

Über die Reaktion ungesättigter Verbindungen mit dem Wasser

3. Mitteilung: Papierchromatographische Untersuchungen mit reiner 9,12-Linolsäure

Von

E. Schauenstein und J. H. Biheller

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Graz

Mit 13 Abbildungen

(Eingegangen am 6. Dezember 1956)

Reinste 9,12-Linolsäure reagiert mit reinem destilliertem Wasser ohne Zusatz weiterer Stoffe unter Konjugation und nachfolgender Hydroxylierung der Doppelbindungen. Das gebildete Reaktionsprodukt löst sich in der Wasserphase und kann daraus in fester Form gewonnen werden. Es läßt sich zerlegen in einen nach dem Eindunsten des Wassers kaum mehr wasserlöslichen Fettsäureanteil und einen auch weiterhin gut wasserlöslichen Anteil, dessen COO-Gruppe in noch nicht endgültig geklärter Weise verändert, der jedoch sicher keine Seife ist. Beide Anteile weisen neben einem Gehalt von rund 12 bzw. 3% Konjugaten mindestens 80% Polyhydroxyverbindungen auf, wie auf Grund von papierchromatographischen Versuchen sowie von UV- und IR-spektrometrischen Messungen ausgesagt werden kann.

Die Richtlinien für die weitere Aufarbeitung werden aufgezeigt und eine kurze Deutung des Reaktionsmechanismus versuchsweise gegeben. Weitere Untersuchungen werden sich mit der Anwendung der Wasserreaktion auf andere ungesättigte Verbindungen sowie mit der mutmaßlichen biologischen Bedeutung der neuen Reaktionen befassen.

Problemstellung

In einer vorangegangenen Mitteilung wurde dargelegt, daß reinstes 9,12-Linolsäure bei entsprechender Wechselwirkung mit destilliertem Wasser in wasserlösliche Form übergeführt werden kann¹. Dabei kommt

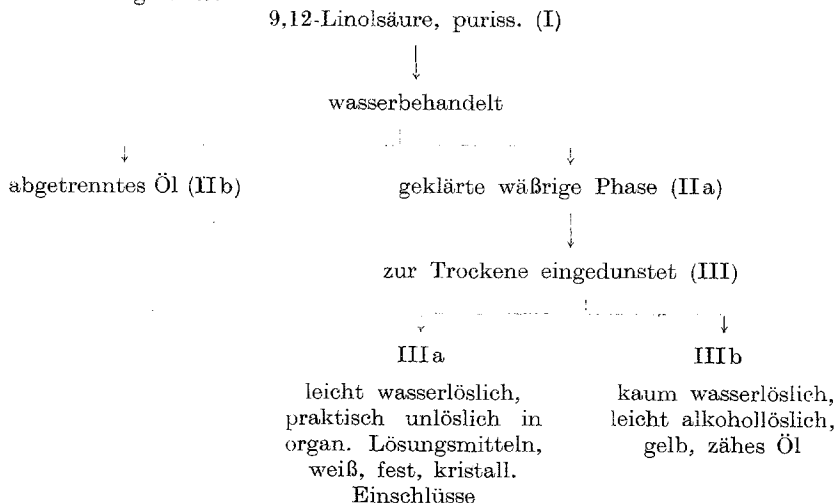
¹ E. Schauenstein und J. H. Biheller, *Mh. Chem.* **87**, 158 (1956).

es einerseits zu einer Anlagerung von H und OH an die Doppelbindungen, das heißt zur Bildung von Polyhydroxykörpern, andererseits gehen aber noch mehrfach ungesättigte Systeme in die Wasserphase, und zwar in echte Lösung über. Das UV-Spektrum ermöglicht dabei die Aussage, daß es sich um konjugiert-ungesättigte Systeme handelt. Dieses Ergebnis scheint in Anbetracht der Tatsache bemerkenswert, daß als Ausgangspräparat eine isoliert-ungesättigte Säure Verwendung fand. Wir schließen daraus, daß es bei der Wasserreaktion in erster Stufe zu einer Verschiebung der Doppelbindungen aus der ursprünglichen isolierten in die konjugierte Stellung und in zweiter Stufe zu einer Anlagerung von HOH an die konjugiert-stehenden Doppelbindungen kommt.

Diese Ansichten bezüglich des Reaktionsablaufes werfen eine Vielzahl von derzeit noch offenen Fragen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der gebildeten Reaktionsprodukte auf und es soll im folgenden über die Ergebnisse weiterer Untersuchungen über dieses Problem berichtet werden.

