

Die UR-spektrometrische Bestimmbarkeit des Hydroxylgehaltes in C₁₈-Fettsäuren und deren Estern*

Von

H. Bayzer, E. Schauenstein und K. Winsauer

Aus den Instituten für Physikalische Chemie und Medizinische Chemie der
Universität Graz

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 25. Juli 1957)

Verschieden hoch hydroxylierte Stearinsäuren wurden UR-spektrophotometrisch vermessen und das Verhältnis der Intensitäten von OH- und CH-Valenzschwingung ermittelt, wobei sich ein gesetzmäßiger Zusammenhang mit der Zahl der eingeführten Hydroxylgruppen ergab. Die daraus abzuleitenden Möglichkeiten einer Bestimmung des Hydroxylanteiles in Substanzen mit unbekanntem Hydroxylgehalt werden besprochen.

Problemstellung

In vorangegangenen Untersuchungen¹ des einen von uns konnte festgestellt werden, daß beim Behandeln mehrfach ungesättigter Fette mit Wasser Produkte erhalten werden, die sich durch Wasserlöslichkeit und den Gehalt von Hydroxylgruppen auszeichnen. An Hand der stark positiven Reaktion dieser Substanzgemische mit KJO₄ und Stärke² durfte angenommen werden, daß es sich um nachbarständige OH-Gruppen handelt, doch war es bisher unmöglich, zu näheren Aussagen über die

* Die vorliegende Arbeit sei Herrn Prof. Dr. F. Wessely aus Anlaß seines 60. Geburtstages ergebenst gewidmet.

Mit den Autoren entbieten alle Angehörigen des Institutes für Physikalische Chemie und des medizinisch-chemischen Institutes der Universität Graz dem Jubilar die herzlichsten Wünsche. Die Institutsvorstände: O. Kratky und H. Lieb.

¹ E. Schauenstein, O. Gold und B. Pibus, Mh. Chem. 87, 144 (1956). — E. Schauenstein und J. H. Biheller, ibid. 87, 158 (1956); 88, 132 (1957). — E. Schauenstein, Naturwiss. 43, 372 (1956).

² K. Winsauer, Mikrochim. Acta [Wien] 1957, 480.

Anzahl der an die Doppelbindungen angelagerten Hydroxyle zu gelangen. Dies hatte seinen Grund darin, daß die zu untersuchenden Produkte in keinem der für die üblichen OH-Bestimmungen erforderlichen Lösungsmittel löslich waren.

Nachdem nun bekannt ist, daß die Intensität der im UR im Gebiet von 3μ auftretenden OH-Schwingungen durch die Zahl der im betreffenden Molekül anwesenden OH-Gruppen stark beeinflusst wird, erschien es aussichtsreich, zu versuchen, ob man bei einer Reihe entsprechender Modellkörper mit genau bekanntem OH-Gehalt unter Umständen zu einer Art „Eichkurve“ kommen könnte, die es erlauben würde, die Abhängigkeit der Intensität der OH-Schwingung vom Hydroxylgehalt der Substanz exakter und womöglich auch angenähert quantitativ zu erfassen.

Präparatives

Um aus den zu erwartenden Ergebnissen Rückschlüsse auf die eigentlichen Untersuchungssubstanzen ziehen zu können, mußten als Modellkörper Verbindungen ausgewählt werden, deren sonstige chemische Konstitution der der Untersuchungspräparate möglichst nahe kommen sollte. Wir wählten daher hydroxylierte Fettsäuren der C_{18} -Reihe.

Es wurden 12-Hydroxystearinsäure, deren Methylester, 9,10-Dihydroxystearinsäure, 9,10,12,13-Tetrahydroxystearinsäure und 9,10,12,13,15,16-Hexahydroxystearinsäure hergestellt.

Zur Darstellung des 12-Hydroxystearinsäure-methylesters³ wurde von reinem Rizinusöl ausgegangen. Das Glycerid wurde mit absol. Methanol und Schwefelsäure in inerter Atmosphäre umgeestert. Nach Alkoholyse und anschließender Neutralisation wurde der Alkohol abdestilliert, die entstandenen Methylester vom Glycerin abgetrennt und der fraktionierten Destillation unterworfen. Der gewonnene Rizinolsäure-methylester (Sdp. 178 bis 180° C, 1 mm Hg) wurde in methanolischer Lösung mit *Raney-Nickel* hydriert und der entstandene 12-Hydroxystearinsäure-methylester aus Äthanol und Äther mehrfach umkristallisiert (Schmp. 55,4 bis 56° C)⁴. Durch Verseifung wurde die freie Säure erhalten (Schmp. 78 bis 78,5° C).

