

## 64. Über die Lipide der Wuchshefen (*Torula utilis*).

### I. Die Zusammensetzung der acetonlöslichen Lipide

von R. Reichert.

(21. III. 45.)

Von den zahlreichen Veröffentlichungen über die Inhaltsstoffe von Wuchshefen (*Torula utilis*) befassen sich nur sehr wenige mit den Lipiden. In den bisher vorliegenden Arbeiten von *H. Fink* und *F. Just*<sup>1)</sup>, von *A. Bickel*<sup>2)</sup>, sowie von *K. Dirr* und *O. v. Soden*<sup>3)</sup> werden nur sehr allgemeine und voneinander stark abweichende Angaben über den Gesamtgehalt der Hefe an Lipiden gemacht. Während *Fink* und *Just* Werte zwischen 1,68 und 5,95 %, *Bickel* 3 % angeben, findet *Dirr* 6,4 %. Ebenso bewegen sich die Angaben über den Gehalt an Phospholipiden zwischen 0,3 % (*Bickel*) und 4,5 % (*Dirr*). *Dirr's* Angaben werden den tatsächlichen Verhältnissen am ehesten gerecht; *Fink* und *Bickel's* Werte sind entschieden zu niedrig, da bei ihrem Extraktionsverfahren nur ein Bruchteil der Hefelipide erfasst wird<sup>4)</sup>.

Einer eingehenden Untersuchung und Zerlegung in die einzelnen Bestandteile, wie sie von *M. S. Newman*, *R. J. Anderson* und *L. F. Salysbury*<sup>5)</sup> bei den Lipiden der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) durchgeführt wurden, sind die Wuchshefe-Lipide bis heute noch nicht unterworfen worden. Eine Untersuchung erschien um so aussichtsreicher, als eine Prüfung der Kennziffern der acetonlöslichen Lipide auf grössere Unterschiede in der Zusammensetzung der Bierhefe-Lipide und der Lipide von Wuchshefen hinwies.

Als Ausgangsmaterial dienten 8 verschiedene Proben von *Torula utilis* (zum Ausgleich von Schwankungen in der Zusammensetzung der Lipide), welche — nach der Plasmolyse — mittels innenbeheizter Walzentrockner auf einen Trockengehalt von durchschnittlich 93,1 % gebracht waren.

Zur Gewinnung der Gesamtlipide wurde die Hefe mit warmem Methanol und Äther extrahiert, wobei man 6,40 % Lipide (bezogen auf Hefetrockensubstanz) erhielt. Durch Fällung der Phospholipide mit Aceton wurden die Gesamtlipide in 59,9 % acetonlösliche Lipide (3,83 % der Hefetrockensubstanz) und 37,7 % Phosphatide (2,41 % der Hefetrockensubstanz) zerlegt. „Acetonunlösliches Fett“<sup>6)</sup> wurde nicht vorgefunden.

<sup>1)</sup> Bioch. Z. **300**, 84 (1939); Wschr. Brauerei **57**, 227 (1940).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **310**, 355 (1942).

<sup>3)</sup> Bioch. Z. **312**, 263 (1942).

<sup>4)</sup> Vgl. *R. Reichert*, Helv. **27**, 961 (1944).

<sup>5)</sup> J. Biol. Chem. **102**, 219, 229 (1933); **112**, 541 (1936).

<sup>6)</sup> *M. S. Newman* und *R. J. Anderson*, J. Biol. Chem. **102**, 219 (1933).

Die analytischen Konstanten der acetonlöslichen Lipide weichen zum Teil stark von den bei *Newman* und *Anderson*<sup>1)</sup> angegebenen Werten für das Bierhefefett ab. Besser stimmen sie mit den von *K. Tüüfel* und Mitarbeitern<sup>2)</sup> erhaltenen Zahlen überein; letztere sind allerdings in den Gesamtlipoiden bestimmt worden (ohne vorherige Abtrennung der Phospholipide). Auffällig hoch ist die Säurezahl, die auf einen erheblichen Prozentsatz an freien Fettsäuren hinweist; dasselbe gilt von der Jodzahl, was auf einen höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren schliessen lässt. An Unverseifbarem enthalten die acetonlöslichen Lipide 12,3 %.

Der von *Newman* und *Anderson* angegebene Wert von 46,7% für den Gehalt der Bierhefe-Lipide an Unverseifbarem erscheint unverständlich hoch: Die bisher aus dem Unverseifbaren isolierten Substanzen (Sterine, Squalen, Kohlenwasserstoffe usw.) können nur einen Teil dieser 46,7% ausmachen; eingehende Untersuchungen über die restlichen Bestandteile stehen noch aus.

Die übrigen analytischen Konstanten weichen nur wenig von denen des Bierhefefettes ab.

Die Verseifung, die nach der üblichen Methode mit alkoholischer Kalilauge durchgeführt wurde, lieferte neben 77,3% Fettsäuren 12,3% Unverseifbares und 5,8% wasserlösliche Bestandteile.

Die wasserlösliche Fraktion enthält keine Kohlenhydrate; sie besteht aus Glycerin, welches in Form der Tribenzoyl-Verbindung rein erhalten werden konnte.

Aus dem Unverseifbaren konnten Ergosterin (53% des Unverseifbaren, 6,5% der acetonlöslichen Lipide), Squalen (25 bzw. 3,1%) und eine noch nicht beschriebene Verbindung der Formel  $C_{12}H_{24}O$  (10 bzw. 1,2%) isoliert werden. Da letztere keine Doppelbindung enthält, handelt es sich vermutlich um ein Derivat des Cyclohexans. Ausserdem sind im Unverseifbaren noch in geringer Menge andere Sterine, sowie gesättigte cyclische Kohlenwasserstoffe oder Oxykohlenwasserstoffe vorhanden, die jedoch mangels Substanz nicht isoliert werden konnten.