Experimenteller Teil

Zunächst sei die durchgeführte Arbeitsweise im folgenden Schema übersichtlich dargestellt:



Das Ausgangsmaterial stammte von der Firma *Hoffmann-La Roche*. Die Wasserbehandlung bestand in hochoberem Verrühren der Fettsäure in reinstem, luftfrei gemachten dest. Wasser unter Stickstoff.

IIIb ist die nach längerem Stehen abgetrennte wasserunlösliche Ölschicht. Die Wasserphase wurde durch mehrfaches Filtrieren und Zentrifugieren geklärt, bis sich darin nur mehr ganz vereinzelte Tröpfchen mit einem Durchmesser von $\leq 1 \mu$ vorfanden (IIa).

Diese Lösung reagiert sauer (pH zwischen 4 und 5), über ihre elektrometrische Titration wurde bereits berichtet¹.

Die Lösung zeigt im Ultraviolett deutliche Absorptionsmaxima, ohne erkennbare, durch seitliche Streuung eventuell bedingte sogenannte Scheinabsorption. (Vgl. die späteren Abbildungen!)

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen befaßten sich im einzelnen mit den Präparaten I, IIb, IIIa und IIIb.

1. Anwendung der Papierchromatographie nach Kaufmann und Nitsch²

Substanz I: Das Präparat stellt sich nach 16stünd. Wanderung bei 20° Raumtemp. als homogener Fleck dar, dessen Schwerpunkt einem R_f -Wert von 0,36 entspricht (vgl. Abb. 1 und Tabelle I). Dieses Ergebnis entspricht in befriedigender Weise einer reinen, mehrfach ungesättigten C₁₈-Fettsäure. Beimengungen anderer Stoffe sind nicht mehr nachweisbar. Dieser Befund ist in bester Übereinstimmung mit den Angaben der Herstellerfirma *Hoffmann-La Roche*, wonach das Präparat als 9,12-Linolsäure, puriss., frei von anorganischen Bestandteilen und Hydroxyfettsäuren deklariert wird.

Tabelle I

R _f -Werte	0,36	0,39	0,30	0,37
Präp. I				

Substanz IIb: Das Chromatogramm zeigt einen deutlichen Fleck im Bereich der Ausgangssubstanz I mit einem R_f -Wert von 0,36.

Ferner zeigen sich ein oder mehrere Flecken mit sehr hohem R_f -Wert, die ganz knapp unterhalb der Front liegen ($R_f = 0,96$). Tabelle 2, Abb. 2.

Tabelle 2. R_f -Werte für Präparat IIb und IIIb (Mittelwerte)

II b		III b
0,36	0,96	0,96

Substanz IIIb: Keinerlei Flecken im Gebiet der mehrfach ungesättigten C₁₈-Säuren, sondern lediglich, wie bei IIb, ein oder mehrere Flecken knapp unterhalb der Front ($R_f = 0,96$). Tab. 2, Abb. 3.

Besonderes Interesse kommt den Flecken mit dem auffallend hohen R_f -Wert zu, der dem von reinen und auch ungesättigten Hydroxyfettsäuren sehr gut entsprechen würde. Vor allem war nun die Frage zu klären, ob die an der Front horizontal verteilten Flecken als echte Fettsäureflecken oder als reiner Fronteffekt anzusprechen wären.

Hierzu wurde zunächst der reine Fronteffekt festgestellt, indem in Blindversuchen die reine Lösungsmittelphase wandern gelassen wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 4 wiedergegeben. Wir dürfen daraus schließen, daß auch die reine Lösungsmittelfront bei Anfärbung mit Kupferacetat-Kaliumferrocyanid Dunkelfärbung zeigt, wobei sich ebenfalls sehr kleine und offenbar nur durch gewisse Strömungswirbel bedingte Flecken ausbilden. Bei Ver-

² H. P. Kaufmann und W. Nitsch, Fette, Seifen, Anstrichmittel **56**, 154 (1954); **57**, 473 (1955).

wendung kleinerer Mengen von IIb oder IIIb kann daher nichts Sicheres über die Ursache der Flecken mit hohem R_f -Wert ausgesagt werden.

Nimmt man hingegen verhältnismäßig größere Mengen dieser Präparate (etwa 10 μ l einer 4%igen alkohol. Lösung), so sieht man einen unverkennbaren Unterschied zum reinen Fronteffekt.

