

Über die Reaktion von 9,12-Linolsäureäthylester in Wasser

Von

H. Bayzer, J. Biheller, H. Gaisch und E. Schauenstein

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Graz

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 21. Februar 1958)

Auch die veresterte 9,12-Linolsäure (9,12-Äthyllinolat) zeigt den als „Wasserreaktion“ bezeichneten Effekt.

Das Reaktionsprodukt ist bisher gekennzeichnet als ein Gemisch von Ester und freier Carbonsäure, mit beträchtlichem Gehalt an Hydroxylgruppen, etwa 5% konjugierten Dienen und einer Wasserlöslichkeit, die maximal 5 bis 7 g/l beträgt.

Mittels papierchromatographischer Trennung, mit Wasser als entwickelndem Medium, läßt sich das Reaktionsprodukt in drei Hauptfraktionen zerlegen, von denen zwei den weitaus überwiegenden Anteil ausmachen. Die eine (Start) hat Lipidcharakter, ist reich an C=C-Bindungen, zeigt keine vic. Hydroxylgruppen und ist als solche wasserunlöslich. Die zweite ($R_f = 0,74$) läßt im Papiertest keine C=C-Bindungen, jedoch reichlich Hydroxylgruppen erkennen, ist wasserlöslich und wirkt allem Anschein nach als Lösungsvermittler für die erstgenannte Komponente.

Einleitung

Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeitsreihe^{1,2} hatten ergeben, daß sich nach dem Emulgieren von reiner 9,12-Linolsäure in reinstem Wasser und Abtrennen der emulgierten Öltröpfchen in der Wasserphase ein in echte Lösung gegangener Anteil nachweisen läßt. Dieser Anteil besteht aus konjugiert-ungesättigten Isomeren und — zum größten Teil — aus mehrfach hydroxylierten C₁₈-Säuren.

Hinsichtlich des mutmaßlichen Reaktionsablaufes konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die in der wäßrigen Phase eingetretene

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

² E. Schauenstein und J. H. Biheller, Mh. Chem. **88**, 132 (1957).

Reaktion an der Oberfläche der emulgierten Tröpfchen im Sinne einer primären Konjugation der ursprünglichen isolierten C=C-Bindungen einsetzt, in deren Gefolge es sodann sekundär zur Anlagerung von OH an die gebildeten, besonders reaktionsfähigen konjugierten C=C-Bindungen kommt.

Das Reaktionsprodukt wurde als eine Art Komplexverbindung zwischen konjugiert-ungesättigten und hydroxylierten Fettsäuremolekeln aufgefaßt, wobei die letztgenannten für die erstgenannten gewissermaßen als Lösungsvermittler dienen könnten.

Der hier kurz skizzierte Effekt erschien uns deshalb von besonderem Interesse, weil die Bedingungen unter denen er eintritt, so einfache und milde sind, das mit ihrer Realisierung auch im lebenden Organismus mit hoher Wahrscheinlichkeit zu rechnen sein dürfte³. Damit wäre ein überraschend einfaches Prinzip aufgezeigt, dessen sich der Organismus bedienen könnte, um ungesättigte Lipoide aller Art in wasserlösliche Form zu bringen.

Freilich ist hierfür Voraussetzung, daß die geschilderte Reaktion nicht nur mit freien Fettsäuren eintritt, die sich in vivo verhältnismäßig selten und in geringen Mengen^{4, 5, 6} finden, sondern auch mit den sehr viel häufiger und in größeren Mengen auftretenden Estern. Das Studium dieser wesentlichen Frage ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Kennzeichnung der verwendeten Ausgangssubstanz

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir den Äthylester der 9,12-Linolsäure. Das Präparat stammte von der Fa. *Th. Schuchardt* (München). Es enthielt keine nachweisbaren anorganischen Bestandteile und, wie das Infrarotspektrum (Abb. 4) zeigt, keine nachweisbaren Hydroxyverbindungen. Dieses kommt auch in den Testen mit KJO_4 und $Fe(CNS)_3$, die beide negativ ausfielen, klar zum Ausdruck. Die UV-spektrographische Untersuchung der Substanz (Abb. 2, Kurve 1) ließ das Vorhandensein von 0,16% konjugierten Trienen und 1,67% konjugierten Dienen erkennen, entsprechend der Stufe zwischen 35.600 und 37.000 ν' und dem scharfen Maximum bei 43.300 ν' .

