

Über die Reaktion ungesättigter Verbindungen mit dem Wasser

1. Mitteilung: Orientierende Vorversuche mit Leinölfettsäuren
und Oleum Citri*

Von

E. Schauenstein, O. Gold und B. Pibus

Aus dem Institut für theoretische und physikalische Chemie
der Universität Graz

Mit 8 Abbildungen

(Eingelangt am 7. November 1955)

Die hier mitgeteilten ersten Versuche der oben genannten Untersuchungsreihe befassen sich mit der schon früher von anderen Autoren beobachteten Wasserlöslichkeit der höher-ungesättigten Fettsäuren. Es ergab sich, daß dieser Wasserlöslichkeit eine unmittelbare chemische Reaktion zwischen Wasser und den Fettsäuremolekeln zugrunde liegt, nämlich eine Addition von HOH an die Doppelbindungen der olefinischen Kohlenstoffkette, wobei die konjugiert-ungesättigten Fettsäuren offenbar eine besondere Reaktionsfähigkeit zeigen. In den wäßrigen Lösungen, deren pH zwischen 3,5 und 4,5 liegt, konnten außer den bei der genannten Reaktion gebildeten Oxyfettsäuren noch konjugiert-ungesättigte Fettsäuren nachgewiesen werden, die an die Hydroxyfettsäuren entweder über Nebenvalenzen gebunden vorliegen und dadurch wasserlöslich werden, doch wäre auch die Bildung konjugiert-ungesättigter Hydroxysäuren denkbar.

Die gefundene Reaktion beschränkt sich nicht nur auf die Fettsäuren, sondern wurde auch bei ungesättigten Oxoverbindungen, wie etwa Citral und Carvon, beobachtet.

Auch die menschlichen Serumlipide zeigen den gleichen Effekt, so daß die Annahme naheliegt, daß die beobachtete Reaktion auch im biologischen Geschehen eine Rolle spielen dürfte.

* Siehe versiegelte Schreiben „Konjuene I und II“, hinterlegt bei der Österr. Akad. d. Wiss. in Wien am 16. IV. und 1. VIII. 1953.

Problemstellung

Daß sich die biologischen Vorgänge bevorzugt in der wäßrigen Phase abspielen, bedarf heute wohl keiner ausführlicheren Begründung. Andererseits aber finden sich unter den biologisch wichtigen Verbindungen sehr viele, die in der Literatur allgemein als wasserunlöslich beschrieben werden. Hierzu gehören etwa die fettlöslichen Vitamine, die Sexualhormone oder auch — wenn man von einigen in den Lehr- und Handbüchern nicht berücksichtigten Spezialarbeiten absieht — die sogenannten F-aktiven Fettsäuren.

Es scheint hier also ein gewisser Widerspruch zu bestehen, der sich beispielsweise in der auch heute noch zur Diskussion stehenden Vielzahl von Anschauungen über den Mechanismus der Fettresorption oder der noch nicht bis ins einzelne erkannten Lösungsstabilität der Fette im Serum widerspiegelt.

Die im Rahmen dieser Untersuchungsreihe erscheinenden Arbeiten werden sich mit der Frage beschäftigen, ob der vorhin angedeutete Widerspruch nicht nur ein scheinbarer ist und sich durch den Nachweis einer unmittelbaren Reaktion zwischen dem Wasser und den an sich wasserunlöslichen Stoffen beseitigen läßt. Hierbei wollen wir uns auf ungesättigte, mehrfach und insbesondere konjugiert-ungesättigte Verbindungen beschränken. Die Gründe hierfür lagen einerseits in dem Bestreben einer schärferen Begrenzung des Stoffgebietes, andererseits in der besonderen biologischen Bedeutung gerade der höher-ungesättigten Systeme und schließlich auch in der Anwendbarkeit der hier besonders aufschlußreichen Absorptionsspektralanalyse im Ultraviolett.

Unsere Versuche begannen mit orientierenden Vorversuchen an einem Gemisch der freien Fettsäuren des Leinöls sowie an Oleum Citri und erstreckten sich sodann auf die menschlichen Serumfette bzw. auf reinste Modellverbindungen verschiedenster Art.

I. Versuche mit Leinölfettsäuren

Das Fettsäuregemisch, das bekanntlich durchschnittlich die in Tabelle 1 angegebene Zusammensetzung besitzt¹, wurde in der üblichen Weise über die Natriumseifen aus reinstem Leinöl hergestellt und in einem Mengenverhältnis von zirka 1 : 100 mit reinstem bidestilliertem Wasser, ohne Zusatz irgendwelcher anderen chemischen Stoffe in geeigneter Weise zur Reaktion gebracht².

¹ Holde, Kohlenwasserstofföle und Fette, S. 801. 1933.

² Über die näheren Einzelheiten der Versuchstechnik, die derzeit Gegenstand mehrerer Patentanmeldungen bildet, wird zu gegebener Zeit noch ausführlich berichtet werden.

Nach dem Abtrennen der Fettsäureschicht wurde durch Spezialfilter filtriert, gegebenenfalls auch zentrifugiert, wobei sich schließlich vollkommen durchsichtige, im seitlichen Licht meist leicht opaleszierende Lösungen ergaben, in denen sich auch mikroskopisch keine oder nur ganz vereinzelt Öltröpfchen mehr nachweisen ließen.