Es bilden sich nämlich zwei bis drei deutlich sichtbare, größere Farbflecken aus, die nunmehr sicher auf gewanderte Fettsäuren schließen lassen.

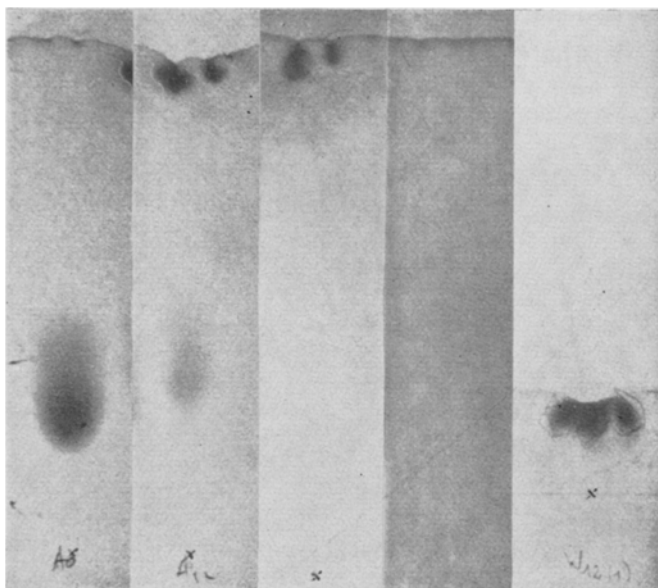


Abb. 1 Abb. 2 Abb. 3 Abb. 4 Abb. 5

Abb. 1. Papierchromatogramm nach Kaufmann und Nitsch von I

Abb. 2. Papierchromatogramm nach Kaufmann und Nitsch von IIb

Abb. 3. Papierchromatogramm nach Kaufmann und Nitsch von IIIb

Abb. 4. Leerversuch mit reinem Lösungsmittel („Fronteffekt“)

Abb. 5. Papierchromatogramm von IIIb nach 3stünd. Wanderung

Auffallend bleibt aber immer noch die Tatsache, daß sich ganz selten ein einzelner, sondern stets mehrere Flecken bilden. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Ursache hierfür in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der mit der Front gewanderten Substanz zu suchen ist. Zum Beweis wurde in einem neuen Versuch die Wanderung bereits nach 3 Stdn. unterbrochen und das Chromatogramm entwickelt. Die Abb. 5 zeigt, daß hierbei der Fronteffekt selbst kaum noch wahrnehmbar ist, daß sich dagegen die hochgezogene Substanz mit aller Deutlichkeit eben in drei Einzelflecken zu zerteilen beginnt.

Damit scheint es gerechtfertigt, die knapp unterhalb der Front erscheinenden Flecken in der Tat Fettsäuren mit sehr hohem R_f -Wert zuzuordnen.

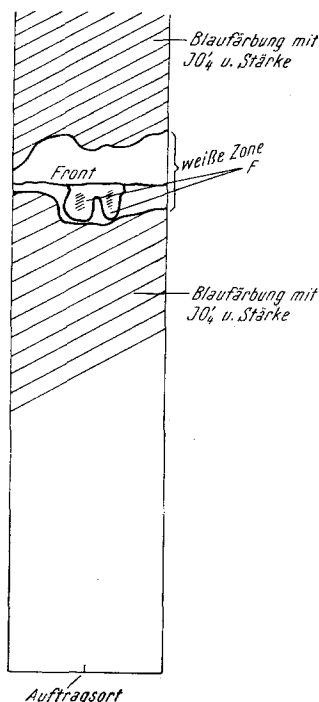


Abb. 6. Schematische Darstellung eines Chromatogramms von IIIb nach Behandlung mit Perjodat und Stärke (nach *Holasek* und *Winsauer*)

Die Betrachtung der Chromatogramme im UV-Licht vor der Entwicklung ergab, daß die bei I und IIb auftretenden Flecke, die der reinen, mehrfach ungesättigten Fettsäure entsprechen, nicht merkbar, die bei IIb und IIIb festgestellten Flecke mit hohem R_f -Wert dagegen intensiv hellblau fluoreszieren.

