

Für die chemotherapeutische Prüfung wurde das reine Pikrat in das salzsaure Salz übergeführt.

Die Analysen wurden von Frau *I. Mašek-Guštak* und Frau *N. Murza-Cerkovnikov* ausgeführt.

Wissenschaftliches Laboratorium der *Kastel-A.G.*, Zagreb, und Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

122. Fettstoffwechsel-Untersuchungen mit Deuterium als Indikator.

II. Beitrag zur Entstehung der Ölsäure aus Kohlenhydraten¹⁾

von **Karl Bernhard** und **François Bullet**.

(14. V. 43.)

Versuche über Fettbildung bei kohlenhydratreich ernährten Mäusen und Ratten unter Anwendung des schweren Wasserstoff-Isotopen als Indikator ergaben für die ungesättigten Fettsäuren immer tiefere Werte an stabil gebundenem, im Verlaufe der Synthese aus dem Körperwasser aufgenommenem Deuterium, als für die gesättigten Säuren²⁾. Weil Linol- und Octadecatriensäure (wahrscheinlich Linolensäure) unter solchen Bedingungen praktisch D-frei sind, wurde geschlossen, der Tierkörper vermöge diese Verbindungen nicht aufzubauen³⁾. Ihre Entstehung aus Kohlenhydrat müsste denn ohne alle Beteiligung der Körperflüssigkeit erfolgen, oder aus derselben aufgenommene H- bzw. D-Atome in der Folge wieder völlig ausgetauscht werden. Als lebensnotwendige oder essentielle Fettsäuren (*Burr* und *Burr*) sind diese höher ungesättigten Komponenten, besonders die Linolsäure, wie ganz kürzlich *Karrer* und *König*⁴⁾ wieder zeigten, von besonderer Bedeutung.

Der niedere D-Gehalt der ungesättigten Fettsäuren lässt sich aber nicht bloss durch die Gegenwart wechselnder Mengen D-freier Linolsäure erklären, da ein verhältnismässig grosser Gehalt an dieser vorausgesetzt werden müsste.

Wir konnten vielmehr zeigen, dass die Ölsäure stets weniger Deuterium als die Stearin- und Palmitinsäure enthält. Unsere Versuche

¹⁾ Teilweise mitgeteilt an der 22. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen am 30. Januar 1943 in Zürich.

²⁾ *D. Rittenberg* und *R. Schoenheimer*, *J. Biol. Chem.* **121**, 235 (1937); *K. Bernhard* und *R. Schoenheimer*, *J. Biol. Chem.* **133**, 713 (1940).

³⁾ *K. Bernhard* und *R. Schoenheimer*, *J. Biol. Chem.* **133**, 707 (1940); *K. Bernhard*, *H. Steinhauser* und *F. Bullet*, *Helv.* **25**, 1313 (1942).

⁴⁾ *P. Karrer* und *H. König*, *Helv.* **26**, 619 (1943).

an 8 männlichen, weissen Ratten führten zu den in der Tabelle I dargestellten Resultaten.

Tabelle I.

D-Gehalte des Körperwassers, der gesättigten Fettsäuren und der Ölsäure von Ratten bei Kohlenhydrat-Fütterung (praktisch fettfreies Brot).

Versuch Nr.	Dauer Tage	Atom % D*)		
		Körper- wasser	Gesättigte Fettsäuren	Ölsäure
1	6	2,48	0,52	0,24
2	6	2,52	0,74	0,31
3	9	2,02	0,50	0,21
4	9	2,10	0,56	0,20
5	9	2,32	0,24	0,09
6	12	2,36	0,30	0,10
7	21	1,90	0,85	0,37
8	21	1,58	0,62	0,29

*) Fehlergrenze: $\pm 0,01-0,02\%$.

Experimentelles.

Die experimentellen Bedingungen dieser Untersuchungen wurden bereits in unserer Arbeit über „lebensnotwendige Fettsäuren“ beschrieben¹⁾. Die schwierige Beschaffung des schweren Wassers erlaubte uns nicht, die Bildung der Ölsäure und das Verhalten der höher ungesättigten Säuren in getrennten Versuchen zu prüfen.