Die Fettsäuren wurden nach dem üblichen Verfahren über die Bleiseifen in „feste“ und „flüssige“ Fettsäuren zerlegt. Die „festen“ Fettsäuren (13,4% der Gesamtfettsäuren) enthielten neben 91% gesättigten noch 9% ungesättigte Fettsäuren; die gesättigten festen Fettsäuren machen demnach 12,2% der Gesamtfettsäuren aus. Die „festen“ Fettsäuren wurden in die Methylester verwandelt und diese durch wiederholte Fraktionierung in binäre Gemische aufgespalten. Aus zwei Fraktionen konnten Palmitinsäure und Stearinsäure isoliert werden; ausserdem sind noch mindestens je eine Säure mit weniger als 16 und eine mit mehr als 18 Kohlenstoffatomen vorhanden,

<sup>1)</sup> *M. S. Newman* und *R. J. Anderson*, *J. Biol. Chem.* **102**, 219 (1933).

<sup>2)</sup> *Z. Unters. Lebensm.* **72**, 394 (1936).

jedoch in so geringer Konzentration, dass sie nicht identifiziert werden konnten. Vermutlich handelt es sich um Laurinsäure (oder Myristinsäure) und Arachinsäure<sup>1)</sup>. Die Zusammensetzung der festen gesättigten Säuren wurde aus den Verseifungsäquivalenten und den Jodzahlen der einzelnen Methylesterfraktionen berechnet.

**Tabelle 1.**  
Zusammensetzung der festen gesättigten Fettsäuren.

	% der gesättigten festen Fettsäuren	% der Gesamtfettsäuren	% des acetonlöslichen Fettes
C <sub>14</sub> -Säuren (und niedrigere) . .	2,3	0,3	0,2
Palmitinsäure . . . . .	64,6	7,9	6,1
Stearinsäure . . . . .	31,2	3,8	2,9
C <sub>20</sub> -Säuren (und höhere) . . .	1,9	0,2	0,2
Gesättigte feste Fettsäuren . .	100,0	12,2	9,4

Die flüssigen (gesättigten und ungesättigten) Fettsäuren machen 87,8 % der Gesamtfettsäuren aus. Sie wurden in die Methylester überführt und diese durch Vakuumdestillation von geringen Verunreinigungen abgetrennt. Ein Teil der Methylester wurde hydriert, der andere fraktioniert destilliert. Bei der Zerlegung der hydrierten Säuren über die Bleiseifen zeigte es sich, dass neben C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Säuren noch flüssige gesättigte Säuren in geringer Menge vorhanden sind. Eine Bestimmung des Molekulargewichtes und eine Analyse des Silbersalzes scheint das Vorliegen einer Valeriansäure, die auch in den Lipoiden der Bierhefe vorkommt<sup>2)</sup>, zu begründen. Eine Reindarstellung der Säure war jedoch infolge der geringen Menge erhaltener Substanz nicht möglich. Höhermolekulare flüssige gesättigte Fettsäuren, wie Tuberculostearinsäure oder Phthionsäure<sup>3)</sup>, sind in den Lipoiden der Torulahefe jedenfalls nicht vorhanden.

Die bei der Hydrierung erhaltenen festen reduzierten Säuren bestanden nur aus Palmitin- und Stearinsäure. Die Palmitinsäure ist aus Palmitölsäure entstanden, welche aus den Methylestern der flüssigen Säuren durch wiederholte Fraktionierung in reinem Zustand isoliert werden konnte.

Die ungesättigten C<sub>18</sub>-Säuren wurden nach dem üblichen Verfahren über die Bromderivate in Linolensäure, Linolsäure und Ölsäure zerlegt.

<sup>1)</sup> Vgl. das Vorkommen von Laurin- und Arachinsäure in der Bierhefe: *A. Neville*, *Biochem. J.* **7**, 341 (1913); *J. S. MacLean* und *E. M. Thomas*, *Biochem. J.* **14**, 483 (1920).

<sup>2)</sup> *J. Weichherz* und *R. Merländer*, *Bioch. Z.* **239**, 21 (1931).

<sup>3)</sup> *R. J. Anderson* und *E. Chargaff*, *J. Biol. Chem.* **85**, 77 (1929).

Bei der Aufarbeitung der ungesättigten Säuren wurde allgemein das Verfahren der kalten Verseifung<sup>1)</sup> mit Vorteil angewendet; bei der Entbromierung der Brom-stearinsäuren z. B. kann man sich dann zwei Vakuumdestillationen ersparen.

Die prozentuale Zusammensetzung der flüssigen Fettsäuren, wie sie sich aus den experimentellen Untersuchungen ergibt, ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

Bei der Berechnung der Zusammensetzung der Fettsäuren wurden eventuell vorliegende Oxysäuren nicht berücksichtigt. Die Acetylzahl des acetonlöslichen Fettes lässt es nicht ausgeschlossen erscheinen, dass auch im Hefefett Oxysäuren enthalten sind. Da sich jedoch bei der Aufarbeitung hierfür an keiner Stelle ein Hinweis finden liess, ist anzunehmen, dass die Acetylzahl z. T. von den Sterinen herrührt (Ergosterin hat eine theoretische Acetylzahl von 128), zum andern Teil von Mono- bzw. Diglyceriden.

**Tabelle 2.**  
Zusammensetzung der flüssigen Fettsäuren.

	% der flüssigen Fettsäuren	% der Gesamtfettsäuren	% der acetonlöslichen Lipide
Linolensäure . . . . .	5,0	4,4	3,4
Linolsäure . . . . .	56,7	49,7	38,4
Ölsäure . . . . .	24,5	21,5	16,7
Ungesättigte C <sub>18</sub> -Säuren . . .	86,2	75,6	58,5
Palmitölsäure . . . . .	8,6	7,6	5,9
Ungesättigte Fettsäuren . . .	94,8	83,2	64,4
Gesättigte flüssige Fettsäuren	5,2	4,6	3,5
Flüssige Fettsäuren . . . . .	100,0	87,8	67,9

### Experimenteller Teil.

Allgemeine Grundvoraussetzung ist, dass man möglichst unter Ausschluss von Luftsauerstoff und Licht arbeitet. Sämtliche Lösungsmittel werden vor dem Gebrauch frisch destilliert und mit Kohlendioxyd oder Stickstoff gesättigt. Diese und weitere Schutzmassnahmen, die mit Rücksicht auf die leichte Zersetzlichkeit zahlreicher Bestandteile getroffen wurden, sind selbstverständlich und werden im folgenden — zur Abkürzung der Abhandlung — nicht mehr besonders erwähnt.