Schließlich wurde noch ein Chromatogramm ohne Entwicklung in luftgetrocknetem Zustand nach der Methode von *Holasek* und *Winsauer*³ mit Kaliumperjodat und Stärke besprüht. Das Ergebnis eignet sich nur schwer für die photographische Wiedergabe infolge der raschen Änderungen in Farbton und -intensität jener Papierbereiche, in denen sich keine Hydroxylverbindungen vorfinden. Wir müssen uns daher mit einer schematischen Wiedergabe begnügen: Abb. 6. Beiderseits der Front tritt eine unregelmäßig begrenzte, nach der Perjodat-Stärke-Behandlung rein weiß bleibende Zone auf, die aber, wie der Leerversuch bewies, ein reiner „Fronteffekt“ ist und mit den gewanderten Fettsäuren nichts zu tun hat.

Dicht unterhalb der Front zeigen sich vor der Perjodat-Stärke-Behandlung im UV intensiv hellblau fluoreszierende Flecke (F), die nach dem Besprühen mit den Reagenzien zunächst rein weiß bleiben, sich aber nach einigen Stunden zentral braun verfärben.

IIIa, in dest. Wasser gelöst, ergab beim Tüpfelversuch auf dem Papier keine Blaufärbung mit Cu-Acetat und zeigte auch nach einem 16stünd. Chromatographieversuch keine eindeutige Sedimentation auf dem Papier.

2. Die Ultraviolett-Absorptionsspektren

Die folgenden Abbildungen bringen nun die Absorptionsspektren der Präparate I, IIb, IIIb und IIIa. Die Kurven weisen durchwegs einen klaren Aufbau und gut ausgebildete Maxima im mittleren Quarz-UV auf und sind daher sicher zu interpretieren. Die festgestellten Banden gehören konjugiert-ungesättigten C=C-Bindungen an, und zwar im einzelnen die Bande bei 36000 bis 37000 ν' mit der angedeuteten Feinstruktur im Spektrum von I den konjugierten Trienen, die Bande im Gebiet von 43000 bis 45000 ν' den konjugierten Dienen und der steile Ast im Kurzwelligen dem Maximum der isoliert-ständigen C=C-Bindung, das bei zirka 55000 ν' liegt. Nunmehr ergeben sich aus den Spektren folgende Aussagen:

Präparat I (Abb. 7): Überlagerung der Eigenabsorption von dreifach und zweifach konjugiert-ungesättigten und von isoliert-ungesättigten Fett-

³ *A. Holasek* und *K. Winsauer*, bisher unveröffentlichte Versuche; vgl. hierzu auch: *I. Buchman*, *C. Decker* und *A. Long*, *J. Chem. Soc. London* 1950, 3162.

säuremolekeln. Bezieht man die gemessene Extinktion auf die Konzentrations-

einheit (1 g/l), so errechnet sich der Gehalt an konjugierten Anteilen für die Triene zu 0,36%, für die Diene zu 1,78%. Hierbei wurde für den speziellen dekadischen Extinktionskoeffizienten der konjugier-

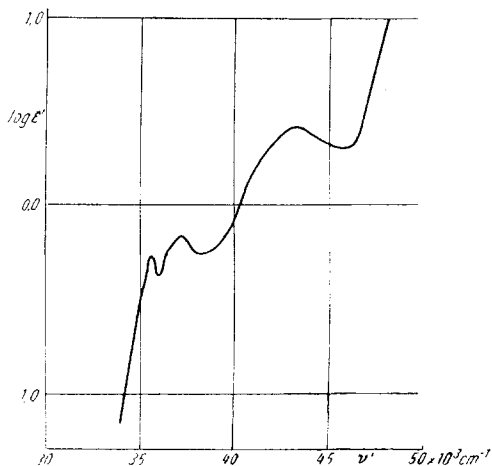


Abb. 7. UV-Absorptionsspektrum von I in Äthanol
($\epsilon' = E/c \cdot d$ [$\text{g}^{-1} \text{cm}^2$])

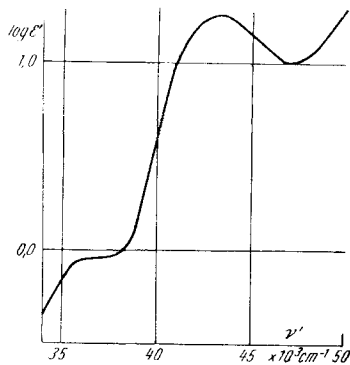


Abb. 8. UV-Absorptionsspektrum von IIb in Äthanol

ten Triensäuren ein Wert von 189, für den der konjugierten Diensäuren ein Wert von 145 eingesetzt.