Zur Herstellung der mehrfach hydroxylierten Säuren wurde die Methode nach *Hazura*⁵ angewandt. Die Herstellung der Di- und Tetrahydroxystearinsäure erfolgte aus Ölsäure bzw. Linolsäure puriss., die der Hexahydroxystearinsäure aus Leinölsäuren.

Zur Gewinnung der Säuren wurde Leinöl mit n-alkohol. Kalilauge unter Durchleiten von Stickstoff bei 70 bis 80° C unter Rückfluß ver-

³ A. Grün und M. Woldenberg, J. Amer. Chem. Soc. **31**, 501 (1909).

⁴ Alle Schmp. wurden auf dem *Koflerschen* Heitzisch bestimmt.

⁵ K. Hazura, Mh. Chem. **8**, 260 (1887); **9**, 469, 472 (1888).

seift und anschließend das Unverseifbare durch Extraktion mit Petroläther entfernt. Durch Ansäuern und neuerliche Extraktion wurden die freien Leinölsäuren isoliert.

Methodik der Hydroxylierung ungesättigter Säuren: 3 g der ungesättigten Säuren werden mit 28% wäbr. Kalilauge bei 0° C neutralisiert. Zu der mit 200 ml Eiswasser verdünnten Seifenlösung läßt man unter Rühren bei 0° C langsam 200 ml einer 1,5-proz. Kaliumpermanganatlösung fließen. Nach 10 Min. wird Schwefeldioxydgas bis zur völligen Auflösung des entstandenen Braunsteins eingeleitet. Di- und Tetrahydroxystearinsäure werden gefällt, während die Hexahydroxystearinsäure in Lösung bleibt. Die wasserunlöslichen Oxydationsprodukte werden abfiltriert, gewaschen, getrocknet und zur Entfernung der nicht oxydierten Säuren mit Petroläther behandelt. Der Rückstand wird im Soxhlet-Apparat mit Äther extrahiert. Dihydroxystearinsäure geht in Lösung.

Durch Umkristallisieren aus 96proz. Äthanol wird die Dihydroxystearinsäure gereinigt (Schmp. 128 bis 129° C).

Die in Äther ungelöst gebliebene Tetrahydroxystearinsäure wird aus 30proz. Äthanol umkristallisiert (Schmp. 169 bis 170° C). Das schwefelsaure wäbr. Filtrat wurde mit einem Gemisch von Bariumcarbonat-Natriumcarbonat (1 : 1) so lange versetzt, bis sich kein CO₂ mehr entwickelte und dann am Wasserbad zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde mit absol. Äthanol heiß extrahiert. Die dabei in Lösung gegangenen Hydroxysäuren wurden durch Eindampfen vom Alkohol befreit. Die Hexahydroxystearinsäure wurde mit heißem Wasser ausgezogen und mehrfach aus heißem Wasser umkristallisiert (Schmp. 198 bis 200° C).

Die Reinheit der Säuren wurde durch Bestimmung der Hydroxylgruppen und durch Papierchromatographie² überprüft.

Meßtechnik

Sämtliche Messungen wurden mit einem *Perkin-Elmer*-Doppelstrahlenspektrometer, Mod. 21, durchgeführt.

In Anbetracht der besonderen Löslichkeitseigenschaften der Hydroxyfettsäuren und der später zu messenden wasserlöslichen Reaktionsprodukte wurde auf Lösungsaufnahmen verzichtet und die Modellpräparate in festem Zustand aufgenommen.

Wir sind uns durchaus darüber im klaren, daß für eine exakte quantitative Bestimmung der Hydroxylgruppen ein Arbeiten in verd. Lösung notwendig ist, um Komplikationen zu vermeiden, die durch Assoziation entstehen.