Überraschenderweise aber lassen diese wäßrigen Reaktionsphasen im UV-Spektrum die Anwesenheit konjugiert-ungesättigter Systeme völlig eindeutig erkennen (Abb. 1, Kurve 1).

Tabelle 1. Zusammensetzung der
Leinölfettsäuren

Gesättigte Fettsäuren	8—10%
Ölsäure	5—20%
Linolsäure	22—59%
Linolensäure	21—45%
Unverseifbares	zirka 1%

Die genauere Vermessung dieser Absorption bis ins Sichtbare ergab, daß keine nachweisbare Beeinflussung durch die Tyndall-Absorption gegeben ist.

Die Lösungen lassen sich ohne weiteres im Vakuum, am besten bei etwa 40 bis 50° eindampfen, wobei zunächst nur der Tyndall-Effekt zunimmt und Fetttropfchen erst gegen Ende der Operation auftreten. Die Sättigungskonzentration liegt bei 4%.

Der Eindunstrückstand ist eine klare, goldgelbe, sirupöse bis glasige Masse, die unter dem Polarisationsmikroskop reichlich kristalline Einlagerungen erkennen läßt. Die Substanz löst sich in Wasser nur schlecht und unvollständig, nach Zusatz von wenig Alkaliphosphat jedoch glatt.

Die ursprüngliche wäßrige Reaktionsphase reagiert schwach sauer (pH zwischen 3,5 und 4,5) und liefert bei der Elektrotitration mit NaOH die typischen Säuretitrationskurven (vgl. hierzu auch S. 155, bzw. Abb. 8).

Schon die bisher mitgeteilten Beobachtungen ließen erkennen, daß bei der Wasserbehandlung eine chemische Veränderung der eingesetzten

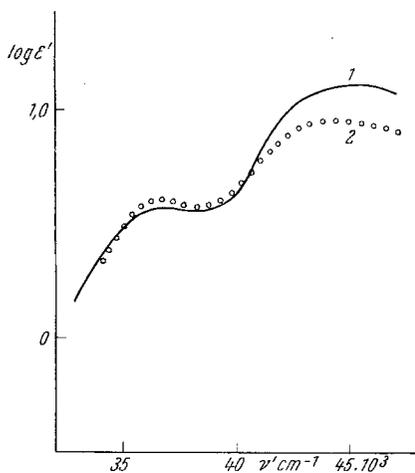


Abb. 1. ——— = „W-Fettsäuren“ in Wasser. Konjugierte Triene: 2,00%, Diene: 7,4%.
o o o = „A-Fettsäuren“ in Äthanol. Konjugierte Triene: 2,15%, Diene: 6,0%.

Leinölfettsäuren eingetreten sein mußte, und die folgenden Untersuchungen galten der Frage, welcher Art diese Veränderung wäre. Behandelt man den Eindunstrückstand mit Äthanol, so erhält man eine klare, goldgelbe Lösung, während eine geringe Menge eines weißen, nur in Wasser lös-

lichen Niederschlages zurückbleibt. Der alkohollösliche Anteil konnte als Fettsäuren identifiziert werden, der nur in Wasser lösliche bestand zum Teil aus Seifen.

Wir legten nun unseren weiteren Untersuchungen die durch verschiedene, rein qualitative Beobachtungen gestützte Arbeitshypothese zugrunde, daß die Wasserbehandlung — zumindest teilweise — zu einer Hydroxylierung der Leinölfettsäuren führen dürfte.

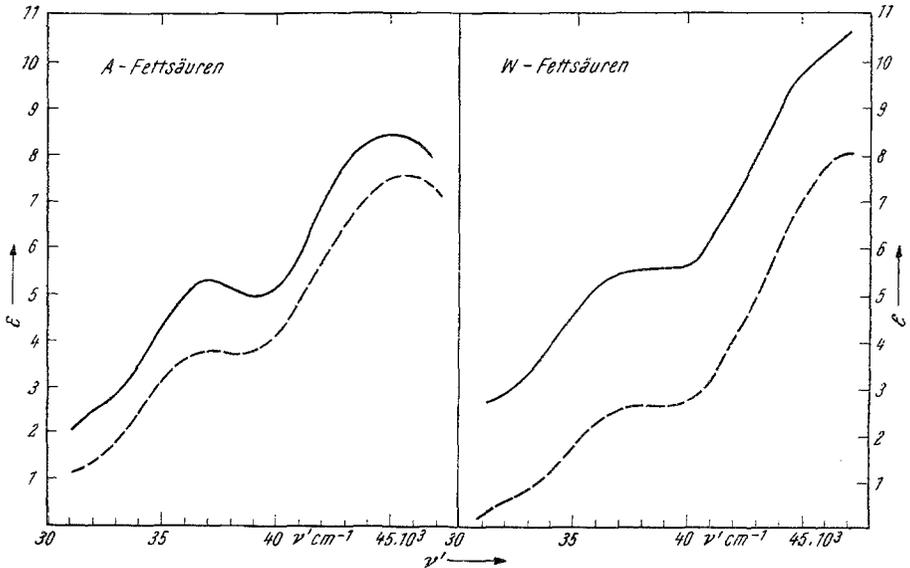


Abb. 2. „A-Fettsäuren“ und „W-Fettsäuren“ vor und nach der Vakuumdestillation (alle Spektren in Äthanol aufgenommen);
 — = zusammengesetzte Kurve, - - - = Spektrum vor Destillation

Bevor wir nun auf die weiteren Versuche eingehen, seien zwei Bezeichnungen definiert, die wir im folgenden, der Kürze halber, stets verwenden werden: Die in die Wasserreaktion eingebrachte Ausgangssubstanz soll mit dem vorgesetzten Buchstaben „A“ (hier also: A-Fettsäuren), die aus der Wasserphase erhaltenen Substanzen mit dem Vorsatzbuchstaben „W“ bezeichnet werden. Wir nennen daher den alkohollöslichen Anteil des W-Eindunstrückstandes kurz „W-Fettsäuren“.