#### Extraktion der Gesamtlipide.

1200 g feinst gepulverte Trockenhefe (93,1% Trockengehalt) werden mit 3,6 Liter Methanol 20 Stunden bei 40° geschüttelt. Die Lösung wird scharf abgesaugt, der Rückstand nochmals 20 Stunden mit 3 Liter Methanol behandelt und erneut abgesaugt. Hierauf erfolgt eine Extraktion des Rückstandes mit 3 Liter Äther. Die beiden Methanolextrakte werden vereinigt, im Vakuum bei 40° auf 250 cm<sup>3</sup> eingeeengt, mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung versetzt, und die Suspension wird mit absolutem Äther erschöpfend extrahiert. Die beiden Ätherextrakte werden vereinigt, nach dem Trocknen über Natriumsulfat filtriert und abgedampft. Aus 8 verschiedenen Hefeproben, insgesamt 19,25 kg, wurden 1147 g Gesamtlipide erhalten, das sind 6,40% der Hefetrockensubstanz.

<sup>1)</sup> A. Rollett, Z. physiol. Ch. 62, 413 (1909).

Zerlegung der Gesamtlipoide.

1000 g rohe Lipoide werden in 1,2 Liter warmem absolutem Äther gelöst und nach dem Abkühlen mit 3,6 Liter absolutem Aceton versetzt, worauf sich die Phosphatide als ein braunes Öl abscheiden. Nach dreistündigem Stehen auf Eis ist die überstehende Lösung ganz klar und kann dekantiert werden. Die rohen Phospholipoide werden so oft aus Äther-Aceton umgefällt, bis sie sich nicht mehr als Öl, sondern in Form von schwach gelblich gefärbten Flocken ausscheiden (ca. achtmal), dann noch drei weitere Male. Sie wiegen nach dem Trocknen über konz. Schwefelsäure 377 g und werden für spätere Untersuchungen in einem braunen Exsikkator über Phosphorpentoxyd aufbewahrt. Die beim Umfällen anfallenden Mutterlaugen geben beim Eindampfen 38 g eines braunen Öles von der Jodzahl (*Hanuš*) 109. Es wird mit dem acetonlöslichen Fett vereinigt.

Die bei der Fällung der Phosphatide erhaltene Lösung der acetonlöslichen Lipoide wird auf das halbe Volumen eingeeengt und auf 0° abgekühlt. Ausser einer geringen Menge rohen Ergosterins wird kein „acetonunlösliches Fett“<sup>1)</sup> ausgeschieden. Die Lösung wird vollständig zur Trockne gebracht, wobei 561 g acetonlösliche Lipoide in Form eines hellbraunen Öles anfallen.

Die Kennziffern der acetonlöslichen Lipoide.

Die Kennziffern werden nach den üblichen Methoden<sup>2)</sup> bestimmt. Sie sind in der Tabelle 3 zusammengestellt; zum Vergleich sind die von *Newman* und *Anderson*<sup>1)</sup>, sowie die von *K. Täufel*<sup>3)</sup> gefundenen Werte für die Lipoide von *Saccharomyces cerevisiae* angegeben. *Newman* und *Anderson*'s Werte beziehen sich auf die acetonlöslichen Lipoide, *Täufel*'s Werte auf die Gesamtlipoide der Bierhefe.

Tabelle 3.  
Kennziffern der acetonlöslichen Lipoide.

	Torula utilis	Saccharomyces cerevisiae	
		nach Newman und Anderson	nach Täufel
Verseifungszahl . . . . .	180,7	109,6	156,6
Säurezahl . . . . .	102,4	28,6	108,4
Esterzahl . . . . .	78,3	81,0	48,2
Jodzahl ( <i>Hanuš</i> ) . . . . .	120,5	61,3	130,4
Reichert-Meissl-Zahl . . . . .	6,1	2,3	7,4
Polenske-Zahl . . . . .	0,5	0,5	3,4
Acetylzahl . . . . .	19,8	20,2	nicht bestimmt
Fettsäuren in % . . . . .	77,3	47,4	66,4
Unverseifbares in % . . . . .	12,3	46,7	19,6

Verseifung der acetonlöslichen Lipoide.

120 g acetonlösliche Lipoide werden in 720 cm<sup>3</sup> Alkohol und 120 cm<sup>3</sup> 50-proz. wässriger Kalilauge gelöst, 6 Stunden am Rückfluss zum Sieden erhitzt, im Vakuum auf 300 cm<sup>3</sup> eingeeengt und mit 600 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt. Dann wird sechsmal mit je 200 cm<sup>3</sup> Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherextrakte zweimal mit je 100 cm<sup>3</sup> 0,5-proz. Natronlauge und einmal mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen. Die Washwässer werden zur Seifenlösung hinzugefügt.

<sup>1)</sup> *M. S. Newman* und *R. J. Anderson*, *J. Biol. Chem.* **102**, 219 (1933).

<sup>2)</sup> Official and Tentative Methods of Analyses of the Association of Official Agricultural Chemists, Washington 1930; *Lunge-Berl*, Chemisch-technische Untersuchungsmethoden, 7. Aufl., Bd. III, S. 558, Berlin 1923.

<sup>3)</sup> *Z. Unters. Lebensm.* **72**, 394 (1936).

Die das Unverseifbare enthaltende goldgelb gefärbte Ätherlösung wird nach dem Trocknen über Natriumsulfat eingedampft; nach dem Trocknen im Exsikkator erhält man 14,8 g (12,3%) einer fast farblosen, teilweise krystallinen Substanz.