Von den Gesamt-Fettsäuren aus den Cadavern (exklusive Leber, Intestinal-Tractus und Niere) wurde ein kleiner Teil zur Gewinnung der gesättigten Fettsäuren verwendet, die Hauptmenge aber zur Abtrennung der Linol- und Linolensäure bromiert. Nach Eliminierung der Tetra- und Hexabromide isolierten wir die Ölsäure als Derivat des p-Amino-azobenzols. Um jede Möglichkeit eines event. Austausches der D- gegen H-Atome zu vermeiden, haben wir auf eine Entbromung mit Zink in Eisessig mit anschliessender Veresterung und Destillation der Methylester verzichtet. Das von *H. H. Escher*²⁾ angegebene Verfahren, beruhend auf der Bildung der genannten Fettsäureamide und ihrer Trennung durch fraktionierte Krystallisation schien uns in unserem Falle zweckmässiger.

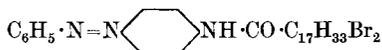
Vom bromierten Fettsäuregemisch wurden z. B. 10 g mit Thionylchlorid in die Säurechloride übergeführt, letztere in 60—80 cm³ Dichlormethan gelöst und bei ca. -15° zu 8,4 g p-Amino-azobenzol in 200 cm³ Dichlormethan gegossen. *Escher* arbeitete mit einem Amino-azobenzol-Überschuss von 100 %, wir begnügten uns mit der

¹⁾ *K. Bernhard, H. Steinhauser und F. Bullet, Helv. 25, 1313 (1942).*

²⁾ *H. H. Escher, Helv. 12, 27 (1929).*

Hälfte, indem die Entfernung des unveränderten p-Amino-azobenzols durch Auskochen des Kondensationsproduktes mit wässrigem Alkohol sehr zeitraubend ist. Wir glauben nicht, dass die Ausbeute dadurch schlechter wird. Das käufliche p-Amino-azobenzol wurde zweimal aus Benzol umkrystallisiert und schmolz bei 127°.

Eine erste Reinigung der dunkelrot-gelben Amide im Gewichte von 14—15 g erfolgte durch Auflösen in siedendem Methanol, wobei z. T. reichlich tiefbraunes Harz zurückblieb. Die Isolierung von reinem



4-Benzolazo-dibrom-stearyl-anilid erwies sich in der Folge als mühsam. Das Verfahren ist verlustreich und lässt sich kaum, wie *Escher* hoffte, zur quantitativen Bestimmungsmethode gestalten. Wir haben einerseits die mehr orientierenden Angaben *Escher's* befolgt, anderseits eine Anzahl weiterer Lösungsmittel zur fraktionierten Krystallisation der Amide ausprobiert. Oft trat Zersetzung der letzteren ein.

Zu den günstigsten Ergebnissen führte folgender Weg: Das trockene, von überschüssigem p-Amino-azobenzol befreite Rohprodukt (z. B. 14 g) lösten wir in Methanol und versetzten diese Lösung zu etwa 20% ihres Volumens mit Wasser. Die eintretende Fällung wurde nach Stehen im Eisschrank abgesaugt und in 150 cm³ siedendem Aceton aufgenommen. Beim Abkühlen schied sich ein krystallinischer Niederschlag aus, den wir abtrennten. Zum Filtrate gaben wir ca. 20% Wasser und erhielten z. B. in 2 Fraktionen 2,54 und 0,70 g Krystalle mit Schmelzpunkten von 88—89,5° und 89—90°. Erstere bestanden aus 4-Benzolazo-dibrom-stearyl-anilid. Den aus dem wasserfreien Aceton erhaltenen Niederschlag lösten wir wieder in heissem Aceton und wiederholten die Fällungen mit Wasser. Manchmal konnten weitere Mengen des Dibromstearinsäure-Kupplungsproduktes erhalten werden, meist war die Ausbeute aber gering. Auf Reinheit wurde durch Brom- und Stickstoff-, in einigen Fällen durch Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmungen kontrolliert. Die diesbezüglichen Werte der zur D-Analyse gelangenden Fraktionen, welche mit etwas Silberpulver gemischt verbrannt wurden, ergeben sich aus der Tabelle II. Es sind auch die gefundenen D-Gehalte der bromierten Ölsäurederivate angegeben, aus denen sich nach $a \times 43/34$ die aus Tabelle I ersichtlichen Atom % D für die Ölsäure berechnen.

In einigen Fällen haben wir auch die p-Amino-azobenzol-Derivate der gesättigten Säuren rein erhalten und auf Deuterium geprüft. Die sich ergebenden Werte stimmten mit denjenigen überein, die wir bei den gesättigten Säuren fanden, welche nach den Angaben von *Hilditch*¹⁾ über die Bleisalze abgetrennt wurden. Ein Austausch der

¹⁾ *T. P. Hilditch*, The chemical constitution of natural fats. London 1941.