Als erstes wurden nun A- und W-Fettsäuren im Vakuum der Ölpumpe destilliert und die erhaltenen Destillate und Rückstände gravimetrisch bestimmt und in Alkohol-Äther im Ultraviolett spektrographiert. Die erhaltenen Spektren wurden sodann im entsprechenden Verhältnis additiv zusammengesetzt und bei A- und W-Fettsäuren miteinander verglichen. Falls Hydroxyfettsäuren anwesend waren, so müßten die

Präparate nach der Vakuumdestillation einen höheren Konjuengehalt aufweisen als vorher, da hierbei eine Dehydratisierung zu erwarten wäre. Die erwartete Absorptionszunahme im Ultraviolett trat nun tatsächlich auf, und zwar grundsätzlich sowohl bei den A- als auch bei den W-Fettsäuren. Sie war aber im Gebiet der konjugierten Triene und besonders der Tetraene bei den W-Fettsäuren ganz erheblich stärker (Abb. 2).

Als weiteren, zunächst qualitativen Test auf Hydroxyfettsäuren verwendeten wir die Reaktion mit KJO_4 und Stärke auf dem Filterpapier, eine ursprünglich für Zucker benützte Reaktion, die von *Holasek* und *Winsauer* zum Nachweis für Hydroxyfettsäuren herangezogen wurde. Herr *Winsauer* hatte die Freundlichkeit, sowohl unsere A- als auch die W-Fettsäuren dieser Reaktion zu unterziehen, wobei sich zeigte, daß die A-Fettsäuren keine nachweisbaren Mengen an Hydroxyfettsäuren, die W-Fettsäuren aber eine sehr starke positive Reaktion erkennen ließen.

Als drittes Kriterium schlug Herr Prof. Dr. *A. Butenandt*, Tübingen, die Infrarot-Spektralanalyse vor und Herr Dr. *Bieker* und Frl. *Köhler* aus seinem Institut waren so freundlich, die A- und W-Fettsäuren im *Perkin-Elmer*-IR-Spektrometer zu vermessen und die Spektren zu diskutieren.

Es ergab sich, in bester Übereinstimmung mit unseren bisherigen Versuchsergebnissen, daß die A-Fettsäuren nur einen geringen Anteil an Hydroxyfettsäuren aufwiesen, während die W-Fettsäuren zu mindestens 80% als Hydroxyfettsäuren anzusprechen waren (Abb. 3).

Aufschlußreich war auch die Tatsache, daß im Spektrum der W-Fettsäuren die Banden bei 10,15 und 10,35 $m\mu$, die C—C-Doppelbindungen in trans-Stellung entsprechen, verschwunden sind.

Die Ausbeuten an W-Fettsäuren erwiesen sich als abhängig von den jeweils gewählten Verhältnissen von Fettsäure zu Wasser und nahmen mit abnehmenden Werten dieses Quotienten zu. Bei einem Verhältnis von 1 : 100 beträgt die Ausbeute pro Ansatz zirka 4 bis 5%. Die gesamte Ausbeute ist aber viel höher; es zeigte sich nämlich, daß man ein und dieselbe Menge an A-Fettsäuren mehrmals der Wasserreaktion unterwerfen kann, wobei die jeweiligen Ausbeuten nicht etwa abnehmen oder konstant blieben, sondern sogar zunahmen. Der Anzahl von Wiederholungen ist schließlich durch die dauernden unvermeidlichen Substanzverluste an Gefäßwänden und Apparaturteilen eine obere Grenze gesetzt.

Wir dürfen daraus schließen, daß es sich bei dem beobachteten Effekt nicht etwa nur um die Herauslösung des sehr geringen Anteiles von Oxyfettsäuren aus den A-Fettsäuren handelt. Man muß vielmehr folgern, daß in der Tat eine Reaktion zwischen A-Fettsäuren und Wasser stattgefunden hat, wobei es zu einer Anlagerung von HOH an die Doppel-

bindungen der Linol- und Linolensäuren, das heißt zur Bildung wasserlöslicher Hydroxyfettsäuren kommt.