Zur Isolierung der Fettsäuren wird die Seifenlösung mit Salzsäure angesäuert und mit Äther erschöpfend ausgezogen. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wird die ätherische Lösung über Natriumsulfat getrocknet und abgedampft. Die Fettsäuren bleiben in Form eines beweglichen braunen Öles zurück, welches nach dem Trocknen 92,7 g wiegt (77,3% der acetonlöslichen Lipode).

Insgesamt wurden 420 g acetonlösliches Fett aufgearbeitet und in 41,9 g Unverseifbares und 319 g Fettsäuren zerlegt.

#### Wasserlösliche Bestandteile.

Die (aus 120 g acetonlöslichen Lipoiden erhaltene) wässrige Lösung wird im Vakuum auf 100 cm<sup>3</sup> eingengt und nach Entfernung des ausgeschiedenen Kaliumchlorids vollständig zur Trockne gebracht. Nach dreimaligem Abdampfen mit je 20 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol wird der Rückstand dreimal mit je 20 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol ausgekocht, aus den vereinigten alkoholischen Auszügen das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. Er bildet ein braunes Öl vom Gewicht 6,9 g (5,8% der acetonlöslichen Lipode), welches in der Hauptsache aus rohem Glycerin besteht (Acrolein-geruch beim Erhitzen mit Kaliumhydrogensulfat). Kohlenhydrate sind nicht vorhanden, wie der negative Ausfall der *Molisch*- und *Fehling*-Probe zeigt. Das rohe Glycerin wird im Vakuum destilliert, wobei sich ein Teil zersetzt. Die bei 12 mm Hg zwischen 170 und 180° übergehende Fraktion bildet ein gelbes Öl, welches 4,8 g wiegt. 2 g davon werden in 16 g Pyridin gelöst und 9 g Benzoylchlorid unter Kühlung zugetropft. Das Tribenzoat scheidet sich alsbald krystallin aus; es schmilzt nach dem Aufarbeiten<sup>1)</sup> und dreimaligem Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol scharf bei 75,5° (Mischprobe ebenso).

3,602 mg Subst. gaben 9,417 mg CO<sub>2</sub> und 1,584 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	Ber. C	71,26	H	4,99%
	Gef. „	71,30	„	4,92%

#### Zerlegung des Unverseifbaren.

Die unverseifbaren Bestandteile bilden eine farblose, mit gelblichen Schmierem durchsetzte Krystallmasse von der Jodzahl 188. Der Ergosterin-gehalt wurde kolorimetrisch<sup>2)</sup> zu 53% bestimmt.

20 g werden mit 100 cm<sup>3</sup> eiskaltem Petroläther (Sdp. 30—50°) angerieben, wobei die Schmierem glatt in Lösung gehen und farblose Krystalle ungelöst bleiben. Die Krystalle werden abzentrifugiert und zweimal mit je 30 cm<sup>3</sup> kaltem Petroläther gewaschen.

#### Squalen.

Die Petrolätherlösungen werden vereinigt und hinterlassen nach dem Abdampfen 9,6 g eines braungelben Öles, welches mit 10 cm<sup>3</sup> Benzol aufgenommen und an Aluminiumoxyd adsorbiert wird (Schichtlänge 20 cm, Querschnitt 1,3 cm Ø). Beim anschliessenden Eluieren mit dreimal je 10 cm<sup>3</sup> Benzol werden die drei Eluate, deren intensive hellblaue Fluoreszenz im ultravioletten Licht bereits auf Squalen hinweist, gesondert aufgefangen und nach dem Abdampfen auf dem Wasserbad untersucht:

Eluat 1	1,8 g	Jodzahl 319	keine Fällung mit Digitonin
Eluat 2	2,9 g	Jodzahl 275	geringe Fällung mit Digitonin
Eluat 3	1,7 g	Jodzahl 229	Fällung mit Digitonin.

Aus Eluat 1, das zum grössten Teil aus Squalen besteht (theoret. Jodzahl des Squalens = 371) und keine Sterine mehr enthält, wird Squalen als Hexahydrochlorid wie folgt isoliert: Man löst 1,00 g Eluat 1 in 25 cm<sup>3</sup> bei - 5° mit Chlorwasserstoff gesättigtem

<sup>1)</sup> A. Einhorn und F. Hollandt, A. **301**, 101 (1898).

<sup>2)</sup> A. Heiduschka und H. Lindner, Z. physiol. Ch. **181**, 20 (1929); F. Bilger u. Mitarb., Mikroch. **15**, 119 (1934).

absolutem Aceton und leitet 3 Stunden lang bei  $-5^{\circ}$  Chlorwasserstoffgas ein. Die Lösung färbt sich alsbald grünlich schwarz und es scheiden sich allmählich farblose Krystalle aus, die nach 24-stündigem Stehen bei  $0^{\circ}$  abgesaugt werden: 0,67 g. Schmelzpunkt nach dreimaligem Umkrystallisieren aus absolutem Aceton  $136^{\circ}$ . Mischprobe ebenso.

11,5214 mg Subst. gaben 15,7240 mg AgCl  
 $C_{30}H_{56}Cl_8$  Ber. Cl 33,81 Gef. Cl 33,75%

#### Ergosterin.

Der in Petroläther unlösliche Anteil des Unverseifbaren (10,2 g) wird in heissem Alkohol gelöst, worauf sich beim Abkühlen das Ergosterin in Form der charakteristischen krystallinen Blättchen abscheidet. Schmelzpunkt nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol und aus Äther  $163^{\circ}$  (Mischprobe ebenso).

4,4971 mg Subst. gaben 13,9211 mg  $CO_2$  und 4,5003 mg  $H_2O$   
 $C_{28}H_{44}O$  Ber. C 84,77 H 11,19%  
 Gef. „ 84,42 „ 11,20%

Aus der Mutterlauge der ersten Ergosterinfällung erhält man beim Einengen noch 0,6 g rohes Ergosterin; beim völligen Abdampfen bleiben 1,0 g eines mit Krystallen durchsetzten Breies zurück. Die *Liebermann-Burchard*-Reaktion weist auf Kryptosterin hin<sup>1)</sup>. Wegen der geringen Menge der zur Verfügung stehenden Substanz konnte indessen eine Isolierung nicht in Angriff genommen werden.