Versuchsmethodik

Es wurden nun entsprechende Mengen des Esters mit einem vielfachen Überschuß reinsten destillierten Wassers 7 Stdn. lang feinst dispergiert. Die wäßrige Phase konnte hier jedoch nicht, wie bei der Linolsäure, bis

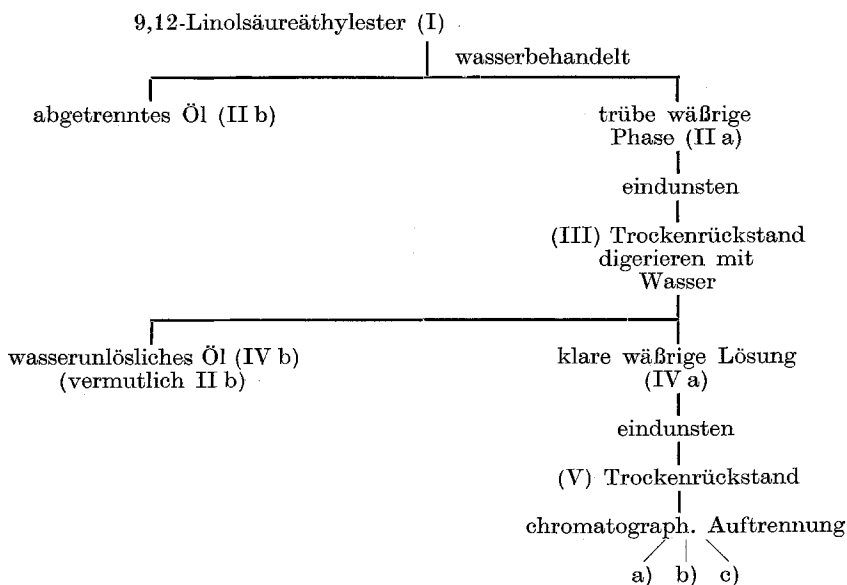
³ *E. Schauenstein*, *Naturwiss.* **43**, 372 (1956).

⁴ *V. P. Dole*, *J. clin. Invest.* **35**, 150 (1956).

⁵ *R. Gordon*, *A. Cherkes* und *H. Gates*, *ibid.* **36**, 810 (1957).

⁶ *R. Gordon* und *A. Cherkes*, *ibid.* **35**, 206 (1956).

zur Abwesenheit auch mikroskopischer Tröpfchen geklärt werden. Um nun doch eine völlig klare wäßrige Lösung der wasserlöslichen Reaktionsprodukte zu erhalten, wurde die trübe wäßrige Phase lediglich von dem an der Oberfläche schwimmenden Öl abgetrennt und im Vak. unter Stickstoff bei 50° Badtemperatur zur Trockne gebracht. Der gelb gefärbte Trockenrückstand, der von honigartiger Konsistenz war, wurde nun ungefähr 8 Stdn. bei 37° mit Wasser digeriert, so daß die wasserlöslichen Bestandteile in Lösung gehen konnten, sich jedoch keine neuerliche Emulsion bildete. Der restliche, wasserunlösliche Anteil ließ sich nach raschem Zentrifugieren aus der nun völlig klaren Lösung entfernen, an der nun alle weiteren Untersuchungen ausgeführt wurden. Das in der vorangegangenen Arbeit² für die Linolsäure angegebene Arbeitsschema wurde demnach folgendermaßen abgeändert:



(Va): R_f -Wert: 0, enthält C=C, wasserunlöslich.

(Vb): R_f -Wert: 0,72—0,74, wasserlöslich, enthält OH.

(Vc): Frontsubstanz, enthält reichlich OH, noch nicht näher untersucht.

Untersuchungen am wasserlöslichen Reaktionsprodukt

a) *Bestimmung des Trockenrückstandes V von IVa*: Die bei zahlreichen Rühransätzen erhaltenen Lösungen IVa erwiesen sich in allen Fällen als echte Lösungen eines bei der Wasserreaktion gebildeten Reaktionsproduktes. Im einzelnen wurden folgende Trockenrückstände ermittelt:

Abb. 1 stellt die Beziehung zwischen proz. Ausbeute von V, bezogen auf die eingesetzte Menge Linolsäureäthylesters I und angewendetem Öl-Wasser-Verhältnis dar. Die Kurve zeigt, daß die erzielten Ausbeuten in eindeutiger Weise vom gewählten Verhältnis Öl : Wasser bestimmt werden: Sie nehmen bis zu einem Verhältnis von 1 : 2400 praktisch linear zu. Bei weiterer Erhöhung der Wassermenge ist keine wesentliche Änderung mehr zu erwarten.

