

Über die Reaktion ungesättigter Verbindungen mit dem Wasser

2. Mitteilung¹: Versuche mit reinster 9.12-Linolsäure

Von

E. Schauenstein und J. H. Biheller

Aus dem Institut für theoretische und physikalische Chemie
der Universität Graz

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 21. November 1955)

Die in der 1. Mitteilung aufgefundene Reaktion an Systemen von ungesättigten Fettsäuren mit Wasser zu Hydroxysäuren wird an reinen Substanzen untersucht und bestätigt.

Einleitung

Die in der 1. Mitteilung dieser Reihe niedergelegten Vorversuche mit Gemischen höher-ungesättigter Fettsäuren und Oleum Citri ergaben folgende Resultate: Werden die genannten Präparate mit einem vielfachen Überschuß reinsten Wassers in geeigneter Weise zur Reaktion gebracht, so tritt eine chemische Veränderung der Ausgangssubstanzen ein. Sie werden nämlich teilweise wasserlöslich, wobei es zu einer Anlagerung von HOH an die Doppelbindungen kommt und ein bestimmter Anteil konjugiert-ungesättigter Fettsäuren ebenfalls in die wäßrige Lösung übergeht. Die Ausbeuten an dem Gemisch wasserlöslicher Fettsäuren betragen pro Reaktionsansatz 5 bis 8% des Ausgangsmaterials.

Wie leicht einzusehen ist, machten die bisher verwendeten Ausgangsmaterialien — wenn sie auch so weit als möglich gereinigt, so doch komplexer Zusammensetzung und technischer Provenienz waren — eine schärfere Diskussion und Zuordnung der erhaltenen Ergebnisse recht schwierig oder gar unmöglich.

Wir gingen aus diesem Grunde dazu über, zunächst ausgewählte,

¹ Vgl. hierzu: 1. Mitteilung, Mh. Chem. 87, 144 (1956).

einheitliche Reinstsubstanzen auf die zu erwartende Reaktion mit dem Wasser zu untersuchen, worüber im folgenden berichtet werden soll².

Experimentelles

Wir verwendeten als ersten Modellkörper 9,12-Linolsäure, puriss., der Fa. Hoffmann-La Roche. Das Präparat enthielt keine nachweisbaren anorganischen Bestandteile und ließ auch bei der papierchromatographischen Prüfung mit $KJ O_4$, wie sie von *Holasek* und *Winsauer*³ zur Bestimmung von Hydroxyfettsäuren angewendet wird, keine nachweisbaren Beimengungen von Hydroxyfettsäuren erkennen (vgl. Abb. 1).

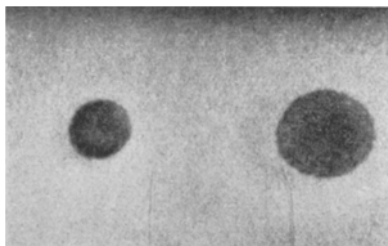


Abb. 1. 9,12-Linolsäure, puriss., auf Filterpapier mit $KJ O_4$ und Stärke an Hydroxyfettsäuren geprüft

Die UV-spektrographische Untersuchung der Substanz ließ erkennen, daß sie nicht zu 100% aus der zweifach isoliert-ungesättigten Fettsäure bestand, sondern geringfügige Anteile der konjugierten Isomeren, bemerkenswerterweise auch der dreifach konjugiert-ungesättigten Isomeren, aufwies. Abb. 2 bringt das in alkohol. Lösung aufgenommene UV-Spektrum mit der typischen Schwingungsfinestruktur der konjugierten Triene zwischen 35 600 und 37 200 ν' und dem scharfen Maximum der konjugierten Diene bei 43 300 ν' . Aus den entsprechenden Bandenintensitäten errechnen sich leicht die Prozentgehalte, wobei für die konjugierten Triene ein Gehalt von 0,36% und für die konjugierten Diene ein Gehalt von 1,78% resultiert. Wie man sieht, machen die konjugierten Anteile nur rund 2% des Präparats aus und fallen daher praktisch nicht ins Gewicht. Im kurzwelligeren Gebiet

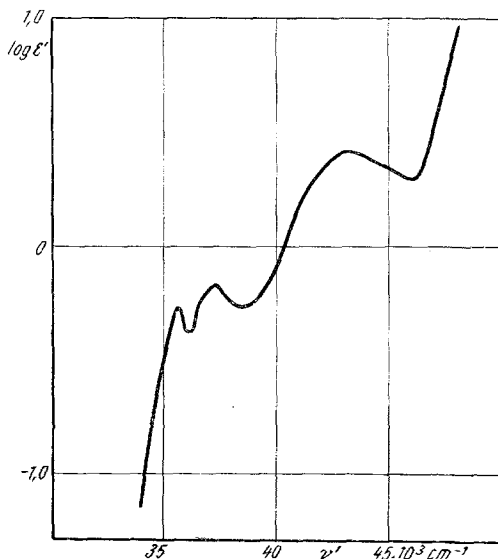


Abb. 2. UV-Absorptionsspektrum von 9,12-Linolsäure, puriss., in Äthanol ($c' = 1,000 \text{ g/l}$, $\epsilon' = E/c' \cdot d$, wobei d = Schichtdicke in cm)

² Wir erlauben uns hier, Herrn Prof. Dr. A. *Butenandt*, Tübingen, der uns bei dieser Frage liebenswürdigerweise beraten hat, unseren ergebensten Dank auszusprechen.