#### Verbindung $C_{12}H_{24}O$ .

Zur Zerstörung der Sterine und des Squalens wird die von *Newman* und *Anderson*<sup>2)</sup> modifizierte *Liebermann-Burchard*-Reaktion nach *A. Windaus* und *C. Resau*<sup>3)</sup> verwendet.

8,4 g des Unverseifbaren werden in einem Scheidetrichter in 90 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff gelöst, 17 cm<sup>3</sup> Essigsäure-anhydrid hinzugefügt und dann 5 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure unter Kühlung zugetropft. Nach halbstündigem Stehen wird das schwarzgrüne Reaktionsgemisch mit 150 cm<sup>3</sup> Eiswasser zerlegt, der braun gefärbte Tetrachlorkohlenstoff abgelassen und die Reaktion noch einmal wiederholt, worauf die Tetrachlorkohlenstoffschicht nur noch schwach gelb gefärbt ist. Sie wird mit verdünnter Natronlauge und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und abgedampft. Es bleiben 2,41 g eines gelben Öles zurück, welches gesättigt ist ( $J. Z. = 0$ ) und keine Sterine mehr enthält.

2,0 g dieses Öles werden im Vakuum bei 3 mm Hg destilliert.

Fraktion 1 Sdp. 135—150°	0,41 g
Fraktion 2 Sdp. 150—160°	1,02 g
Fraktion 3 Sdp. 160—210°	0,21 g
Fraktion 4 Rückstand	0,26 g

Fraktion 2 liefert bei erneuter Destillation 0,58 g eines bei 3 mm Hg zwischen 151 und 154° übergehenden farblosen Öles, dessen Summenformel sich aus den Analysendaten zu  $C_{12}H_{24}O$  errechnet, das indessen nicht identifiziert werden konnte. Die Verbindung addiert kein Brom; es handelt sich offenbar um eine gesättigte monocyclische Verbindung, vermutlich um ein Derivat des Cyclohexans.  $n_D^{20} = 1,4334$ .

0,601 mg Subst. gaben mit 15,277 mg Campher (Smp.  $179,0^{\circ}$ ;  $K/1000 = 40,45^{\circ}$ ) eine Schmelzpunktserniedrigung von  $8,7^{\circ}$ .

3,282 mg Subst. gaben 9,364 mg  $CO_2$  und 3,993 mg  $H_2O$   
 $C_{12}H_{24}O$  Ber. Mol.-Gew. 184,2 C 78,18 H 13,13%  
 Gef. „ 182,9 „ 77,81 „ 13,61%

<sup>1)</sup> *H. Wieland* und *W. M. Stanley*, *A.* **489**, 31 (1931); *W. W. Oppel* und *A. A. Grigorjewa*, *Biochimija* **3**, 175 (1938).

<sup>2)</sup> *J. Biol. Chem.* **102**, 219 (1933).

<sup>3)</sup> *B.* **48**, 851 (1915).

### Trennung der „festen“ von den flüssigen Fettsäuren.

Die Fettsäuren bilden ein dunkelbraunes Öl von der Jodzahl 148. 40,0 g werden in 75 cm<sup>3</sup> Alkohol gelöst und mit 1,5-proz. Kalilauge neutralisiert. Die Lösung wird in 240 cm<sup>3</sup> siedende 20-proz. Blei(II)-acetat-Lösung eingegossen, das Gemisch 5 Minuten im Sieden gehalten und dann unter ständigem Umschwenken abgekühlt. Nach dem Abgiessen der klaren wässrigen Lösung. Waschen des Niederschlages mit warmem Wasser und Entfernen des anhaftenden Wassers durch Abtropfen und Abtupfen mit einem Filterpapierröllchen wird der Niederschlag mit 250 cm<sup>3</sup> absolutem Äther 5 Minuten geschüttelt und eine halbe Stunde am Rückfluss gekocht. Die Suspension wird 20 Stunden lang auf 0° gehalten, der ausgeschiedene Niederschlag abgesaugt, mit absolutem Äther gut ausgewaschen, in einen Scheidetrichter überführt, dort in 100 cm<sup>3</sup> Äther suspendiert und mit 60 cm<sup>3</sup> 25-proz. Salzsäure zerlegt. Die ätherische Lösung der „festen“ Fettsäuren wird dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und abgedampft. Es bleiben 5,2 g „feste“ Fettsäuren zurück (13,4% der Gesamtfettsäuren).

Das Filtrat, welches die Bleisalze der flüssigen Säuren enthält, wird in einem Scheidetrichter mit 250 cm<sup>3</sup> 10-proz. Salzsäure geschüttelt. Die ätherische Lösung der flüssigen Säuren wird nach dem Waschen und Trocknen über Natriumsulfat abgedampft, wobei man 33,7 g flüssige Fettsäuren (86,6% der Fettsäuren) erhält.

Insgesamt wurden 280 g rohe Fettsäuren aufgearbeitet und in 35 g „feste“ und 238 g flüssige Säuren zerlegt.

### Methylierung der „festen“ Fettsäuren.

Die „festen“ Fettsäuren bilden eine farblose Krystallmasse, welche ab 51° sintert und bei 53—54° schmilzt. Jodzahl = 19. 0,4634 g Subst. verbrauchten 17,55 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH, entsprechend einem mittleren Molekulargewicht von 264.

Aus der Jodzahl von 19 geht hervor, dass die „festen“ Fettsäuren noch ca. 10% ungesättigte Fettsäuren enthalten.

10,0 g werden in 130 cm<sup>3</sup> absolutem Methanol gelöst, 1½ Stunden mit Salzsäuregas behandelt, dann noch 4 Stunden am Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Abdampfen des grössten Teiles Methanol wird mit viel Wasser verdünnt und ausgeäthert, die ätherische Lösung zweimal mit 0,5-n. Natronlauge und einmal mit Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, der Äther abgedampft und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Ausbeute 10,15 g.