Nun ist die Wasseranlagerung an ungesättigte Carbonsäuren zwar bekannt, jedoch unter gänzlich verschiedenen Reaktionsbedingungen,

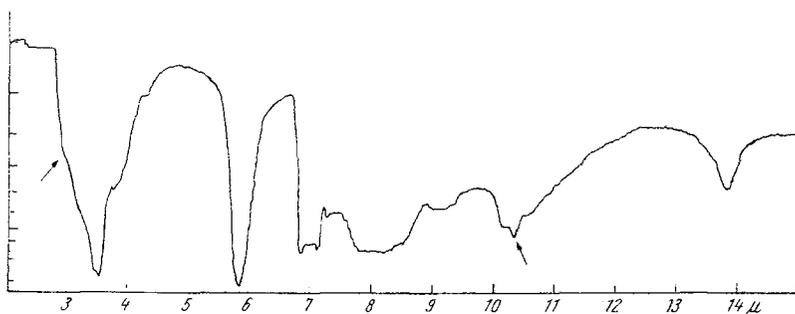


Abb. 3a. IR-Spektrum der A-Fettsäuren (nach Bieckert und Köhler)

etwa durch Erhitzen mit Laugen oder Schwefelsäure³, oder durch alkalische KMnO_4 -Lösung⁴, oder durch Anlagerung von HCOOH und nachfolgende Hydrolyse⁵. Normalerweise aber wird HOH nicht an die Doppelbindungen addiert⁶.

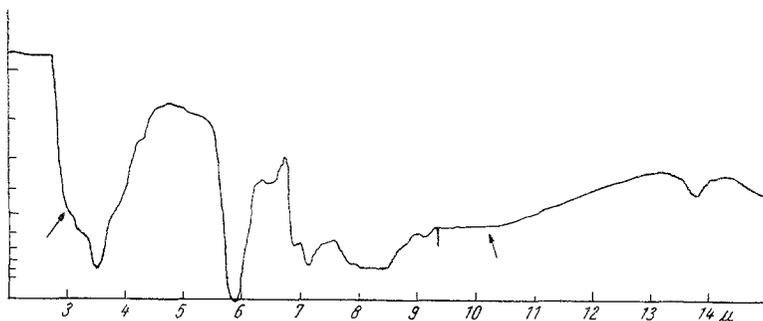


Abb. 3b. IR-Spektrum der W-Fettsäuren (nach Bieckert und Köhler)

Vergleicht man die Prozentgehalte von A- und W-Fettsäuren an konjugierten Doppelbindungen, so ergibt sich, daß bei der Reaktion

³ T. Mehta, C. Rao und B. Rao, J. Indian Chem. Soc., Ind. News Edit. **15**, 111 (1952).

⁴ K. Arimune, J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sect. **54**, 739, 760 (1951).

⁵ H. Knight, R. Koos und D. Swern, J. Amer. Oil Chemist's Soc. **31**, (1954).

⁶ E. Müller, Neuere Anschauungen der Organischen Chemie. Berlin: Springer-Verlag. 1940.

mit dem Wasser Konjuene verbraucht worden sind, und zwar nehmen die konjugierten Diene im Durchschnitt um etwa ein Zwanzigstel, die reaktionsfähigeren Triene aber um etwa ein Viertel ab. Man wird nicht fehlgehen, wenn man aus dieser „Konjuen-Bilanz“ der Wasserreaktion auf eine bevorzugte Reaktion der Konjuen-Fettsäuren mit dem Wasser in dem oben geschilderten Sinne schließt.

Wenn nun aber bei der Wasseranlagerung Doppelbindungen verbraucht werden, so fragt es sich, wieso dann überhaupt noch Konjuenbanden in den W-Fettsäuren auftreten können. Diese Frage erhebt sich zwangsläufig, wenn man die vorerst naheliegendste Alternative zwischen wasserlöslichen, nicht mehr konjugiert-ungesättigten und nicht wasserlöslichen, konjugiert-ungesättigten Fettsäuremolekeln als zutreffend annimmt. Unsere Versuche zeigen aber zweifelsfrei, daß es offenbar hier auch eine Zwischenlösung geben muß.

Wir sehen hierfür zunächst drei Deutungsmöglichkeiten:

Die Hydroxylierung könnte an der Oberfläche der submikroskopischen Fetttropfchen erfolgen, wodurch die Partikel als Ganzes wasserlöslich würde, unbeschadet der im Inneren noch vorhandenen konjugiert-ungesättigten Fettsäuremolekeln — gewissermaßen eine Art mizellarheterogener Reaktionsweise.

Man könnte aber auch annehmen, daß sich die neu entstandenen Hydroxysäuren mit an sich nicht wasserlöslichen Konjuensäuren zu löslichen Komplexen vereinigt haben.

Drittens könnte aber auch — ähnlich wie bei der Adduktbildung zwischen Maleinsäureanhydrid und isoliert-ungesättigten Fettsäuren angenommen wurde — an eine Hydroxylierung an den Kohlenstoffatomen 9 bzw. 12 gedacht werden, wobei nach der Verschiebung der Doppelbindung konjugiert-ungesättigte Hydroxyfettsäuren entstehen würden.

Was schließlich den in den Eindunstrückständen aus der Wasserphase gefundenen Seifenanteil betrifft, so sind wir uns durchaus darüber im klaren, daß hier noch eine Lücke in unserer Beweisführung besteht, zumal ja wasserlösliche Komplexe zwischen Fettsäuren und Seifen, die sogenannten „sauren fettsauren Salze“, bekannt sind. In diesem Punkte können nur Modellversuche mit reinsten Substanzen Klarheit erbringen, worüber in den nächsten Mitteilungen zu berichten sein wird.

Die im folgenden kurz referierten Versuche mit Oleum Citri und den Serumlipoiden, bei denen die Anwesenheit von Seifen wohl mit Sicherheit auszuschließen ist, orientieren aber bereits darüber, daß die Seifen bei der Reaktion der höher-ungesättigten Fettsäuren mit dem Wasser keine entscheidende Rolle spielen.