Tabelle 1

Angesetztes Mischverhältnis Öl : Wasser	Trockenrückstand in g aus 400 ml IV a	% in bezug auf I
1 : 100	0,105	2,6
1 : 400	0,050	5,0
1 : 400	0,054	5,4
1 : 800	0,050	10,0
1 : 800	0,069	13,7
1 : 1600	0,050	20,0
1 : 1600	0,058	22,9
1 : 2400	0,050	28,0
1 : 2400	0,043	26,0
1 : 8000	0,013	25,3

Tab. 1 führt eine weitere bemerkenswerte Tatsache vor Augen: Abgesehen von den beiden extremen Mischungsverhältnissen 1 : 100 und 1 : 8000, stellt sich bei sämtlichen dazwischenliegenden Öl-Wasser-Mischungsverhältnissen stets eine praktisch konstante Konzentration der wäßrigen Phase am wasserlöslichen Reaktionsprodukt ein.

Dies zeigt offenkundig, daß die gebildeten Reaktionsprodukte in der wäßrigen Reaktionsphase eine ganz bestimmte, wohldefinierte Löslichkeit besitzen müssen, unabhängig von der jeweils eingesetzten Ölmenge. Hiedurch muß es zwangsläufig zu der beobachteten Steigerung des relativen Umsatzes bei kleinen Ölmenge kommen. Besonders zu erwähnen bleibt

ferner die Tatsache, daß die beobachtete „Umsatzkonzentration“ von rund 0,05g/400ml noch keineswegs der maximalen Löslichkeit des wasserlöslichen Reaktionsproduktes entspricht, sondern nur etwa $\frac{1}{40}$ bis $\frac{1}{50}$ davon beträgt.

Soweit die bisherigen Versuche erkennen lassen, zeigt somit auch die veresterte, mehrfach ungesättigte C₁₈-Säure die Reaktion mit dem Wasser, wie sie zunächst nur bei der freien Säure beobachtet werden konnte. Damit kann als erwiesen gelten, daß die Reaktion eindeutig auf die Anwesenheit der C=C-Doppelbindungen zurückzuführen ist, mit der freien Carboxylgruppe jedoch nichts zu tun hat. Damit ist der erste Punkt der

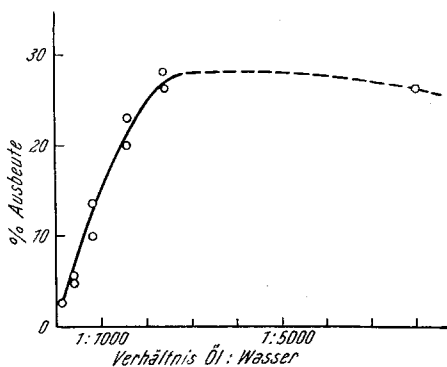


Abb. 1

eingangs aufgeworfenen Fragestellung geklärt und die Möglichkeit aufgezeigt, daß die Reaktion auch in vivo überall dort auftreten kann, wo ungesättigte Fettsäureester mit dem Wasser in Berührung kommen. Auch hinsichtlich des Umsatzes zeigen sich zwischen freier und veresterter Säure keine wesentlichen Unterschiede, wie die folgende Gegenüberstellung zeigt:

Tabelle 2

	Verhältnis Öl : Wasser	Rührzeit Stdn.	Ausbeute g	Eingesetzte Menge I
Linolsäure	1 : 200	4,5	0,031	2 g
Linolsäureester	1 : 400	7	0,05	1 g

b) *UltraviolettabSORptionsspektren*: Die UV-Spektren der aus Linol-säureäthylester durch die Wasserreaktion gewonnenen Produkte sind den UV-Spektren der analog aus Linol-säure gewonnenen Substanzen prinzipiell sehr ähnlich, zeigen aber doch einige Unterschiede.

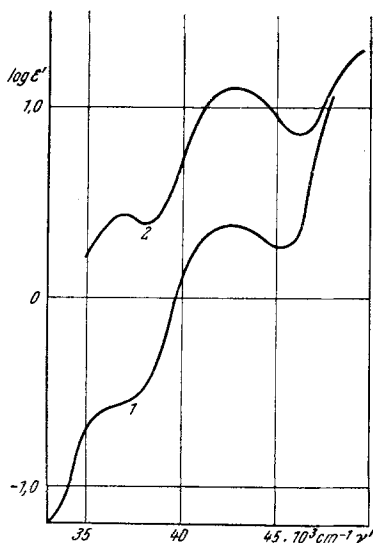


Abb. 2

Auch hier weisen die Kurven einen durchaus klaren Aufbau und gut ausgebildete Maxima auf. Die folgenden Abbildungen 2 und 3 bringen die Absorptionsspektren der Präparate I, II b und IV a, aus denen sich folgende Aussagen ergeben:

Präparat I (Abb. 2, Kurve 1): Wie bei der freien Säure, ist auch hier eine Überlagerung mehrerer Absorptionskomponenten zu erkennen: Die Schulter im Gebiet von 36.000 ν' gehört den dreifach, das gut ausgebildete Maximum bei 43.000 ν' den zweifach konjugiert-ungesättigten Ester-molekülen an. Die daran anschließende steile Grenzabsorption entspricht dem ansteigenden Ast des Maximums der isoliert-ungesättigten Ester-moleküle. Die quantitative Auswertung der beiden erstgenannten Banden ergibt:

0,16% konjugierter Triene
1,67% konjugierter Diene.