### Fraktionierung der Methylester.

Die Methylester der „festen“ Fettsäuren bilden eine farblose, weiche Krystallmasse, die sich bei 30° vollständig verflüssigt. Die Fraktionierung erfolgte im Vakuum von 1 mm Hg. Die Resultate sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Aus der Fraktion 22 erhält man nach erneuter Rektifikation reinen Palmitinsäuremethylester: Sdp.<sub>1 mm</sub> 130—132°. Smp. 27—28°.  $n_D^{55} = 1,4262$ .

Nach dem Verseifen mit 3-proz. alkoholischer Kalilauge und Umkrystallisieren aus Alkohol wird Palmitinsäure vom Smp. 62° erhalten. (Mischprobe ebenso.)

0,4508 g Subst. verbrauchten 17,55 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
 $C_{16}H_{32}O_2$  Ber. Mol.-Gew. 256 Gef. Mol.-Gew. 257

Aus der Fraktion 32 wird die Stearinsäure nach erneuter Rektifikation des Esters gewonnen. Der Ester geht bei 160—162° über. Smp. 38—39°.  $n_D^{55} = 1,4301$ . Nach dem Verseifen und Umkrystallisieren aus 90-proz. Alkohol erhält man reine Stearinsäure. Smp. 71° (Mischprobe ebenso).

0,3106 g Subst. verbrauchten 10,90 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
 $C_{18}H_{36}O_2$  Ber. Mol.-Gew. 284 Gef. Mol.-Gew. 285



**Tabelle 4.**

Fraktionierung der Methyltester der „festen“ Fettsäuren.

Nr.	Sdp. 1 mm ° C	Ge- wicht g	Ver- seif- Äqu.	Jod- zahl	C <sub>&lt;18</sub> -Säuren		C <sub>16</sub> -Säuren		C <sub>18</sub> -Säuren		C <sub>&gt;18</sub> -Säuren		Insg. Säuren		
					total g	unges. g	total g	unges. g	total g	unges. g	total g	unges. g	total g	unges. g	ges. g
Primäre Fraktionen:															
1	120—125	0,60	259,6	0	0,21	0,21	—	0,39	0,39	—	—	—	—	0,60	—
2	125—140	6,19	274,3	9,1	—	—	5,23	4,93	0,30	0,96	0,91	0,05	—	5,84	0,35
3	140—165	2,52	291,1	24,9	—	—	0,60	0,51	0,09	1,92	1,62	0,30	—	2,13	0,39
4	Rückstand	0,61	307,8	39,7	—	—	—	—	—	0,39	0,29	0,10	0,22	0,46	0,15
		9,92			0,21	0,21	6,22	5,83	0,39	3,27	2,82	0,45	0,22	9,03	0,89
Sekundäre Fraktionen:															
21	120—129	0,38	249,1	0	0,28	0,28	—	0,10	0,10	—	—	—	—	0,38	—
22	129—133	4,42	272,9	3,6	—	—	3,97	3,88	0,09	0,45	0,44	0,01	—	4,32	0,10
23	133—140	0,96	278,9	5,9	—	—	0,69	0,66	0,03	0,27	0,26	0,01	—	0,92	0,04
24	Rückstand	0,21	292,2	*	—	—	0,04	*	*	0,17	*	*	—	*	*
31	130—160	0,33	283,2	*	—	—	0,17	*	*	0,16	*	*	—	*	*
32	160—163	1,76	296,1	20,2	—	—	0,13	0,11	0,02	1,63	1,42	0,21	—	1,53	0,23
33	Rückstand	0,30	313,1	*	—	—	—	—	—	0,13	*	*	0,17	*	*

\* Von den Fraktionen 24, 31 und 33 konnte lediglich eine Bestimmung des Verseifungsäquivalentes durchgeführt werden; auf die Bestimmung der Jodzahl musste mangels Substanz verzichtet werden.

### Methylierung der flüssigen Fettsäuren.

Die flüssigen Fettsäuren bilden ein dunkelbraunes, leicht bewegliches Öl von der Jodzahl 145.

50 g werden mit 600 cm<sup>3</sup> 3-proz. methanolischer Salzsäure 4 Stunden am Rückfluss gekocht, die Ester nach dem Abkühlen, Abdampfen des Methanols und Verdünnen mit Wasser ausgeäthert und durch Schütteln mit 0,5-n. Natronlauge von Spuren nicht umgesetzter Säuren befreit. Nach dem Abdampfen des Äthers und Trocknen des Rückstandes erhält man 50,2 g Ester. Die gesamten Ester werden, ohne zu fraktionieren, im Vakuum bei 1 mm Hg unter Kohlendioxyd überdestilliert, wobei man 48,8 g eines hellgelben Öles erhält: Jodzahl = 152. Der Rückstand, eine schwarze Schmiere, die aus polymerisierten Fettsäuren besteht, wiegt 1,08 g und ist nicht weiter untersucht worden.

### Hydrierung der Ester der flüssigen Fettsäuren.

17,0 g Ester werden in 200 cm<sup>3</sup> 96-proz. Alkohol gelöst und mit Platin aus 150 mg PtO<sub>2</sub> hydriert. Nach 4 Stunden ist die Hydrierung beendet. Wasserstoffverbrauch: 2635 cm<sup>3</sup> (15°, 716 mm), das ist die aus der Jodzahl berechnete theoretische Menge. Die hydrierten Ester wiegen nach dem Abdampfen des Lösungsmittels 17,0 g. Smp. 33 bis 35°,  $n_D^{55} = 1,4296$ . Jodzahl = 1.

### Feste reduzierte Fettsäuren.

13,18 g hydrierte Ester werden mit alkoholischer Kalilauge wie üblich verseift, wobei man 12,1 g freie Säuren vom Smp. 63—65° erhält. 8,88 g dieses Säuregemisches werden dann, wie oben beschrieben, nach dem Bleiseifenverfahren in 7,98 g feste reduzierte Säuren und 0,44 g flüssige gesättigte Fettsäuren zerlegt.