Studiert man die einschlägige Literatur, so findet man, daß sich schon frühere Arbeiten mit der Wasserlöslichkeit höherer Fettsäuren beschäftigt hatten und dabei zu ganz ähnlichen Ergebnissen gekommen waren.

So stellte bereits *Jarisch*⁷ vor rund 30 Jahren bei Versuchen mit Seifen fest, daß es hochdisperse, negativ geladene Fettsäurehydrosole geben müsse. Die von ihm beobachteten Löslichkeiten lagen allerdings um Größenordnungen unter den von uns festgestellten.

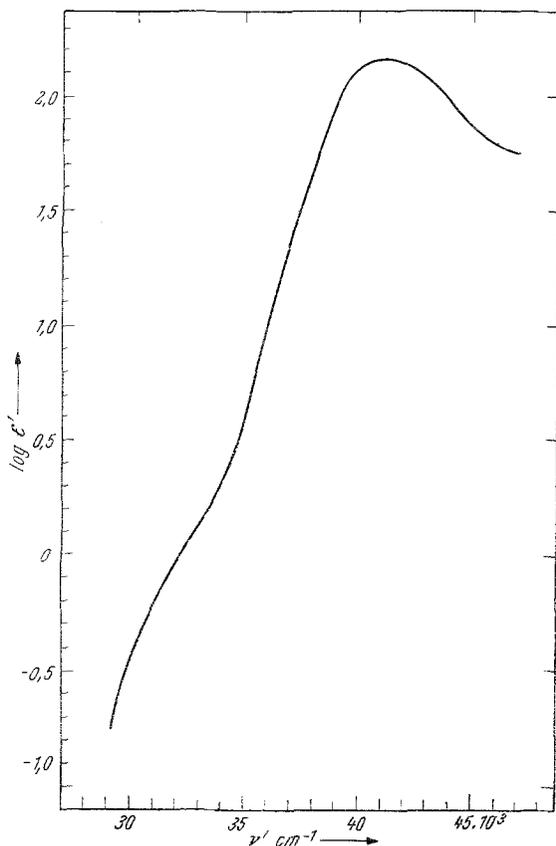


Abb. 4. Spektrum der Wasserphase nach Reaktion mit Oleum Citri

Auch *Tangl*⁸ bzw. *Tangl* und *Berend*⁹ fanden, 10 Jahre später, daß Fettsäuren im Darm stark desaturiert und damit wasserlöslich würden (Bildung von Tetraensäuren). *Tangl*⁸ wies — allerdings ohne diesbezügliche Versuche — darauf hin, daß ungesättigte Verbindungen leichter löslich wären als die gesättigten und leicht in die entsprechenden Hydroxyverbindungen übergeführt werden könnten, die „in Wasser ziemlich gut löslich sind“.

⁷ *A. Jarisch*, *Biochem. Z.* **134**, 163 (1922).

⁸ *H. Tangl*, *Biochem. Z.* **241**, 87 (1931).

⁹ *H. Tangl* und *N. Berend*, *Biochem. Z.* **220**, 234 (1930).

Schließlich kam *Erödy*¹⁰ zu dem Schluß, daß die physiologisch wichtigen Fettsäuren in Wasser Mizelle bilden und damit in beschränktem Ausmaß löslich würden. Die Mizellgröße soll mit zunehmender De-

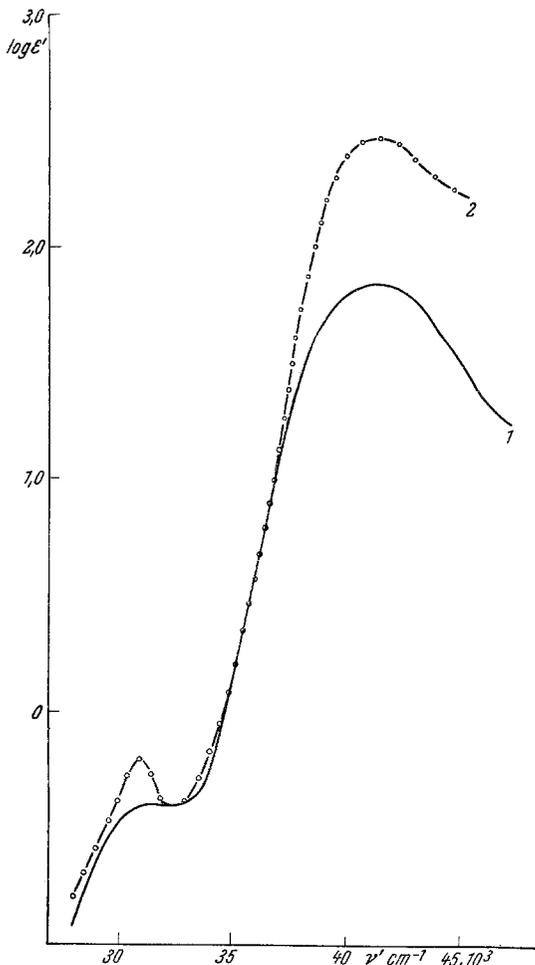


Abb. 5. Kurve 1: Spektrum des terpen- und sesquiterpenfreien Oleum Citri. Kurve 2: Spektrum von Citral (ungezeichnete Kurve nach Messungen von *Bielecky* und *Henry*). (Beide Kurven in Äthanol aufgenommen)

saturation abnehmen, die Wasserlöslichkeit daher ansteigen. Dies wurde von *Erödy* nur mittelbar auf die Doppelbindungen zurückgeführt, die diesen Effekt lediglich durch Erhöhung der Dissoziationskonstante der COOH-Gruppe ermöglichen sollten.