³ *A. Holasek* und *K. Winsauer*, bisher unveröffentlichte Versuche bzw.⁴.

⁴ *I. Buchman*, *C. Dekker* und *A. Long*, *J. Chem. Soc. London* 1950, 3162.
— *R. Metzberg* und *H. Mitchell*, *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 4187 (1954).

erkennt man ferner einen steilen Anstieg, der ohne Zweifel dem Hauptmaximum der isoliert-ungesättigten Fettsäuremoleküle im Gebiete von 50000 bis 55000 ν' zukommt, die ja beim vorliegenden Präparat bei weitem überwiegen.

Es wurden nunmehr Einwaagen der genannten Substanz (durchschnittlich etwa 5 g) mit der 50- bis 100fachen Menge reinsten, in Quarzgefäßen doppelt destillierten Wassers in ausgedämpften Glasgefäßen zur Reaktion gebracht. In völliger Analogie zu den Vorversuchen der 1. Mitteilung konnten auch hier in den wäßr. Phasen nach Entfernung jeglicher sichtbarer, auch der mikroskopischen Fetttröpfchen UV-spektrographisch einwandfrei Konjungenbanden festgestellt werden (Abb. 3).

Die Ausbeuten waren im allgemeinen merklich geringer als bei dem Gemisch aus Leinöl-fettsäuren und betrug zunächst nur etwa 1%, während die bisherigen Versuche 5 bis 8% wasserlöslicher Substanz ergeben hatten.

Von entscheidender Bedeutung aber war die Feststellung, daß sich die Ausbeuten beträchtlich ändern, wenn man ein und dieselbe Einwaage *mehrmals* der Wasserreaktion unterwirft. Wir wiederholten diese 10mal und stellten schließlich Ausbeuten von 3 bis 4% pro Reaktions-

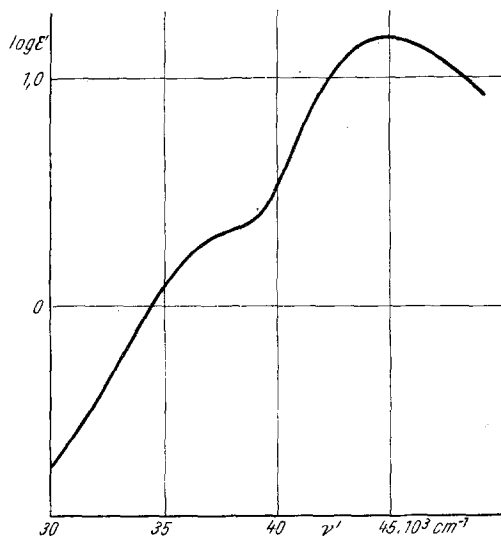


Abb. 3. UV-Absorptionsspektrum der „W-Fettsäuren“ aus 9,12-Linolsäure, puriss., in Wasser ($c' = 1,000$ g/l)

ansatz fest. Theoretisch könnte man die Reaktion auch beliebig oft wiederholen, ist jedoch praktisch an eine obere Grenze durch die unvermeidlichen Substanzverluste an den Gefäßwänden und sonstigen Apparaturteilen gebunden.

Die wäßrigen Reaktionsphasen, die häufig einen leichten *Tyndall*-Effekt zeigen, reagieren schwach sauer und ihr pH liegt zwischen 4,6 und 5,1. Sie lassen sich im Vak. bei etwa 50° ohne weiteres einengen, wobei der *Tyndall*-Effekt zunimmt und das pH absinkt: es ergeben sich nunmehr pH-Werte zwischen 3,5 und 3,8. Diese Lösungen, deren Gehalt an Trockensubstanz größenordnungsmäßig 0,1 g/100 cem beträgt, liefern bei potentiometrischer Titration eine einwandfreie Säure-Dissoziationskurve, wie sie etwa in Abb. 4 wiedergegeben ist. Das pK der darin enthaltenen Säuren liegt im Gebiet von etwa 4,3.