Zunächst wird das mittlere Molekulargewicht der festen reduzierten Fettsäuren bestimmt:

0,4491 g Subst. verbrauchten 15,95 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
Gef. Mol.-Gew. 281,5

Wie die nachfolgende Vakuumdestillation zeigt, bestehen die festen reduzierten Säuren lediglich aus Palmitin- und Stearinsäure; aus dem mittleren Molekulargewicht lässt sich dann die prozentuale Zusammensetzung der Säuren zu 9,1% Palmitinsäure und 90,9% Stearinsäure berechnen. Beide Säuren können in Substanz isoliert werden: Nach mehrfacher sorgfältiger Fraktionierung im Vakuum von 1 mm erhält man aus 6,52 g Säuregemisch 0,35 g Palmitinsäure. Schmelzpunkt nach Umkrystallisieren aus Alkohol 62° (Mischprobe ebenso).

0,3003 g Subst. verbrauchten 11,72 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> Ber. Mol.-Gew. 256 Gef. Mol.-Gew. 256

Aus den höher siedenden Fraktionen erhält man nach mehrmaligem Fraktionieren und Umkrystallisieren aus 90-proz. Alkohol Stearinsäure. Smp. 70—71° (Mischprobe ebenso).

0,5081 g Subst. verbrauchten 17,95 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> Ber. Mol.-Gew. 284 Gef. Mol.-Gew. 283

Andere feste reduzierte Säuren sind nicht nachweisbar.

### Flüssige gesättigte Fettsäuren.

Die gesättigten, flüssigen Fettsäuren (5,2% der gesamten flüssigen Säuren) konnten mangels Substanz nicht weiter in ihre Bestandteile zerlegt werden.

0,40 g werden einer Destillation mit Wasserdampf unterworfen; dabei können 0,35 g aus dem Destillat zurückgewonnen werden. Die Bestimmung des Molekulargewichtes und die Analyse des hergestellten Silbersalzes machen das Vorliegen einer Valeriansäure wahrscheinlich.

0,2907 g Subst. verbrauchten 27,45 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
31,25 mg Subst. gaben 21,58 mg AgCl  
C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> Ber. Mol.-Gew. 102,1 C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>Ag Ber. Ag 51,63%  
Gef. „ 105,9 Gef. „ 51,97%

Fraktionierung der Methylester der flüssigen Fettsäuren.  
Palmitölsäure.

29,0 g Methylester der flüssigen Säuren werden einer mehrmaligen Fraktionierung im Vakuum von 1 mm Hg (CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) unterworfen. Hierbei erhält man schliesslich 1,8 g einer Fraktion, die bei 120—122° übergeht.  $n_D^{20} = 1,4513$ . Nach dem kalten Verseifen (wie unten beschrieben) und Umkrystallisieren aus Petroläther (Abkühlen auf -20°) erhält man reine Palmitölsäure. Smp. 32,5—33°.

0,4241 g Subst. verbrauchten	16,80 cm <sup>3</sup> 0,1-n. KOH
5,760 mg Subst. gaben	15,920 mg CO <sub>2</sub> und 6,179 mg H <sub>2</sub> O
0,2129 g Subst. verbrauchten	16,6 cm <sup>3</sup> 0,1-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Ber. Mol.-Gew. 254 C 75,52 H 11,89% J. Z. 99,8
Gef. „	252 „ 75,38 „ 12,00% „ 98,9

Kalte Verseifung der Methylester der ungesättigten C<sub>18</sub>-Säuren<sup>1)</sup>.

Die über 150° (1 mm Hg) siedenden Anteile der flüssigen Methylester werden vereinigt und wie folgt verseift:

25,0 g werden mit 250 cm<sup>3</sup> 5-proz. alkoholischer Natronlauge über Nacht unter Stickstoff stehen gelassen. Die entstandene Gallerte wird mit 250 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und zweimal mit je 100 cm<sup>3</sup> Petroläther (Sdp. 30—50°) ausgeschüttelt. Die Seifenlösung wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und dreimal mit je 150 cm<sup>3</sup> Petroläther ausgeschüttelt, der Petroläther mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und abgedampft. Nach dem Trocknen bleiben 22,79 g flüssige Säuren als hellgelbes Öl zurück. J. Z. = 157.

0,5964 g Subst. verbrauchten	21,41 cm <sup>3</sup> 0,1-n. KOH
Gef. Mol.-Gew.	279

Wie aus dem durchschnittlichen Molekulargewicht hervorgeht, liegen lediglich C<sub>18</sub>-Säuren vor.

Bromierung der ungesättigten C<sub>18</sub>-Säuren.

22,0 g ungesättigte C<sub>18</sub>-Säuren werden in 180 cm<sup>3</sup> absolutem Äther gelöst, auf -10° abgekühlt und 8 cm<sup>3</sup> Brom im Verlaufe einer halben Stunde zutropft. Nach dreistündigem Stehen bei -10° wird der Niederschlag abgesaugt, mit kaltem Äther gewaschen und getrocknet: 3,43 g 9, 10, 12, 13, 15, 16-Hexabrom-stearinsäure (entsprechend 1,26 g Linolensäure). Smp. 175—177°, nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Benzol 180°. Die rohe Hexabrom-stearinsäure löst sich in heissem Benzol ohne Rückstand; es liegen also keine Octobromderivate vor.

0,8022 g Subst. verbrauchten	10,65 cm <sup>3</sup> 0,1-n. KOH
70,61 mg Subst. gaben	105,00 mg AgBr
C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> Br <sub>6</sub>	Ber. Mol.-Gew. 758 Br 63,28%
Gef. „	753 „ 63,28%

Aus dem Filtrat der Hexabrom-stearinsäurefällung wird der grösste Teil des Äthers abgedampft, 100 cm<sup>3</sup> Petroläther (Sdp. 30—50°) zugegeben und die Lösung zwei Stunden lang auf -21° abgekühlt. Nach dem Filtrieren und Trocknen erhält man 12,72 g 9, 10, 12, 13-Tetrabrom-stearinsäure (Smp. 107—108°), entsprechend 5,94 g Linolensäure. Aus der Mutterlauge können nach Einengen und Abkühlen noch 0,21 g Tetrabrom-stearinsäure (entsprechend 0,09 g Linolensäure) gewonnen werden. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Petroläther-Äthergemischen und aus Äther schmilzt das Präparat bei 114°.