Somit fallen die primär anwesenden konjugierten Isomeren neben den, zu rund 98% vorhandenen, zweifach isoliert-ungesättigten Molekülen mengenmäßig nicht ins Gewicht.

Präparat IIb (Abb. 2, Kurve 2): Im Vergleich zum Ausgangspunkt I zeigt das Spektrum qualitativ gleiche Zusammensetzung, jedoch erhebliche quantitative Unterschiede: Die Intensitäten der den Konjugierten zuzuordnenden Banden haben, genau wie bei Verwendung der freien Säure^{1, 2}, erheblich zugenommen. Dementsprechend sind auch die Banden selbst, insbesondere

die Trienbande, viel schärfer geworden. Die Auswertung ergibt folgende durchschnittlichen Prozentgehalte:

1,6% konjugierter Triene
8,7% konjugierter Diene.

Der Vergleich mit den im Ausgangsmaterial festgestellten Konjugen-Gehalten ergibt, daß die dreifach-ungesättigten Systeme an der Isomerisation weitaus stärker beteiligt sind als die Diene. Hier gibt sich ein deutlicher Unterschied gegenüber der Linolsäure zu erkennen, bei der die Isomerisation praktisch nur die zweifach-ungesättigten Systeme betraf, während die Triene fast unverändert blieben^{1, 2}. Außer den eben behandelten Konjugenbanden findet sich, wie bei I, der steile Ast im kurzwelligen Gebiet, der den Isolenen zukommt.

Präparat IVa (Abb. 3): Das Spektrum dieses Präparates läßt einen sehr deutlichen Unterschied zum entsprechenden Präparat der Linolsäure^{1, 2} (IIIb) erkennen: Während bei IIIb der Linolsäure keine Anwesenheit von isoliert-ungesättigten Anteilen festzustellen war (kein Ansteigen der Kurve im kurzwelligen Gebiet), läßt IVa des Esters ein Vorhandensein isoliert-ungesättigter Estermoleküle durch einen leichten Anstieg der Kurve im kurzwelligen Bereiche erkennen. Auch die Anteile an konjugierten Dienen sind hier geringer als bei IIIb der Linolsäure. Der Gehalt an Konjugierten errechnet sich im Mittel zu 5,0%, der an Konjugierten zu 1,1%.

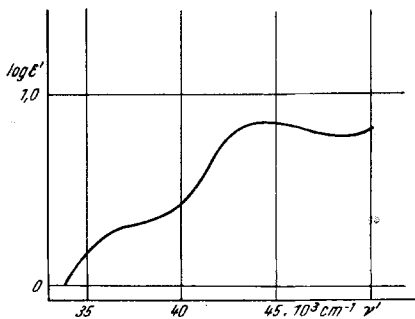


Abb. 3.

c) *UR-Absorptionsspektren*: Die Aufnahmen wurden mit einem *Perkin-Elmer-Doppelstrahlgerät*, Modell 21, ausgeführt. Die Substanzen wurden, je nach Konsistenz, entweder in kapillarer Schicht zwischen zwei Steinsalzplatten oder als Aufstrichpräparate aufgenommen. Vor jeder Messung wurden die Präparate im Vak. über P_2O_5 bis zur völligen Entfernung des anhaftenden Wassers getrocknet.

In Abb. 4 ist das UR-Spektrum unseres Ausgangsproduktes, des Linolsäureäthylesters (I) wiedergegeben. Die folgende Tabelle 3 bringt eine Zuordnung der wichtigsten Banden.

Das Spektrum ermöglicht folgende, für die spätere Diskussion der UR-Spektren der Reaktionsprodukte wesentliche Aussagen: Die Carboxylgruppe liegt vollständig verestert vor und es sind keine Hydroxylverbindungen nachweisbar. — Der ungesättigte Charakter der Verbindung äußert sich einerseits in der Schulter bei $3,30 \mu$ (3030 cm^{-1}), die der CH-Valenzschwingung der Gruppierung $-\text{HC}=\text{CH}-$ zukommt (in Abb. 4 und 5 infolge der notwendigen Maßstabverkleinerung kaum sichtbar), andererseits in den Banden zwischen 10 und $10,6 \mu$, die den $=\text{CH}$ -Waggingschwingungen zugeschrieben werden. Die C=C-Doppelbindung im Gebiet von etwa $6,05-6,07 \mu$ tritt dagegen bei den langkettigen, ungesättigten Fettsäuren bzw. deren Estern erfahrungsgemäß nur sehr schwach oder überhaupt nicht in Erscheinung.