Zusammenfassend ergibt sich, daß unsere Befunde mit den Leinölfettsäuren *phänomenologisch* nicht die ersten sind. Keine der uns zur Kenntnis gekommenen Arbeiten aber spricht die Annahme einer Reaktion der Doppelbindungen mit dem Wasser im Sinne einer Hydroxylierung unter bevorzugter Beteiligung der konjugierten Doppelbindungen aus.

II. Versuche mit Oleum Citri

Bringt man die Substanz (terpen- und sesquiterpenfreies Öl der Fa. Haarmann u. Reimer, Holzminden) in prinzipiell gleicher Weise wie die Leinölfettsäuren mit dem Was-

¹⁰ *F. Erödy*, *Biochem. Z.* **273**, 273 (1934).

¹¹ *J. Bielecky* und *V. Henry*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **47**, 1690 (1914).

Sie stammen, wie übrigens auch der ganz charakteristische Geruch der Lösung anzeigt, in erster Linie von Citral¹¹, das in unseren Ausgangspräparaten zu etwa 20% enthalten war (vgl. hierzu auch Abb. 5). Auffallend ist die deutliche bathochrome Verschiebung des Maximums in Wasser und die starke Verschmierung der langwelligen C=O-Vorbande im Gebiet von 30000 bis 33000 ν' . Beides sind typische „Lösungsmittelleffekte“, bewirkt durch die außerordentliche Polarität des Wassers; sie sind der Ausdruck einer unmittelbaren Beeinflussung der Mesomerie des chromophoren Systems (hier C=C—C=O) durch die Wasserdipole und somit ein weiterer Beweis für den Lösungszustand des konjugierten Diens. Die folgende Übersicht demonstriert, daß hier durchaus gesetzmäßige Zusammenhänge bestehen, wie dies für derartige Effekte auch zu erwarten war.

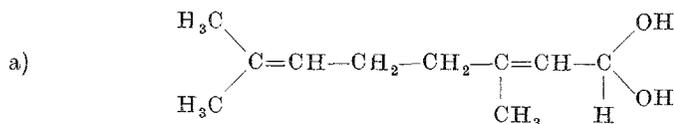
Tabelle 2. Hauptmaximum von Citral

in Heptan		in Äthanol		in Wasser	
log ϵ'	cm ⁻¹	log ϵ'	cm ⁻¹	log ϵ'	cm ⁻¹
2,41	43 · 10 ³	2,43	42 · 10 ³	—	41 · 10 ³

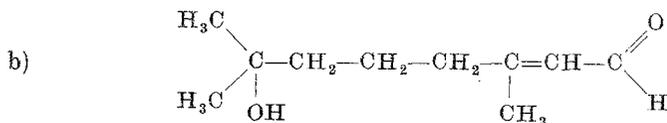
Der ϵ' -Wert in Wasser ist nicht unmittelbar bestimmbar, da sich, wie später noch näher gezeigt werden wird, außer Citral noch andere absorbierende Stoffe in der Wasserphase nachweisen ließen.

Diese Ergebnisse waren gewiß überraschend, da Citral in der Literatur allgemein als wasserunlösliche Verbindung beschrieben wird. Völlig analoge Befunde konnten auch beim Carvon des Kümmelöles erhoben werden.

Zur Erklärung wird man wohl vor allem an die Bildung von Hydraten denken, die zwar bei Citral im Prinzip bekannt sind:



und



Diese bilden sich jedoch unter völlig anderen Bedingungen (aus der Bisulfitverbindung).

Im großen und ganzen ergibt sich aus dem Bisherigen eine immerhin auffallende Parallele zu den Befunden mit den unter I mitgeteilten Befunden, nämlich der Übergang eines an sich wasserunlöslichen konjugierten Systems in die wasserlösliche Form, wobei es zu einer

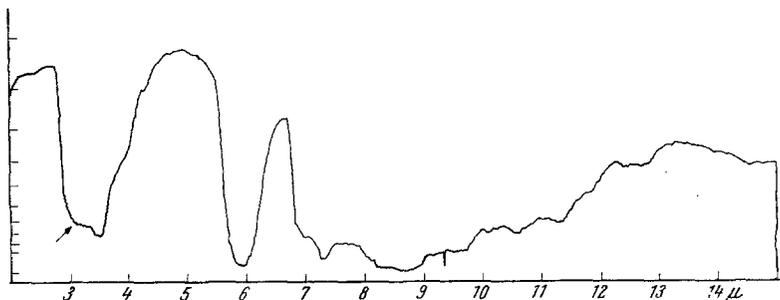


Abb. 6. IR-Spektrum der wasserlöslichen Fettsäuren aus Citrus-W (nach Bieckert und Köhler)

Wasseranlagerung an Doppelbindungen kommt. Die Beantwortung der vielen noch offenen Fragen, wie etwa, ob sich hier auch Komplexbildung zwischen hydratisierter und nichthydratisierter Form, oder ein Gleich-

