku *Papaver rhoeas* ma ich najwięcej spośród przebadanych prób.

STRESZCZENIE

Metodami chromatograficznymi zbadano ekstrakt eterowy 6 gatunków pyłku. Stwierdzono iż ekstrakty różnią się jakościowo i ilościowo zarówno przy pyłkach odmian jednej rodziny (*Pinus silvestris* i *Pinus montana*), jak i przy porównaniu szeregu ewolucyjnego *Equisetum* — *Pinus* — *Papaver*. O ile jednak między ekstraktami pięciu gatunków pyłku dają się przeprowadzić pewne porównania, o tyle nie zmydlające się części zarodników *Equisetum arvense* posiadają skład specyficzny.

W porównaniu z danymi literaturowymi (tabela 1) stwierdzono po raz pierwszy, iż w ekstrakcie pyłków występują następujące związki:

kwasy: mirystynowy, arachidowy, behenowy, lignocerynowy i cerotynowy;

alkohole: nienasycone obok nasyconych, alkohole dwuwodorotlenowe (prawdopodobnie betulina);

węglowodory: nasycone obok nienasyconych.

W pracy stwierdzono dużą przydatność metod chromatografii w cienkiej warstwie i chromatografii gazowej do badania ekstraktu eterowego pyłków. Stopień przydatności tych metod uwarunkowany jest posiadaniem dużej ilości wzorców (substancji czystych o znanym składzie).

Zakład Technologii Chemicznej

Drewna i Torfu

Politechniki Gdańskiej

(Wpłynęło dn. 24.I.1964 r.)

SUMMARY

There are many difficulties in the study of etherous extracts of pollen and spores. For example the harvesting of large amounts of pollen, sampling it, complicated methods of chemical analysis according to the standard procedures, etc. provide considerable problems. As a result there are very few papers dealing with the chemistry of pollen. During a period of 40 years, some chemical components of the extracts were reported (Table 1), so far, however, only hazel and corn were more intensively studied.

This paper is a continuation of the studies reported by K. Lubliner-Mianowska (1956) and by the author together with K. Lubliner-Mianowska (1957). The sudden death of docent K. Lubliner-Mianowska towards the end of 1963 has put an end to our cooperation.

Pollen of 6 species was extracted with ethyl ether in the Soxhlet-apparatus for 20 hours. The extract was saponified and divided into a non-saponifiable and a saponifiable fraction. The former was chromatographed with the thin-layer method (Stahl 1962) using an endowment produced by "Desaga" Comp. (West Germany) and silica gel "G" (according to Stahl), produced by Merck, Darmstadt. The spots were compared with standards.

The saponifiable material was treated with alcoholic CaCl_2 to precipitate the calcium soaps of fatty acids (Reilly 1940). After purification the soaps were directly esterified according to the method described by Downing (1960) and prooved in the Perkin-Elmer F6 Fractometer with a FID detector. The columns used were SE 30 (silicone gum rubber) and "Q" (Apiezon "L").

In the pollen extracts the following substances were identified for the first time:

- Myristin, arachidic-, bohenic-, lignoceric-, and cerotinic-, acids;
- non saturated alcohols, together with saturated ones;
- diols, probably betuline;
- non saturated together with saturated hydrocarbons.

Differences were found in the composition of the extracts from different kinds of pollen studied. Particularly the spores of *Equisetum arvense* are very different. It is interesting to compare the relations between the extracts from *Pinus silvestris* and *Pinus montana* pollen. Both the fractions, non saponifiable and saponifiable, are very different (Tables 3 and 4). The usefulness of thin-layer and gas chromatography for the investigation of pollen extracts was established.

I am very much indebted to Professor Dr. Albert Sundgren, head of the Peat and Oil Research Laboratory in Helsinki (Finland) for his benevolent help in the research work and for permitting to use the physico-chemical equipment of his laboratory.

Also I wish to thank the Ford Foundation for supporting this research with a fellowship.

LITERATURA

- Anderson R. J., 1923, Composition of corn pollen. II., J. Biol. Chem. 55:611.
- Barbier M., Hügel M., Lederer E., 1960, Isolation of 24-methylenecholesterol from pollen of various plants, Bull. Soc. chim. biol. 42:91 (wg C. A. 55, 1822 (1961)).
- Barr C. R., Ball C. D., Sell H. M., 1959, The occurrence of higher fatty acids in corn pollen, J. Am. Oil Chem. Soc. 36:303.
- Chauvin R., 1954, Composition chimique du pollen, L'apiculteur, Mai.
- Downing D. T., Kranz Z., Murray K., 1960, Studies in waxes. XIV., Austral. J. Chem. 13(1):80.
- Kaiser R., 1960, „Gas-Chromatographie“, Leipzig.
- Kwiatkowski A., Lubliner-Mianowska K., 1957, Badania składu chemicznego pyłku. II., Badania błon pyłkowych, Acta Soc. Bot. Pol. 26:501.
- Lubliner-Mianowska K., 1956, Badania składu chemicznego pyłku. I. Badania pyłku jako pokarmu pszczoł, Acta Soc. Bot. Pol. 25:409.
- Lunden R., 1954, A short introduction to the literature on pollen chemistry, Svensk Kem. Tidskrift 66:201.
- Nilson M., Ryhage R., v. Sydow E., 1957, Constituents of pollen. II. Long-chain hydrocarbons and alcohols, Acta Chem. Scand. 11:634.
- Reilly J., Wilson J., 1940, The cerotic and carbocerotic acid fraction of Mona wax, Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 22:321.
- Sosa A., Sosa-Bourdouil C., 1952, Étude de quelques constituants chimiques du pollen de *Corylus Avellana* Comptes rendus 235:971.
- Spada A., Coppini D., Monzani C., 1958, Pollen of *Cedrus deodara* and *Cedrus atlantica*, Ann. Chim. (Rome) 48:181 (wg C. A. 53, 12105, 1958).
- Stahl E., 1962, „Dünnschicht-Chromatographie“, Berlin-Göttingen.