Unsere Ausgangssubstanz enthält daher nur relativ geringfügige und praktisch kaum ins Gewicht fallende konjugierte Anteile und besteht zum weitaus überwiegenden Teil aus isoliert-ungesättigter 9,12-Linolsäure.

Präparat IIb (Abb. 8): Auch hier ist mit Anwesenheit von konjugiert-ungesättigten Isomeren zu rechnen. Die festgestellten relativen Bandintensitäten ermöglichen dabei die Aussage, daß sich das Verhältnis von

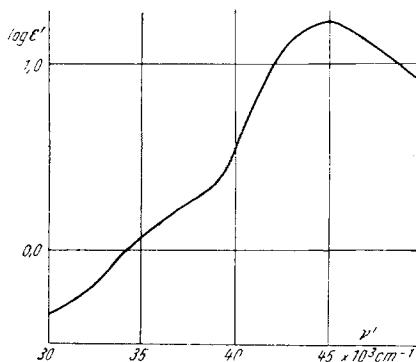


Abb. 9. UV-Absorptionsspektrum von IIIb in dest. Wasser

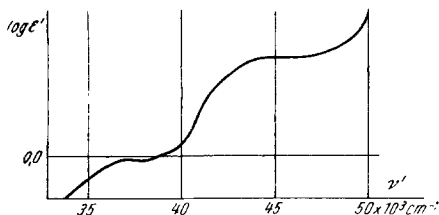


Abb. 10. UV-Absorptionsspektrum von IIIa in dest. Wasser

Dien- und Triensäuren ganz wesentlich in Richtung der konjugierten Diensäuren verschoben hat. Die quantitative Auswertung ergibt einen Gehalt von 12,37% konjugierten Dienen und 0,48% konjugierten Trienen. Die Feinstruktur in der Trienbande ist verschwunden. Im kurzwelligen Gebiet

ist noch deutlich die steile Grenzabsorption der isoliert-ungesättigten Fettsäuren zu sehen.

Präparat IIIb (Abb. 9): Auch hier sind konjugiert-ungesättigte Fettsäurekomponenten vorhanden, kenntlich an der Inflexion im Gebiet von 36000 ν' und dem Maximum bei 45000 ν' . Die starke Verschleifung im Triengebiet kann möglicherweise durch eine bereits merkbare *Tyndall*-Absorption bewirkt sein. Die Auswertung ergibt 11,53% konjugierter Diene und 0,87% konjugierter Triene.

Von besonderer Wichtigkeit ist die Tatsache, daß im Präparat IIIb keine Grenzabsorption der isoliert-ungesättigten Fettsäuren mehr nachweisbar ist, ein Befund, der in Anbetracht der Bedeutung der Aussage auch bereits ausreichend statistisch gesichert werden konnte.

Präparat IIIa (Abb. 10): Wie im Spektrum von IIIb deutliche Konjugenmaxima, doch überwiegen die Konjudiene nicht so stark. Die Prozentgehalte betragen: 2,39% konjugierte Diene und 0,53% konjugierte Triene. Außerdem steigt der kurzweilige Kurvenast ab 47000 ν' wieder an, was auf die Anwesenheit von isoliert-ungesättigten oder einzelnen C=C-Bindungen schließen läßt.

3. Die IR-Absorptionsspektren

Als besonders wichtiges Kriterium für die Konstitution und Zusammensetzung der Ausgangssubstanz und der daraus bei der Wasserreaktion erhaltenen Produkte erwies sich wieder das infrarote Absorptionsspektrum.

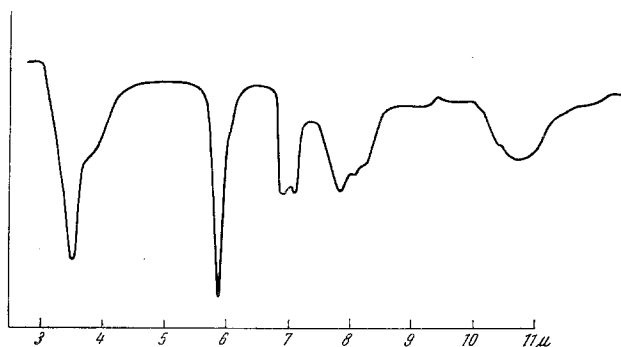


Abb. 11. IR-Absorptionsspektrum von I nach Biekert und Köhler

Auch diesmal gab Herr Prof. Dr. A. *Butenandt* mit großem Entgegenkommen die Erlaubnis zur Durchführung der Messungen an seinem Institut.