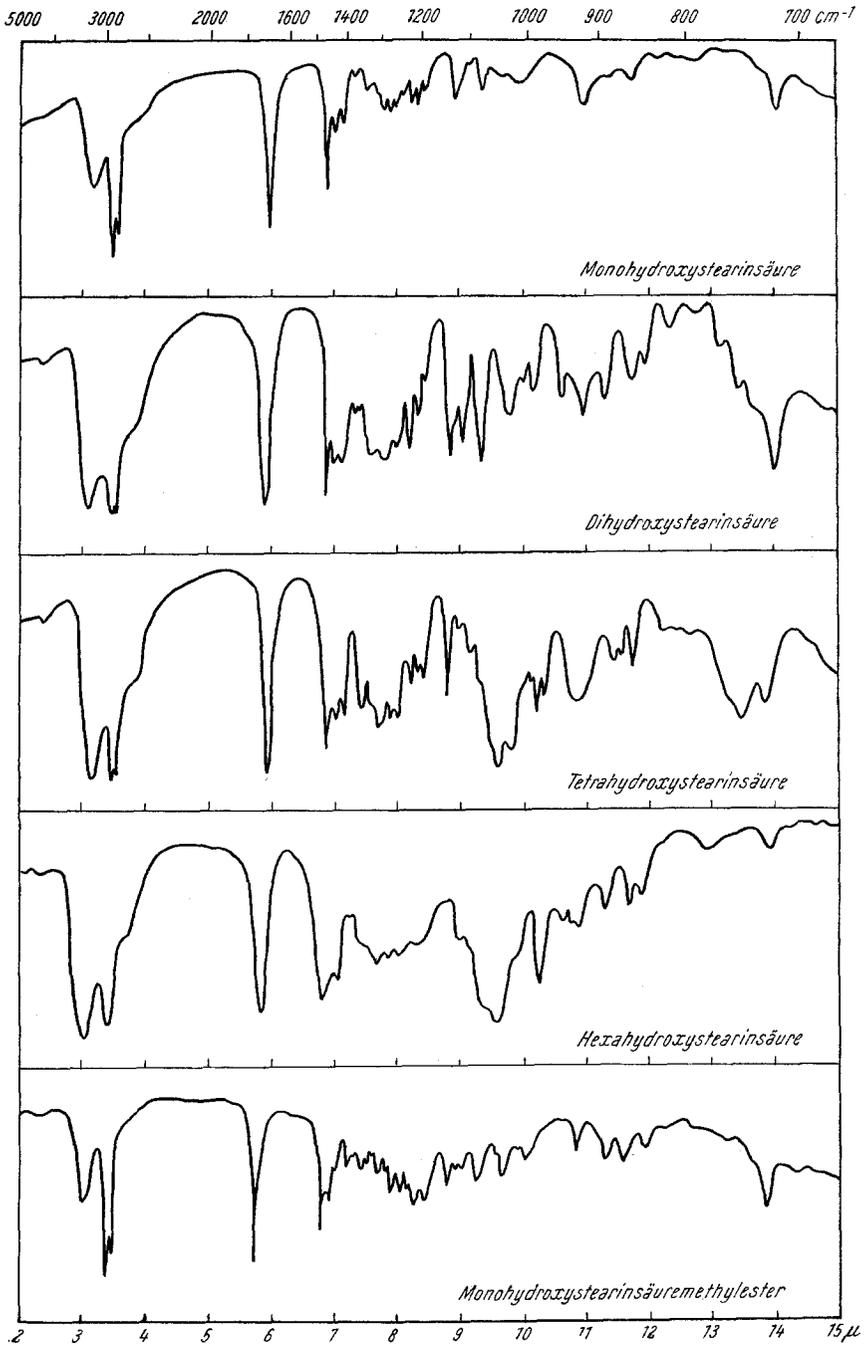


Abb. 1. UR-Absorptionsspektren verschieden hoch hydroxylierter Stearinsäuren und deren Methylester

Für unsere spezielle Fragestellung erwies sich jedoch nach Standardisierung der Bedingungen die Auswertung der Absorptionsbanden der assoziierten OH-Gruppen als gut brauchbar.

Zur Vermessung kamen Präparate, die dadurch erhalten wurden, daß jeweils einige Milligramm der Substanz zwischen NaCl-Platten auf der *Kofler*-Heizbank vorsichtig zum Schmelzen gebracht wurden. Nach dem Erkalten ergaben sich klare, homogene Schichten, die sich gut spektrometrieren ließen. Die dabei erhaltenen Spektren sind in Abb. 1 dargestellt.