Abb. 5 zeigt das UR-Spektrum von Präparat IIb nach 7stdg. Rühren in Wasser. Die Bande bei $2,95 \mu$ (3390 cm^{-1}) deutet auf das Vorhandensein von assoziierten Hydroxylgruppen hin, wobei es sich sowohl um Hydroperoxyde als auch andere Hydroxylverbindungen handeln kann; geändert hat sich auch das Aussehen der den $=\text{CH}$ -Waggingschwingungen zugeschriebenen Banden im Gebiet zwischen 10 und $10,6 \mu$. Während beim unbehandelten Linolsäureäthylester I (Abb. 4) die Bande bei $10,17 \mu$ (983 cm^{-1}), die cis-trans konjugierten Doppelbindungen zugeschrieben wird⁷, intensiver

Tabelle 3

$3,30 \mu$	(3030 cm^{-1})	CH-Valenzschwingung der Gruppierung $-\text{C}=\text{C}-$
$3,42 \mu$	(2924 cm^{-1})	antisymmetr. CH-Valenzschwingung d. CH_2 -Gruppe
$3,50 \mu$	(2857 cm^{-1})	symmetr. CH-Valenzschwingung der CH_2 -Gruppe
$5,78 \mu$	(1730 cm^{-1})	C=O-Valenzschwingung in Estern
$6,83 \mu$	(1464 cm^{-1})	CH-Deformationsschwingung
$7,29 \mu$	(1372 cm^{-1})	symmetr. Deformationsschwingung der CH_3 -Gruppe
$8,05 \mu$	(1242 cm^{-1})	C-O-Valenzschwingung in Estern
$8,50 \mu$	(1176 cm^{-1})	
$10,15 \mu$	(985 cm^{-1})	=C-H-Waggingschwingungen
$10,35 \mu$	(966 cm^{-1})	
$10,53 \mu$	(949 cm^{-1})	
$13,85 \mu$	(722 cm^{-1})	CH_2 -Rockingschwingung (in Gruppierungen $-(\text{CH}_2)_n-$, $n \geq 4$)

ist als die durch isolierte Doppelbindungen in trans-Stellung hervorgerufene bei $10,35 \mu$ (966 cm^{-1}), sind beim Ester IIb die Intensitätsverhältnisse der beiden Banden umgekehrt.

Abb. 6 bringt das UR-Spektrum des wasserlöslichen Reaktionsproduktes V. Die Bande bei $2,9 \mu$ läßt erkennen, daß eine relativ starke Hydroxylierung stattgefunden hat. Bemerkenswert ist außerdem die Aufspaltung der C=O-Valenzschwingung, die erkennen läßt, daß V ein Gemisch von Ester und freier Säure darstellt. Auch die Schulter im Gebiet von etwa $3,75 \mu$ (OH-Valenzschwingung der Carboxylgruppe) deutet auf das Vorhandensein von Carboxylgruppen hin. Aus dem Intensitätsverhältnis der beiden Teilbanden bei $5,80$ und $5,86 \mu$ läßt sich schließen, daß Ester und freie Säure zu etwa gleichen Anteilen vorhanden sein dürften. Die Bande bei $10,35 \mu$ (966 cm^{-1}) ist wohl isolierten trans-Doppelbindungen zuzuschreiben. Somit dürfte die Verschiebung der Anteile der verschiedenen stereoisomeren Formen, die sich bereits in Präparat IIb zu erkennen gab (Abb. 5), im eigentlichen Reaktionsprodukt V noch wesentlich weitergegangen sein.

d) *Qualitative Tests*: Test mit KJO_4 und Stärke bzw. mit $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ auf vicinale Hydroxylgruppen.

Der erstgenannte Test wurde ursprünglich von *Buchanan*, *Dekker* und *Long*⁸ sowie *Metzenberg* und *Mitchell*⁹ für den Nachweis von Hydroxyl-

⁷ N. H. E. Ahlers, R. A. Brett und N. G. McTaggart, J. appl. Chem. **3**, 433 (1953).

⁸ J. Buchanan, C. Dekker und A. Long, J. Chem. Soc. [London] **1950**, 3162.

⁹ R. Metzenberg und H. Mitchell, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 4187 (1954).

gruppen in Zuckern verwendet und sodann von *Winsauer*¹⁰ speziell zum papierchromatischen Nachweis von vicinalen Hydroxylgruppen in Fettsäuren weiterentwickelt. Ein weiterer Papiertest konnte in der Reaktion mit Ferrirhodanid gefunden werden.