0,7229 g Subst. verbrauchten	12,11 cm <sup>3</sup> 0,1-n. KOH
85,90 mg Subst. gaben	106,90 mg AgBr
C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> Br <sub>4</sub>	Ber. Mol.-Gew. 600 Br 53,29%
Gef. „	598 „ 52,96%

Die Mutterlauge der Tetrabrom-stearinsäurefällung wiegen nach dem Abdampfen und Trocknen 27,17 g. Der Bromgehalt wird bestimmt: 74,61 mg Subst. gaben 82,72 mg

<sup>1)</sup> Vgl. A. Rollett, Z. physiol. Ch. 62, 413 (1909).

AgBr, gef. 47,21% Br. Hieraus errechnet sich die Zusammensetzung des binären Gemisches zu 64,6% Tetrabrom-stearinsäure (17,55 g, entsprechend 8,18 g Linolsäure) und 35,4% Dibrom-stearinsäure (9,62 g, entsprechend 6,14 g Ölsäure). Die ungesättigten  $C_{18}$ -Säuren setzen sich nach diesen Ergebnissen aus 5,8% Linolensäure, 65,8% Linolsäure und 28,4% Ölsäure zusammen.

Zur Reindarstellung der Dibrom-stearinsäure werden die Mutterlaugen der Tetrabromidfällung in 70 cm<sup>3</sup> Petroläther gelöst und in Zentrifugengläschen portionsweise auf -80° abgekühlt. Das ausfallende Dibromid wird kurz abzentrifugiert, die überstehende Lösung abgegossen, der Rückstand 15mal mit frischem Petroläther aufgewirbelt und nach dem Abkühlen auf -80° wieder zentrifugiert. Schliesslich werden 4,0 g eines Öles erhalten, das nach mehrfachem Unterkühlen und längerem Stehen bei 0° zu einer zähen, mit Krystallen durchsetzten Masse erstarrt; nach 4 Wochen ist es gänzlich durchkrystallisiert. Die Analyse erweist die Identität mit 9,10-Dibrom-stearinsäure.  $n_D^{30} = 1,4951$ .

0,6932 g Subst. verbrauchten 15,55 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
 93,71 mg Subst. gaben 80,77 mg AgBr  
 $C_{18}H_{34}O_2Br_2$  Ber. Mol.-Gew. 442 Br 36,15%  
 Gef. „ 445 „ 36,68%

Linolensäure.

2,0 g Hexabrom-stearinsäure werden in 10 cm<sup>3</sup> heissem 96-proz. Alkohol suspendiert, 2 Tropfen konz. Salzsäure zugegeben und 3,0 g Zinkstaub allmählich eingetragen. Das Reaktionsgemisch wird 1 ½ Stunden am Rückfluss gekocht, von unverbrauchtem Zink abfiltriert und das Filtrat mit Salzsäure angesäuert. Nach Zugabe von 15 cm<sup>3</sup> Wasser wird mit Petroläther ausgeschüttelt, der Petrolätherextrakt mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand, 0,7 g, wird kalt verseift und aufgearbeitet, wie oben beschrieben. Nach dem Destillieren im Hochvakuum erhält man 0,58 g wasserhelle Linolsäure. Smp. -15°,  $n_D^{20} = 1,4797$ .

0,4290 g Subst. verbrauchten 15,38 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
 0,0961 g Subst. verbrauchten 20,22 cm<sup>3</sup> 0,1-n.  $Na_2S_2O_3$   
 $C_{18}H_{30}O_2$  Ber. Mol.-Gew. 278 J. Z. 274  
 Gef. „ 279 „ 267

Linolsäure.

10 g Tetrabrom-stearinsäure werden allmählich in 90 cm<sup>3</sup> siedend heissen Alkohol, der 12 g Zinkstaub enthält, eingetragen. Ab und zu werden einige Tropfen konz. wässriger Salzsäure zugegeben. Das Gemisch wird dann noch eine halbe Stunde am Rückfluss gekocht. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei der Linolensäure. Nach Destillation im Hochvakuum erhält man 4,2 g farblose Linolsäure. Smp. -8 bis -7°.  $n_D^{20} = 1,4690$ .

0,4961 g Subst. verbrauchten 17,71 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
 0,1105 g Subst. verbrauchten 15,78 cm<sup>3</sup> 0,1-n.  $Na_2S_2O_3$   
 $C_{18}H_{32}O_2$  Ber. Mol.-Gew. 280 J. Z. 181  
 Gef. „ 280 „ 181

Ölsäure.

Bei der Entbromierung von 5,0 g Dibrom-stearinsäure, genau nach der bei der Tetrabrom-stearinsäure angegebenen Methode, erhält man 2,5 g Ölsäure, die nach zweimaliger Destillation im Hochvakuum bei 13° schmilzt.  $n_D^{20} = 1,4587$ .

0,5007 g Subst. verbrauchten 17,69 cm<sup>3</sup> 0,1-n. KOH  
 0,1880 g Subst. verbrauchten 13,29 cm<sup>3</sup> 0,1-n.  $Na_2S_2O_3$   
 $C_{18}H_{34}O_2$  Ber. Mol.-Gew. 282 J. Z. 89,9  
 Gef. „ 283 „ 89,7

Herrn Prof. Dr. P. Karrer sei an dieser Stelle der Dank für die Bereitstellung der Hydrierapparatur im Chem. Institut der Universität Zürich ausgesprochen.

Versuchslaboratorium der Cellulosefabrik  
 Attisholz A.-G. vorm. Dr. B. Sieber.