Diskussion und Auswertung

Zunächst seien die Zuordnungen der wichtigsten Einzelbanden der Modellspektren in der folgenden Tabelle 1 übersichtlich zusammengestellt:

Tabelle 1

cm ⁻¹	
3200—3300	Valenzschwingung der assoziierten OH-Gruppe
2920	Antisymmetrische CH-Valenzschwingung der CH ₂ -Gruppe
2850	Symmetrische CH-Valenzschwingung der CH ₂ -Gruppe
Zirka 2700	OH-Valenzschwingung der assoziierten Carboxylgruppen
1735	C=O-Schwingung gesättigter Ester
1680—1700	C=O-Schwingung assoziierter, gesättigter, aliphatischer Säuren
1465	CH-Deformationsschwingung der CH ₂ -Gruppe
1410	CH-Deformationsschwingung der einer Carboxylgruppe benachbarten CH ₂ -Gruppe
Nah 1050	C—O-Valenz- oder OH-Deformationsschwingung
720	CH ₂ -Rocking-Schwingung in Ketten vom Typ —(CH ₂) _n — (n ≥ 4)

Von besonderem Interesse im Hinblick auf die Problemstellung der vorliegenden Arbeit erschien nun die Abhängigkeit der Intensität der OH-Banden vom Hydroxylgehalt der einzelnen Modellkörper. Schon die qualitative Betrachtung der einzelnen Modellspektren ergibt offenkundig, daß hier ein Zusammenhang besteht und es erhebt sich die Frage, in welcher Weise dieser Zusammenhang den Spektren am richtigsten zu entnehmen wäre. Messungen der Absolutintensitäten erfordern bekanntlich eine Reihe spezieller Kautelen, die bei der Messung von Festkörpern, wie sie im vorliegenden durchgeführt wurde, nicht zu berücksichtigen sind.

Es wurde daher das Verfahren der Messung der relativen Bandenintensitäten angewendet. Hiezu mußte erst eine geeignete Bezugsbande ausfindig gemacht werden, deren Intensität bei allen untersuchten Modellsubstanzen möglichst konstant angenommen werden durfte. Als solche wurde zunächst die der OH-Bande (3130 cm⁻¹) unmittelbar benachbart liegende C—H-Valenzschwingung bei 2920 cm⁻¹ ausersehen.

Das Verfahren besteht nunmehr darin, die relativen Extinktionen von OH- und CH-Valenzschwingung bei den einzelnen Modellkörpern zu ermitteln. Diese Aufgabe löst man am besten durch Bestimmung der Flächenintegrale der betreffenden Banden. Dies war in unserem speziellen Fall jedoch kaum durchführbar, da der Verlauf der Einzelbanden, insbesondere der OH-Bande, infolge des zum Teil sehr verschmierten Kurvenverlaufes nicht sicher genug ermittelt werden konnte.

Außerdem ist anzunehmen, daß sich auch noch eine dritte Bande, nämlich die der Carboxyl-OH-Schwingung, am Flächenintegral zwischen 2500 und 3400 cm^{-1} maßgeblich beteiligt, und zwar in gleichfalls nicht sicher erfaßbarem Ausmaße.

Es erschien daher aussichtsreicher, die im Absorptionsmaximum registrierten E -Werte beider Banden unmittelbar zueinander in Beziehung zu setzen. Es ergaben sich hiebei die in der folgenden Tabelle 2 angeführten Quotienten.

Tabelle 2. Hydroxystearinsäuren

	Mono-	Di-	Tetra-	Hexa-
				1,23
				1,16
	0,37	0,81	1,05	1,18
	0,40	0,930	1,03	1,15
	0,41	0,84	1,02	1,17
	0,34	0,83	1,04	1,14
	0,50	0,88	1,05	1,14
	0,43	0,90	1,03	1,22
	0,47	0,88	1,03	1,17
	0,51	0,86	1,04	1,12
	0,49	0,90	1,03	1,20
	0,46	0,93	1,03	1,19
	0,39	0,84	1,03	1,16
	0,47	0,95	1,04	1,22
	0,53	0,95	1,03	1,16
	0,43	0,96	1,01	1,16
Mittel für $E_{\text{OH}}/E_{\text{CH}} \dots$	0,443	0,885	1,033	1,19

Die für die einzelnen Säuren erhaltenen, gemittelten Extinktionsquotienten sind in Abb. 2 graphisch dargestellt.

Wenn auch auf eine theoretische Interpretation der Kurve derzeit noch verzichtet werden muß, so läßt sich doch aussagen, daß zwischen OH-Gehalt und dem im vorstehenden näher definierten E -Quotienten ein offenkundiger, gesetzmäßiger Zusammenhang besteht. Dabei fällt besonders die Tatsache auf, daß der Quotient auf die Einführung der *ersten beiden* OH-Gruppen in das Stearinsäuremolekül viel stärker anspricht, als auf den Übergang zu den höher hydroxylierten Säuren.

Die mittleren Fehler der jeweiligen Mittelwerte der *E*-Quotienten bringt Tabelle 3.