Die im folgenden wiedergegebenen Spektren wurden uns von Herrn Dr. E. *Biekert* in freundlichster Weise zur Verfügung gestellt.

Abb. 11 stellt das Spektrum von I dar, bei dem insbesondere auf die charakteristische COOH-Schwingung bei 5,9 und die C=C-Schwingung bei 10,75 μ und die Abwesenheit von OH-Schwingungsbanden hinzuweisen ist.

Dagegen läßt die Absorption von IIIb (Abb. 12) deutlich die Anwesenheit von OH-Banden (3 und 9,6 μ) erkennen, während die C=C-Bande bei 10,75 μ verschwunden ist.

Der gleiche Effekt ist auch im Spektrum von IIIa zu beobachten, nur noch wesentlich ausgeprägter. Hier überwiegt sogar die Intensität der OH-Bande bei $3\ \mu$ die der benachbarten C—H-Bande bei $3,5\ \mu$. Außerdem

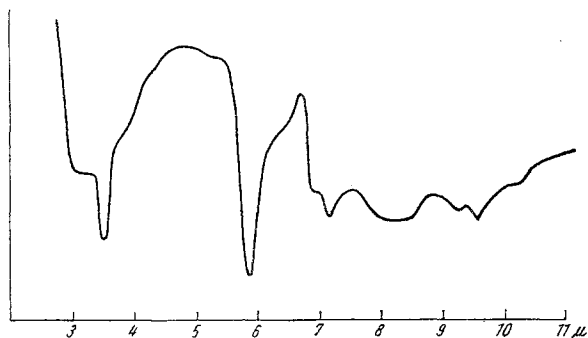


Abb. 12. IR-Absorptionsspektrum von IIIb nach *Biekert* und *Köhler*

aber zeigt die starke Frequenzverschiebung der Bande im Gebiet von $6\ \mu$ eine drastische Veränderung der COOH-Gruppe an (Abb. 13).

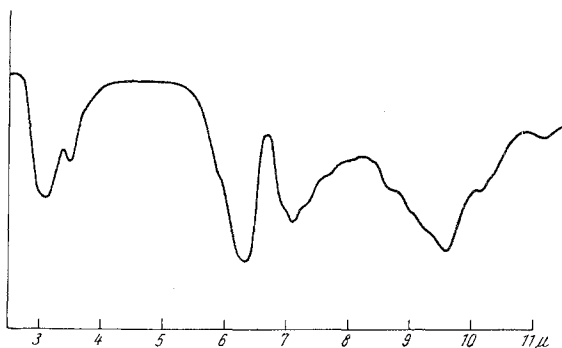


Abb. 13. IR-Absorptionsspektrum von IIIa nach *Biekert* und *Köhler*

Diskussion der bisherigen Ergebnisse

Überblicken wir das bisher gesammelte experimentelle Material, so ergeben sich bezüglich der Zusammensetzung der Reaktionsprodukte bei der Umsetzung von 9,12-Linolsäure mit destilliertem Wasser die in der Tabelle 3 angeführten Erkenntnisse.

Zu der in dieser Tabelle (S. 140) wiedergegebenen Übersicht sei noch folgendes ergänzend bemerkt: Während sich die Isolensäure und die Hydroxysäuren papierchromatographisch nach *Kaufmann* und *Nitsch*² völlig einwandfrei erkennen lassen (vgl. Abb. 2, 3 und 5), scheinen sich die Konjuensäuren diesem Nachweis zu entziehen. Im Chromatogramm von I und IIb (Abb. 1 und 2) könnten sie zwar ohne weiteres

Tabelle 3

Präparat	Nachgewiesene Bestandteile	Mengenmäßiger Anteil	Nachweismethodik
Ausgangsfettsäure I	9,12-Linolsäure . .	weitauß überwiegend	UV, Pa
	Konjudiensäuren	1,78%	UV
	Konjutriensäuren	0,36%	UV
Wasserunlösliches Reaktionsprodukt IIb	9,12-Linolsäure . .	geringer Rest	UV, Pa
	Konjudiensäuren .	12,37%	UV, Pa?
	Konjutriensäuren	0,48%	UV, Pa?
	Hydroxysäuren . .	erheblich	Pa, PJ
Wasserlösliches Reaktionsprodukt IIIb	Konjudiensäuren .	11,53%	UV
	Konjutriensäuren	0,87%	UV
	Hydroxysäuren . .	mindestens 80%	Pa, PJ, IR, OHZ
Wasserlösliches Reaktionsprodukt IIIa	Isol.-ständ. C=C.		UV
	Konjudiene	2,39%	UV
	Konjutriene	0,53%	UV
	Hydroxyverbindungen . .	mindestens 80%	IR, PJ