Engt man die Lösungen weiter ein, so beginnen sich bei einer bestimmten Konzentration Fetttröpfchen auf der Flüssigkeitsoberfläche

abzuscheiden und die Sättigungskonzentration konnte zu 4,2 g pro 100 ccm bestimmt werden. Dies ist ein für höher-ungesättigte Fettsäuren der C_{18} -Reihe gewiß überraschend hoher Wert, wenn man bedenkt, daß Linol- oder Linolensäure in den Lehr- und Handbüchern ausdrücklich als „wasserunlöslich“ bezeichnet wird. Diese bemerkenswerte Wasserlöslichkeit hängt aber offenbar von dem Lösungszustand unserer Fettsäuren in der wäßrigen Phase ab und ist reversibel: Dampft man nämlich

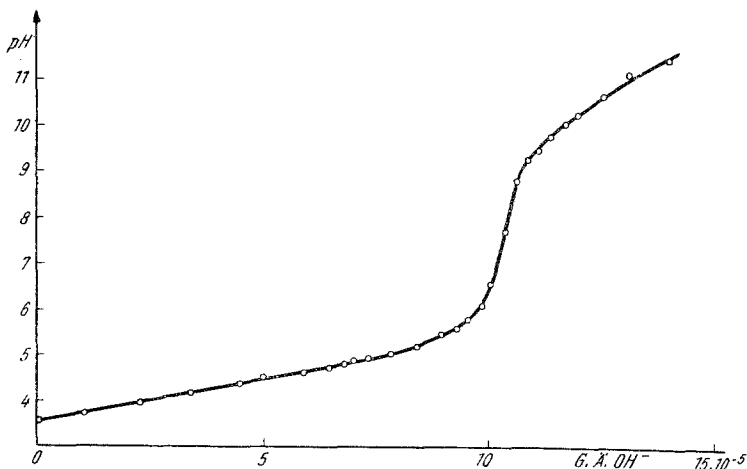


Abb. 4. Potentiometrische Titration der W-Fettsäuren aus 9,12-Linolensäure, puriss., mit 0,100 n NaOH, in Wasser

bis zur Gewichtskonstanz des Trockenrückstandes ein, so ist dieser kaum mehr wasserlöslich, sondern löst sich nur mehr nach Zusatz von wenig Alkohol zu dem zum Lösen verwendeten Wasser. Es dürften hier Sekundärveränderungen der Substanz eingetreten sein, wobei vor allem an eine Polymerisation bzw. teilweise Dehydratisierung beim Trocknungsvorgang zu denken ist.

Schon die ersten qualitativen Untersuchungen des Eindunstrückstandes ergaben, daß die Wasserreaktion zu einer eindeutigen chemischen Veränderung der Ausgangsfettsäure geführt haben muß: Der Eindunstrückstand der wäßrigen Phasen ist eine feste Substanz mit zahlreichen gut ausgebildeten kreuzförmigen Kristalleinschlüssen, während die Ausgangsfettsäure flüssig ist.

Die Untersuchung mit KJO_4 auf dem Filtrierpapier, die wiederum Herr *Winsauer* freundlicherweise für uns vornahm, lieferte eine außerordentlich starke positive Reaktion auf Hydroxyfettsäuren, wie Abb. 5 veranschaulicht. Betrachtet man das Bild eingehender, so erkennt man einen deutlich wahrnehmbaren peripheren Hof, der auf die Anwesenheit

einer zweiten Komponente hinweist. Einen ersten Anhaltspunkt dafür, worum es sich dabei handeln könnte, lieferte das UV-Spektrum (vgl. Abb. 3). Die charakteristischen Konjungenmaxima zeigen die Anwesenheit beträchtlicher Mengen konjugiert-ungesättigter Fettsäuren an. Die Rechnung ergibt 10,27% konjugierter Diene und 1,05% konjugierter Triene. Schon der Vergleich dieser Zahlen mit den an der Ausgangsfettsäure festgestellten Daten läßt auf eine ganz entscheidende Funktion speziell der konjugiert-ungesättigten Fettsäuren bei der Wasserreaktion schließen; dies soll jedoch noch Gegenstand eingehender weiterer Untersuchungen bilden. Es erscheint weiterhin bemerkenswert, daß der im

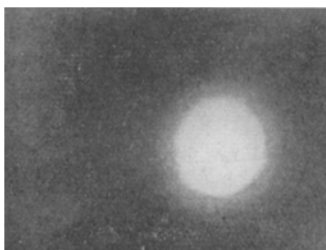


Abb. 5. W-Fettsäuren aus 9,12-Linolsäure, puriss., auf Filterpapier mit KJ_4 und Stärke auf Hydroxyfettsäuren geprüft. (Anm.: Auch hochkonjugierte Fettsäuren liefern bei dieser Reaktion zunächst helle Flecken, die sich aber schon nach 30 Min. braunviolett verfärben, während Hydroxyfettsäuren tagelang haltbare, reinweiße Flecken geben. In unserem Falle fiel die Reaktion eindeutig positiv auf Hydroxyfettsäuren aus. Daraus folgt weiter, daß die in den W-Fettsäuren anwesenden, zirka 10% Konjungenfettsäuren die Reaktion nicht stören)