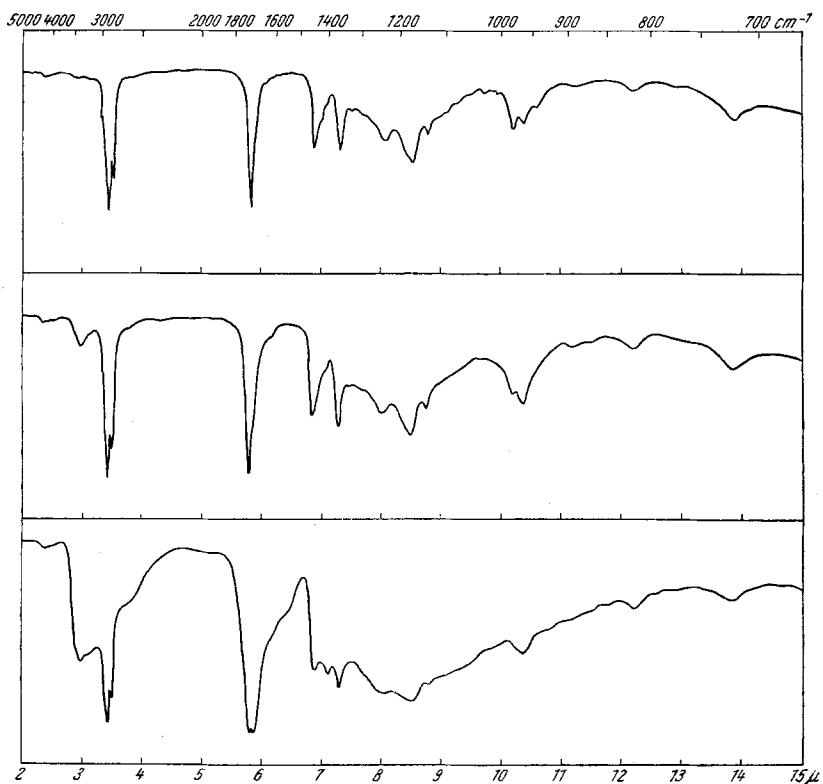


Abb. 4—6

Läßt man einen Tropfen des zu untersuchenden Präparates auf Filterpapier (*Schleicher & Schüll* 2043b) verdunsten und sprüht nach dem Trocknen an der Luft und bei Zimmertemperatur eine wäßrige Lösung von Ferrirhodanid normaler Farbtiefe darüber, so tritt eine Entfärbung des Ferrirhodanids immer dann ein, wenn die betreffende Probe auch mit KJO_4 und Stärke positiv auf vic. OH-Gruppen reagiert hatte. Daher ist der Schluß gerechtfertigt, daß auch die Entfärbung von Ferrirhodanid durch vic. OH-Gruppen bewirkt wird. Weitere Versuche mit Präparaten unterschiedlichen Hydroxylgehaltes ergaben, daß auch aus der Stärke des Entfärbungseffektes annähernde Rückschlüsse auf den Gehalt an vic. OH-Gruppen möglich sind.

Die folgende Übersicht orientiert über die mit beiden Testen an den einzelnen Präparaten erhaltenen Befunde:

¹⁰ *K. Winsauer*, *Mikrochim. Acta* 1957, 480.

Tabelle 4. Präparate

Test	I	II b	V	VI b
KJO ₄ -Stärke	—	±	+++	+++
Fe (CNS) ₃				

Legende: — negativ
 ± unsicher
 + schwach
 ++ mittel
 +++ stark

} positiv

Die Ergebnisse stimmen mit den aus den Infrarotspektren gewonnenen quantitativen Aussagen ausgezeichnet überein. Auf die mitgeteilten Teste wurde deshalb besonderer Wert gelegt, weil sie bei dem im folgenden beschriebenen ersten Versuch einer papierchromatischen Auftrennung des Reaktionsproduktes V von ausschlaggebender Bedeutung waren.

e) *Papierchromatographische Auftrennung des wasserlöslichen Reaktionsproduktes (V)*: Die bisherigen Untersuchungen hatten ergeben, daß sich in Substanz V einerseits beträchtliche Anteile zwei- und dreifach konjugiert-ungesättigter und mehrfach isoliert-ungesättigter Moleküle, andererseits reichlich hydroxylierte Moleküle vorfinden, wobei eine vic. Stellung der OH-Gruppen anzunehmen war. Außerdem hatte sich gezeigt, daß das eigentliche Reaktionsprodukt nach dem Trocknen bis zur Gewichtskonstanz in Wasser bzw. Alkohol nur mehr beschränkte Löslichkeit aufweist.