In dieser Tabelle bedeuten:

UV: Nachweis durch UV-Absorptionsspektrum;

IR: Nachweis durch IR-Absorptionsspektrum;

Pa: Nachweis durch papierchromatographische Methode nach *Kaufmann* und *Nitsch*²;

PJ: Nachweis durch Papiertest auf vicinale C—OH-Gruppen mittels KJO₄ und Stärke nach *Holasek* und *Winsauer*³;

OHZ: Nachweis durch Bestimmung der Hydroxylzahl.

in den Flecken bei $R_f = 0,36$ enthalten sein, sie fehlen aber vollständig bei IIIb (Abb. 3), wo sie jedoch auf Grund des UV-Spektrums (Abb. 9) in gleicher Menge vorhanden sind, wie in IIb. Nachdem triviale methodische Fehler sicher auszuschließen waren, sehen wir hierfür drei Erklärungsmöglichkeiten: Entweder eine besonders feste komplexartige Vereinigung von Hydroxy- und Konjuenfettsäuren, die Anwesenheit konjugiert-ungesättigter Hydroxyfettsäuren oder schließlich eine oxydative Veränderung der Konjuenfettsäuren während der Wanderung auf dem Papier, wobei sich die gebildeten Produkte ähnlich wie Hydroxyfettsäuren verhalten könnten. Hier gibt nun das auf S. 136 wiedergegebene Chromatogramm (Abb. 6) wichtige erste Hinweise: Bei den bereits auf S. 136 beschriebenen Flecken *F* handelt es sich sicher um Hydroxyfettsäuren (positive Reaktion mit Perjodatstärke, außerordentlich hoher R_f -Wert), während die nach einigen Stunden auftretende zentrale Braunfärbung auf Konjuensäuren schließen läßt (vgl. hierzu auch die Unterschrift zu Abb. 5 der 2. Mitteilung dieser Reihe!)¹.

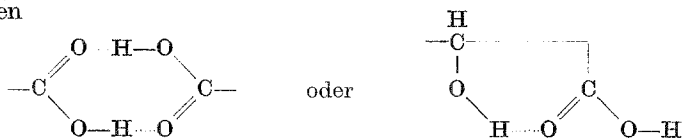
Eine oxydative Veränderung der in IIb und IIIb auf spektrometrischem Wege nachgewiesenen Konjuensäuren während der Wanderung auf dem Papier ist daher recht unwahrscheinlich, so daß sich die weiteren Untersuchungen auf eine Entscheidung zwischen erster und zweiter Erklärungsmöglichkeit (siehe oben) richten können. Diese für den Mechanismus der Wasserreaktion polyolefinischer Lipoide sehr wichtige Frage ist experimentell recht schwierig zu studieren und wir sind den Herrn Doz. Dr. A. Holasek und Dr. K. Winsauer (Med.-Chem. Inst., Univ. Graz, Vorstand Prof. Dr. H. Lieb) sehr zu Dank verpflichtet für ihre Bereitschaft zu einer gemeinsamen Untersuchung. Über das Ergebnis dieser gemeinsamen Arbeiten wird an dieser Stelle berichtet werden.

Der Tropfentest auf vicinale C—OH-Gruppen mit KJO₄ und Stärke hatte bei IIb, IIIb und IIIa ein außerordentlich stark positives Ergebnis und äußerte sich in Form rein weiß bleibender Flecken (vgl. die Abb. 5 der vorangegangenen Mitteilung)¹.

Für die Mikrohydroxylzahlbestimmung des Präparates IIIb sind wir Herrn Dr. K. Winsauer herzlich zu Dank verpflichtet; es ergab sich beim gewichtskonstant vorgetrockneten Präparat ein Wert von 7,18% OH.