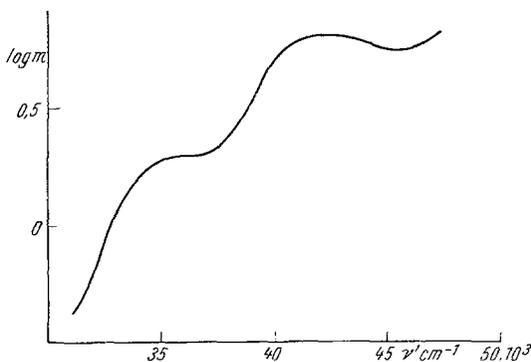


Abb. 7

gewicht zwischen den Hydraten a und b einstellt, muß Modellversuchen mit reinem Citral und ähnlich gebauten Verbindungen vorbehalten bleiben.

Weiters finden sich im Oleum Citri auch freie höhere Fettsäuren, die wir durch Ausschütteln des Ausgangsöles mit Na_2CO_3 , Ausäthern der Seifenlösung (Entfernung von Citral!), Ansäuern, Ausäthern der sauren Lösung, Waschen des Äthers und schließlich Abdunsten des Äthers in Ausbeuten von 0,3 bis 0,5% erhalten konnten. Das UV-Spektrum läßt die Gegenwart von konjugierten Fettsäuren erkennen, die Reaktion

auf Filterpapier mit KJO_4 die Abwesenheit nachweisbarer Mengen von Hydroxyfettsäuren.

Unterwirft man aber den Eindunstrückstand aus der Wasserphase dem gleichen Extraktionsverfahren, so erhält man die praktisch dem Ausgangsöl entsprechende Menge an freien Fettsäuren. Diesmal aber gibt das Präparat mit KJO_4 stark positive Reaktion auf Oxyfettsäuren und in Übereinstimmung damit tritt auch im Infrarot wieder, wie bei den W-Fettsäuren des vorhergehenden Abschnittes, das Spektrum der Hydroxyfettsäure in Erscheinung (Abb. 6).

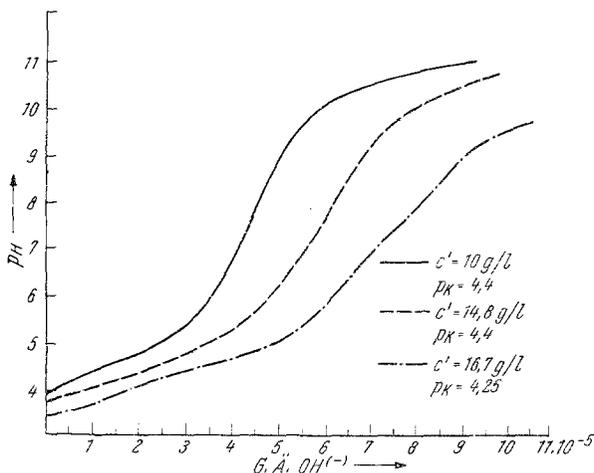


Abb. 8. Titrationskurven der wasserlöslich gemachten Fettsäuren aus Oleum Citri in wäßriger Lösung

Im Ultraviolett zeigen sich außerdem noch Konjungenbanden (Abb. 7). Diese W-Fettsäuren aus dem Citrusöl lösen sich glatt wieder in Wasser und lassen sich beispielsweise mit KBr für die Infrarotaufnahme leicht lyophilisieren.

Damit stimmt auch die Feststellung gut überein, daß der Gesamteindunstrückstand der Wasserphase, in Wasser gelöst, schwach saure Reaktion zeigt (pH zwischen 3,5 und 4,5) und daß die potentiometrische Titration eine Säure-Dissoziationskurve ergibt.

Abb. 8 bringt hierfür drei Beispiele. Man erkennt, daß bei sämtlichen Meßreihen die Dissoziationskonstanten im Gebiete von $pK \cong 4$ liegen. Diese Ergebnisse entsprechen durchaus den bei den Leinölfettsäuren gewonnenen und dürften wohl den Lösungszustand der W-Fettsäuren eindeutig belegen.

Auch hier lassen die gleichfalls anwesenden Konjungenfettsäuren auf Oberflächenhydroxylierung, Komplexbildung oder Bildung konjugierter ungesättigter Hydroxysäuren schließen.

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Bringt man 1. ein Gemisch von Linol- und Linolenfettsäuren oder 2. reinstes terpen- und sesquiterpenfreies Oleum Citri, die beide konjugiert-ungesättigte Verbindungen enthalten, mit reinstem bidestilliertem Wasser in etwa hundertfachem Überschuß in entsprechender Weise miteinander zur Reaktion, klärt die Wasserphase bis zur praktischen Abwesenheit mikroskopischer Fetttröpfchen, so erhält man stabile Lösungen, die die Anwesenheit der den Ausgangsmaterialien entsprechenden konjugiert-ungesättigten Systeme UV-spektrographisch einwandfrei erkennen lassen.

Die Eindunstrückstände der wäßrigen Phasen sind klare, meist gelbgefärbte, honig- bis glasartige Massen, die, besonders bei den Versuchen nach I, reichlich kristalline Einlagerungen aufweisen. Die Ausbeuten betragen pro Ansatz im Durchschnitt rund 5%. Die Ansätze können aber, und zwar meist mit steigenden Ausbeuten, wiederholt werden.