Alle diese Befunde weisen, wie bei der früher untersuchten Linolensäure angenommen wurde, darauf hin, daß wir es mit keinem einheitlichen, sondern vielmehr mit einem komplex zusammengesetzten Reaktionsprodukt zu tun haben werden.

Es war daher das Ziel unserer weiteren Arbeiten, Substanz V in ihre Komponenten zu zerlegen, diese möglichst rein zu gewinnen und schließlich zu identifizieren.

Da die partielle Löslichkeit zu keiner scharfen Trennung führte und andererseits die für die freien Fettsäuren ausgearbeitete, chromatographische Methode nach *Kaufmann* und *Nitsch*¹¹ in unserem Fall nicht anwendbar war, mußte nach einem neuen Weg gesucht werden.

Dieser wurde durch die Verwendung von reinem Wasser als Entwicklungsmedium in befriedigender Weise gefunden. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Arbeitsvorschrift:

Man trägt das zu untersuchende Estergemisch mit Hilfe eines Pinsels 2 cm vom unteren Rand eines Papierstreifens (*Schleicher & Schüll* 2043b)

¹¹ *H. P. Kaufmann* und *W. Nitsch*, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **56**, 154 (1954); **57**, 473 (1955).

auf. Der Startfleck soll einen Durchmesser von 5 mm nicht überschreiten. Nun wird der Streifen in einen Chromatographiezylinder eingehängt, so daß der untere Papierrand etwa 3 mm in destilliertes Wasser eintaucht. Die nun aufsteigende Wasserfront wird beim Startfleck in ihrer Wanderung leicht gehemmt und erleidet eine geringe Einbuchtung. Die optimale Steighöhe liegt bei etwa 15—20 cm; sie wird nach ungefähr 1 Stde. Laufzeit erreicht.

Es ist verständlich, daß sich die einzelnen Komponenten nach ihrer Affinität zu Wasser auftrennen. Am Start bleiben die extrem lipoidlöslichen Komponenten zurück, während sich die wasserlöslicheren, entsprechend ihren Löslichkeiten, in Flecken mit definierten R_f -Werten anordnen. Leicht wasserlösliche Substanzen finden sich daher in der Front. Will man sie rein erhalten, so empfiehlt es sich, das reine Papier zwei- bis dreimal vor dem Auftragen der Substanzen mit Wasser bis zu einer Höhe von 25 cm zu chromatographieren, um eventuelle Papierverunreinigungen aus dem Arbeitsbereich zu spülen.

Zusätze wie Pyridin, Eisessig oder Alkohol zum Wasser verringern den Trenneffekt.

Das Chromatogramm läßt eindeutig erkennen, daß das Reaktionsprodukt V komplex zusammengesetzt ist und im wesentlichen aus zwei Hauptkomponenten a ($R_f = 0$) und b ($R_f = 0,75$) besteht.

An den erhaltenen Chromatogrammen wurden nun folgende weiteren Testversuche durchgeführt:

Ozonisierung und nachfolgende Färbung mit Schiffischem Reagens auf C=C-Doppelbindungen¹².

Färbung mit Cereschwarz auf Lipidcharakter.

Eisen(III)-Rhodanidtest bzw. Test mit KJO₄-Stärke auf vic. OH-Gruppen.

Die einzelnen Komponenten a und b zeigten folgende Reaktionen:

a : Ozonidtest	+	b : Ozonidtest	—
Ceresfärbung	+	Ceresfärbung	—
OH-Test	—	OH-Test	++

Zusammenfassende Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß nicht nur die freie Linolsäure, sondern auch deren Äthylester die bereits beschriebene Reaktion im wäßrigen Medium gibt. Die Untersuchungen ließen einen bei Säure und Ester prinzipiell gleichen Reaktionsablauf erkennen.

Dieser ist charakterisiert durch Konjugation und sekundäre Hydroxylierung der Doppelbindungen. Wir leiten daraus den Schluß ab, daß das für das Eintreten der Reaktion maßgebliche chemische Strukturprinzip in allererster Linie in den beiden C=C-Bindungen zu sehen ist, unabhängig davon, ob es sich bei dem betreffenden Fettmolekül um die freie Carbonsäure oder um den Ester handelt.

¹² Wir sind Herrn Dr. K. Winsauer, mediz.-chem. Inst. der Universität Graz, der diese Versuche für uns ausführte, sehr zu Dank verpflichtet.

Bei Verwendung von freier Säure ebenso wie von Säureester finden sich dementsprechend im wasserlöslichen Reaktionsprodukt sowohl —C=C— -Bindungen wie auch reichlich C—OH -Gruppen.