Spektrum der Ausgangsfettsäure („A-Fettsäure“) festgestellte, kurzwellige, steile Absorptionsast (Abb. 2) im Spektrum der „W-Fettsäure“ vollständig fehlt (Abb. 3). Dieses wahrhaft überraschende Ergebnis führt zur Annahme, daß wir in den W-Fettsäuren praktisch lediglich mit der Anwesenheit von Hydroxyfettsäuren und Konjungenfettsäuren, nicht aber von Isolenfettsäuren zu rechnen haben werden. Diese Annahme unterstreicht weiterhin eindrucksvoll die bereits vorhin erwähnte besondere Bedeutung der Konjungenfettsäuren bei der Wasserreaktion.

Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Die mitgeteilten Versuche mit reiner 9,12-Linolsäure ergaben, daß die Wasserreaktion nicht etwa, wie man bei den Leinölfettsäuren oder dem Oleum Citri hätte vermuten können, eine bloße Herauslösung bereits vorhandener, geringfügiger, leichter wasserlöslicher Anteile (Hydroxyfettsäuren, Seifen), sondern Ausdruck einer echten, unmittelbaren chemischen Umsetzung zwischen Fettsäure- und Wassermolekel ist. Auch nach 10mal wiederholter Wasserreaktion mit ein und derselben Einwaage bleiben die Ausbeuten an W-Fettsäuren noch merklich unter

den beim Leinölfettsäuregemisch festgestellten Werten. Es scheint durchaus möglich, daß die Ausbeute der Wasserreaktion von der Zahl der Doppelbindungen in der Molekel abhängig ist und mit steigender Zahl von Doppelbindungen ansteigt.

Auch der Gehalt einer mehrfach ungesättigten Verbindung an konjugierten Isomeren scheint auf die Ausbeute einen wesentlichen, und zwar allgemein einen steigernden Einfluß zu haben. Hier liegen jedoch die Reaktionsverhältnisse ziemlich kompliziert, so daß wir zunächst von endgültigen Aussagen noch absehen müssen.

Unsere W-Fettsäuren dürften nach den bisherigen Ergebnissen ein Gemisch von Hydroxy- und Konjuenfettsäuren darstellen und es erscheint durchaus denkbar, daß ein solches System ein im Sinne der grundlegenden Untersuchungen von *Franke* und *Frehse*⁵ „anoxydiertes“ Fettsäuregemisch darstellt. Solche anoxydierten Systeme sind nach *Franke* und *Frehse* durch eine besondere Reaktionsfähigkeit mit den Fermenten der biologischen Fettoxydation (der Lipoxydase und Dehydrodrase) ausgezeichnet. In unserem Falle scheint ein System realisiert zu sein, dem durch die Wasserlöslichkeit ein besonderes Interesse im Hinblick auf die Redoxvorgänge der Zellen und Gewebe zukommt. Wir begannen daher in Vorversuchen die Frage zu klären, ob die W-Fettsäuren mit Stoffen in Reaktion treten, die beim Sauerstoff-Stoffwechsel maßgeblich beteiligt sind⁶. Wir untersuchten zunächst, gemeinsam mit *H. Röhsler*, die Reaktion zwischen W-Fettsäuren und Cystein in wäßriger Phase; es ergab sich dabei, daß die W-Fettsäuren wahrscheinlich über intermediäre Peroxyde mit dem Cystein in der Weise in Reaktion zu treten vermögen, daß sie die Oxydation der SH-Gruppe im neutralen Milieu um ein Vielfaches beschleunigen. Hierüber wird in einer späteren Mitteilung noch ausführlich mit *Röhsler* berichtet werden. Wir wollen hier als vorläufige Interpretierung zunächst nur die Annahme aussprechen, daß die W-Fettsäuren ein sauerstoffübertragendes System darstellen dürften.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Wir sind der Nitritfabrik-A. G., Feldkirchen b. München, für die großzügige Förderung unserer Arbeiten, insbesondere für die Gewährung eines Forschungsstipendiums an den einen von uns (*J. H. B.*), zu größtem Dank verpflichtet.

Wir danken auch der Rockefeller Foundation für die Bereitstellung von Apparaturen.

⁵ *W. Franke* und *H. Frehse*, Z. physiol. Chem. **295**, 333 (1953); **298**, 1 (1954).

⁶ Herrn Doz. Dr. *H. Klíngenbergr*, Physiologisches Institut der Universität Graz, sei hiermit für zahlreiche anregende Diskussionen herzlichst gedankt.