Die Rückstände lösen sich bei den Versuchen nach I nur schlecht in Wasser, auf Phosphatzusatz jedoch gut, bei den Versuchen nach II auch in reinem Wasser gut, wobei schwach saure, titrierbare Lösungen erhalten werden. Das pK der darin enthaltenen Säuren liegt etwa bei 4. Die Rückstände bestehen bei den Versuchen nach I zu mindestens 80% aus Hydroxyfettsäuren und enthalten außerdem noch konjugierte Diene, Triene und Tetraene. Demgegenüber enthält das Ausgangsfettsäuregemisch nur geringe Beimengungen von Hydroxyfettsäuren, jedoch mehr Konjuenfettsäuren.

Bei den Versuchen nach II lassen sich im W-Rückstand außer Citral, der ebenfalls in wasserlösliche Form übergeführt wurde, praktisch die gesamten, im Citrusöl anwesenden Fettsäuren nachweisen, jedoch wiederum weitgehend als Hydroxyfettsäuren mit einem bestimmten Anteil an Konjuenfettsäuren. Demgegenüber liefern die Fettsäuren des Ausgangsöles papierchromatographisch *keine* Reaktion auf Hydroxyfettsäuren.

Wir deuten unsere bisherigen Ergebnisse mit folgender Arbeitshypothese: Höher-ungesättigte Verbindungen, insbesondere konjugiert-ungesättigte, können mit dem Wasser unter Anlagerung von HOH an die Doppelbindungen reagieren, wobei die entstehenden Hydroxyverbindungen wasserlöslich werden. Gleichzeitig aber geht auch ein bestimmter Anteil der konjugiert-ungesättigten Systeme in die wäßrige Lösung über. Als Erklärungsversuch wird entweder eine „Oberflächenhydroxylierung“ oder die Bildung von Assoziaten zwischen Hydroxy- und Konjuenfettsäuremolekeln oder von konjugiert-ungesättigten Hydroxyfettsäuren angenommen.

Bei Citral (und ähnlich gebauten Verbindungen) wäre auch an ein Gleichgewicht zweier Hydrate zu denken.

In weiteren Versuchen, über die demnächst gemeinsam mit *Lieb* und *Schenk* in dieser Reihe berichtet werden soll, konnte festgestellt werden, daß auch die Gesamtlipide des menschlichen Serums in gleicher Weise mit dem Wasser reagieren können¹². Es erscheint daher durchaus denkbar, daß das hier erstmalig aufgezeigte Prinzip der Wasseranlagerung an Polyenfettsäuren (ohne die Mitwirkung anderer Stoffe) auch in der Biologie eine Rolle spielt und es liegt nahe, hierbei etwa an die Resorption oder an die biologische Oxydation der Fette zu denken. Gerade bei der Fettoxydation besteht ja einer der wesentlichsten Schritte in der Wasseranlagerung an die Doppelbindung der vorerst dehydrierten Fettsäure¹³. Diese Wasseranlagerung ist bisher aber nur für α - β - oder β - γ -ungesättigte Fettsäuren bekannt und bedarf, wie man bisher annahm, der Mitwirkung eines spezifischen Enzymes, nämlich der Enoyl-Hydratase oder Crotonase^{14, 15}.

Schließlich wollen wir noch festhalten, daß die hier zunächst nur kurz referierte Wasserreaktion die besonders interessanten Konjunktionsfettsäuren in einem neuen, wasserlöslichen Zustand, vermutlich gekoppelt an Hydroxyfettsäuren, den verschiedensten biologischen Untersuchungen zugänglich macht.

Hierüber wird in den folgenden Mitteilungen noch zu berichten sein.

Für wissenschaftliche Förderung und beratende Diskussionen haben wir vor allem zu danken:

Herrn Prof. Dr. Dr. *A. Butenandt*, Vorstand des Max-Planck-Institutes für Biochemie und des Physiologisch-chemischen Institutes der Universität Tübingen, und seinen Mitarbeitern Dr. *E. Bieckert* und Fräulein *Köhler*, Tübingen, dem Vorstand unseres Institutes Herrn Prof. Dr. *O. Kratky*, dem Vorstand des Medizinisch-chemischen Institutes der Universität Graz, Herrn Prof. Dr. *H. Lieb* und seinen Mitarbeitern Herrn Doz. Dr. *H. Holasek* und Herrn *K. Winsauer*, Herrn Prof. Dr. *M. Rebek*, Technische Hochschule Graz, und für wertvolle Hilfe bei Literaturstudien Herrn Dr. *W. Widder*, Graz.

Für die großzügige materielle Förderung und Unterstützung unserer Arbeiten sind wir vor allem der *Nitritfabrik-A. G.*, Feldkirchen b. München, zu großem Dank verpflichtet.

Wir danken auch der *Rockefeller Foundation* für die Bereitstellung von Meßapparaturen.

¹² Vgl. *H. Lieb*, *E. Schauenstein* und *G. Schenk*, Mitt. an die Österr. Akad. d. Wiss., Wien, vom 7. IV. 1954.

¹³ *S. Wakil* und *H. Mahler*, J. Biol. Chem. **207**, 125 (1954).

¹⁴ *J. Stern*, *M. Coon* und *Del Campillo*, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 2277 (1953).

¹⁵ *F. Lynen*, Angew. Chem. **67**, 465 (1955).