Die in der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Untersuchungsergebnisse bestätigen somit eindeutig unsere bisherigen Ansichten über die Wasserreaktion: Dispergiert man entsprechend intensiv reinste 9,12-Linolsäure in reinstem, luftfreiem, bidestilliertem Wasser unter inertem Gas, so findet an den dispergierten Fetttropfchen offenbar eine Oberflächenreaktion statt: Es kommt zunächst zu einer Verschiebung der ursprünglich isoliert-ständigen C=C-Bindungen in die besonders reaktionsfähige konjugierte Stellung. Diese lagern dann OH an die Doppelbindungen an. Die gebildeten Hydroxysäuren sind wasserlöslich und gehen daher in echter Lösung in die Wasserphase über, wobei jedoch auch ein beträchtlicher Anteil der neu gebildeten konjugiert-ungesättigten Säuren mitgeht (Präp. IIIb).

Ein Teil der Hydroxy- und Polyensäuren (IIIa) erfährt weiters eine Veränderung an der COOH-Funktion, kenntlich an der Verschiebung der 6- μ -Bande auf 6,3 μ . Dieser Effekt könnte mit der Ausbildung von Chelaten



zu erklären sein. Da auch die COO⁽⁻⁾-Gruppe ein Maximum bei 6,3 μ besitzt, mußte die Frage geprüft werden, ob es sich bei dem erwähnten Teil des Reaktionsproduktes nicht etwa um Seifen handelte. Dies konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da die Reaktion mit Cu-Acetat eindeutig negativ ausfiel.

Im Inneren der dispergierten Fetttröpfchen (IIb) ist noch unveränderte Ausgangssubstanz (I) enthalten, die papierchromatographisch einwandfrei nachzuweisen ist.

Merkwürdigerweise verliert das Gemisch aus Hydroxy- und Konjuensäuren (IIIb) seine Wasserlöslichkeit weitgehend nach dem Eindunsten des Wassers, während der Anteil mit veränderter Karboxylgruppe (IIIa) leicht wasserlöslich bleibt.

Wir sind uns darüber im klaren, daß die bisherigen Versuche zunächst nur eine sehr grob orientierende Identifizierung der erhaltenen Reaktionsprodukte ermöglicht haben. Das Schergewicht der weiteren Untersuchungen wird sich vor allem auf eine analytisch-präparative Aufarbeitung der IIIb-Fettsäuren zu konzentrieren haben; hier ergibt sich die Frage, ob die Wasserreaktion zu einer einzigen Hydroxylverbindung oder zu mehreren, verschieden stark hydroxylierten Verbindungen geführt hat. Unerklärt ist ferner die Tatsache, daß die Konjuenverbindungen in IIIb nur UV-spektographisch, nicht aber papierchromatographisch nachweisbar sind. Hier wird zu entscheiden sein, ob es sich um eine komplexartige Verbindung zwischen Hydroxy- und Konjuensäuren, oder um die Anwesenheit von konjugiert-ungesättigten Hydroxysäuren handelt.

Schließlich bedarf noch die Änderung an der COO-Gruppe im IIIa-Präparat der weiteren Aufklärung.

Über den Mechanismus der „W-Reaktion“, zu der keine Zusätze irgendwelcher fremder Reagenzien notwendig sind, läßt sich heute sagen, daß sie zweifellos an den Doppelbindungen angreift, wobei eine intermediäre Verschiebung in die besonders reaktionsfähige konjugierte Form die essentielle Bedeutung der konjugierten Isomeren für den Eintritt des Hydroxyls in die Kette beweist. Hierüber wird noch gesondert zu berichten sein.

Wir erlauben uns, an dieser Stelle für beratende Diskussionen und Förderung in jeder Hinsicht aufrichtig zu danken dem Vorstand des Physiol.-Chem. Institutes u. d. Max-Planck-Institutes d. Univ. München, Herrn Prof. Dr. phil. et med. h. c. *A. Butenandt*, sowie seinen Mitarbeitern Herrn Dr. *E. Bickert* und Frl. *I. Köhler*, dem Vorstand unseres Institutes, Herrn Prof. Dr. *O. Kratky*, dem Vorstand d. med.-chem. Institutes, Herrn Prof. Dr. *H. Lieb* und Herrn Doz. Dr. *A. Seher*, Univ. Münster/Westf.

Unser Dank gilt ferner der Nitritfabrik-A. G., Feldkirchen b. München für die großzügige Unterstützung aller unserer Arbeiten, sowie der Rockefeller Foundation für wertvolle Hilfe durch Bereitstellung verschiedener Meßapparaturen.