Tabelle 3

Zahl der eingeführten OH-Gruppen	F_m
1	± 0,013
2	± 0,013
4	± 0,003
6	± 0,003

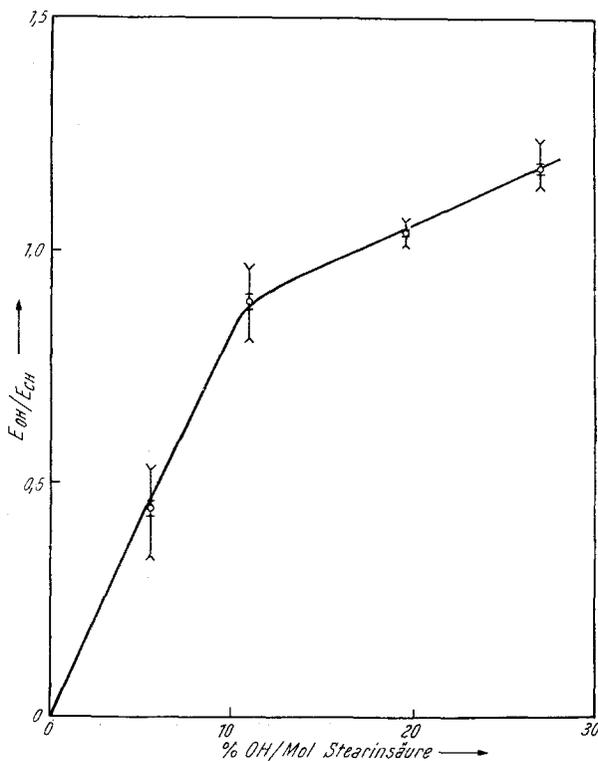


Abb. 2. Die Abhängigkeit des Quotienten E_{OH}/E_{CH} vom Hydroxylgehalt. — mittlerer Fehler der Einzelwerte; >—< beobachtete größte Schwankungen der Einzelwerte

Man sieht, daß die Unterschiede zwischen den für die einzelnen Säuren ermittelten *E*-Quotienten durchaus reell sind und daß somit die Kurve der Abb. 2 als „Eichkurve“ zur UR-spektrometrischen Bestimmung des Hydroxylgehaltes von Fettsäuren der C₁₈-Reihe herangezogen werden kann.

Am Beispiel des Methylsters der Monohydroxystearinsäure untersuchten wir nunmehr die Frage, ob sich etwa auch die niederen Alkylster der C₁₈-Hydroxylsäuren für diese OH-Bestimmung eignen.

Wir erhielten einen *E*-Quotienten von 0,42 als Mittel von 16 Einzelmessungen. Dieser Wert ist mit dem für die Monohydroxysäure, wie Tabelle 2 zeigt, praktisch identisch, womit die angeschnittene Frage eindeutig zu bejahen ist.

Zieht man nun das hier entwickelte Verfahren zur Bestimmung der OH-Gruppen in Untersuchungspräparaten unbekannter Zusammensetzung heran, so muß man sich darüber im klaren sein, daß nur bei einheitlich zusammengesetzten Präparaten wirklich eindeutige Aussagen zu erwarten sein können.

Hat man es jedoch mit Gemischen zu tun, so müssen die Ergebnisse notwendigerweise vieldeutig sein. In solchen Fällen wird man daher eine zweite Analysenmethode heranziehen müssen, wie etwa die quantitative Papierchromatographie⁶, die präparative Elektrophorese und ähnliche Verfahren.

Wenn auch hiedurch der Anwendungsbereich der UR-spektrometrischen OH-Bestimmung in den C₁₈-Fettsäuren bzw. deren Estern eingeschränkt wird, so darf doch nicht übersehen werden, daß der hiemit aufgezeigte Zusammenhang zwischen dem *E*-Quotienten und dem Hydroxylgehalt der Substanz auch bei Gemischen die unmittelbare Aussage über den relativen OH-Gehalt des Mischpräparates ermöglicht. Dies kann bei biologischem Untersuchungsmaterial unter Umständen von beträchtlichem Interesse sein.

Wir sind der *Rockefeller*-Foundation für die Bereitstellung der gesamten, überaus wertvollen Meßapparaturen, der *Nitritfabrik-A.G.*, Feldkirchen bei München, für großzügige Unterstützung und der *Sonnleitner*-Stiftung der Österr. Akademie der Wissenschaften in Wien für die Gewährung eines Forschungsstipendiums zu großem Dank verpflichtet.

⁶ *H. P. Kaufmann* und *W. Nitsch*, *Fette, Seifen, Anstr.* 58, 234 (1956). — *A. Seher*, *ibid.* 58, 401 (1956).