Während es aber bei den Untersuchungen über das Reaktionsprodukt der freien Säure^{1, 2} nicht möglich war, eindeutig nachzuweisen, daß tatsächlich eine Mischung zweier getrennter Bestandteile (eines ungesättigten und eines hydroxylierten) vorlag, gelang dieser Nachweis mittels der in dieser Arbeit beschriebenen papierchromatographischen Trennung aus Wasser.

Das wasserlösliche Reaktionsprodukt besteht demnach aus zwei Hauptbestandteilen. Der eine (*a*) zeigt noch eindeutig die Eigenschaften eines hoch-ungesättigten Fettes, die auch im R_f -Wert auf dem Papier (praktisch 0) und in einer deutlichen Peroxydierbarkeit zum Ausdruck kommen. Vom ungesättigten Ausgangsprodukt I, dem 9,12-Linolsäure-äthylester, unterscheidet es sich, soweit wir bisher aussagen können, durch eine beträchtliche Zunahme an zweifachkonjugiert-ungesättigten Isomeren (vgl. UV-Spektren, Abb. 2 u. 3). Komponente *a* ist für sich praktisch wasserunlöslich, gut löslich hingegen in den üblichen organischen Fettlösungsmitteln.

Die zweite Komponente, *b*, enthält dagegen nur mehr geringe Spuren von Doppelbindungen, dafür aber Hydroxylgruppen, von denen zumindest ein Teil in *vic.* Stellung vorliegt. Dementsprechend beträgt der R_f -Wert auf dem Papier 0,75 und fehlt die Peroxydierbarkeit. Komponente *b* ist wasserlöslich, dagegen in organischen Solventien schwer löslich.

Der scheinbare Widerspruch, daß nämlich die *wasserunlösliche* Komponente *a* doch aus dem *wasserlöslichen* Produkt (*a* + *b*) stammt, kann somit dahingehend aufgeklärt werden, daß *b* als Lösungsvermittler für *a* dient bzw., daß *a* nur im Komplex mit *b* wasserlöslich wird. Maßgeblich für die komplexe Bindung zwischen *a* und *b* dürfte die Anwesenheit leicht polarisierbarer Gruppen in beiden Komponenten sein: einerseits die angereicherten Konjuene in *a*, andererseits die Hydroxylgruppen in *b*; darüber hinaus aber ist noch eine, vielleicht sogar spezifische, sterische Anpassung zwischen *a* und *b* anzunehmen.

Dies konnte durch folgenden Modellversuch bewiesen werden: Bringt man nämlich reine 9,12-Linolsäure mit 9,12-Dihydroxystearinsäure in innige Berührung, so erhält man ein Gemisch, das keinerlei Wasserlöslichkeit zeigt.

Das Ultrarot-Absorptionsspektrum des Ester-Reaktionsproduktes V lieferte — abgesehen von den Befunden hinsichtlich Hydroxylierung und Esterspaltung — die Erkenntnis, daß die Wasserreaktion zu einer Verschiebung der stereoisomeren Formen zugunsten der isolierten trans-C=C -Bindung führt.

Biologisch erscheint dies insofern von Interesse, als auch die mensch-

lichen Serumlipide UR-spektrometrisch einen bestimmten Gehalt an Hydroxyfetten und gleichfalls praktisch nur die isolierten trans-C=C-Bindungen erkennen lassen¹³. Es erscheint durchaus denkbar, daß auch in den Serumlipiden Komponenten vorhanden sind, die unserem wasserlöslichen Präparat V entsprechen und damit auch in vivo die besonderen Eigenschaften und Funktionen des wasserlöslichen Reaktionsproduktes repräsentieren. Über solche Eigenschaften wird zu gegebener Zeit berichtet werden.

Außerdem sind derzeit Versuche im Gange, die Komponenten Va — c mittels Säulenchromatographie und partieller Extraktion in größeren Mengen zu präparieren und sodann chemisch zu identifizieren. Dabei zeigte sich, daß die im UR-Spektrum des Gesamtreaktionsproduktes V (a+b+c) festgestellte Ester-Säuredoppelbande (Abb. 6) tatsächlich zwei verschiedenen Komponenten zuzusprechen ist: Va repräsentiert die Esterfraktion, Vb den hydroxylhältigen Carbonsäureanteil, der nur mehr durch Spuren von Begleitstoffen verunreinigt sein dürfte. Vb ist leicht löslich in Chloroform und bis zu 1,5⁰/₀ in Wasser.

Wir erlauben uns, an dieser Stelle der Nitritfabrik-A. G., Feldkirchen b. München, für die großzügige Subventionierung unserer Arbeiten, und der Rockefeller Foundation, New York, für die Bereitstellung wertvoller Meßapparaturen unseren aufrichtigen Dank auszusprechen.

¹³ E. Schauenstein und H. Bayzer, bisher unveröffentlichte Versuche.