D- gegen H-Atome bei der geschilderten Isolierung der Fettsäuren als Amidderivate des p-Amino-azobenzols trat also nicht ein.

Tabelle II.

Schmelzpunkte, N-, Br- und D-Werte der 4-Benzolazo-dibrom-stearyl-anilide.

Vers. Nr.	Schmelzpunkte	% N	% Br	Atom % D
1	89,5—91 ⁰	6,90	25,57	0,19
2	88 ⁰	6,80	25,64	0,24
3	89—91 ⁰	7,05	25,96	0,17
4	88—89 ⁰	6,62	26,15	0,16
5	89—90 ⁰	6,80	25,58	0,07
6	88 ⁰	6,92	25,61	0,08
7	89—90 ⁰	6,60	26,07	0,29
8	88—89,5 ⁰	6,82	25,95	0,23

C₃₀H₄₃ON₃Br₂ Ber. C 57,96 H 6,96 N 6,77 Br 25,73
 (MG. 621,14) Gef. „ 57,99 „ 7,04 (Versuch Nr. 4)
 „ 58,06 „ 7,01 (Versuch Nr. 5)

Diskussion der Ergebnisse.

Versuche an Mäusen hatten ergeben, dass der D-Gehalt der gesättigten Leberfettsäuren schon nach 2–3 Tagen sein Maximum erreicht, d. h. rund 50 % desjenigen der Körperflüssigkeit ausmacht¹⁾. Die Halbwertszeit der Leberfettsäuren ist also sehr klein. Das Dépôt fett wird hingegen langsamer umgesetzt, hier beträgt dieser Wert 5—9 Tage²⁾. Bei den Ratten scheinen wir uns, wie aus Tabelle III hervorgeht, dem Gleichgewichte zwischen D-Gehalt des Körperwassers und D-Gehalt der gesättigten Fettsäuren nach etwa 21 Tagen (Versuch 7) zu nähern. Die Halbwertszeit liegt bei rund 9 Tagen. Die Tiere der Versuche 5 und 6 frassen aus unbekanntem Gründen sehr wenig. Die für die Fettsäuren gefundenen D-Werte sind daher abnormal tief. Die Halbwertszeit der Leberfettsäuren konnte nicht ermittelt werden, die erhaltenen Fettsäuremengen von 200 bis 300 mg reichten lediglich zur D-Messung, nicht aber zur Abtrennung der gesättigten Säuren aus.

Tabelle III.

D-Gehalte der gesättigten Säuren und der Ölsäure in Prozenten der D-Konzentration des Körperwassers*).

Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Dauer in Tagen .	6	6	9	9	9	12	21	21
Gesättigte Säuren	21	29	25	27	10	13	45	39
Ölsäure	10	13	10	10	4	4	20	18

*) $\frac{\text{Atom \% D der Säure}}{\text{Atom \% D des Körperwassers}} \times 100$

¹⁾ K. Bernhard und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. **133**, 713 (1940).

²⁾ D. Rittenberg und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. **121**, 235 (1937).

Auch bei der Ratte wird zur Synthese der Palmitin- und Stearinsäure von je 2 stabil gebundenen H-Atomen dieser Verbindungen eines aus dem Körperwasser aufgenommen.

Die quantitativ in tierischen Fetten sehr verbreitete Ölsäure verhält sich anders. Die D-Werte sind bedeutend tiefer und erreichen nach 21 Tagen (Versuche 7 und 8) nur etwa $\frac{1}{5}$ der D-Konzentration des Körperwassers. Man könnte vermuten, die Halbwertszeit der Ölsäure wäre entsprechend grösser, ihr D-Gehalt würde das Maximum erst viel später erreichen. Wenn man aber die Ölsäure-D-Gehalte zu denjenigen der gesättigten Säuren in Beziehung setzt, so betragen erstere in der Reihenfolge der Tabelle I 46, 42, 42, 36, 37, 33, 43 und 47, im Mittel 41 % der letzteren, unabhängig von der Versuchsdauer. Ein zeitlicher Anstieg ist nicht vorhanden, die Abweichungen vom Mittel liegen innerhalb der biologischen Streuungen.

Wir möchten daher eher annehmen, die Ölsäure entstehe nach einem von dem Aufbau der gesättigten Säuren verschiedenen Modus. Es werden dabei zu den Kondensationen und Hydrierungen für jede Molekel aus der Körperflüssigkeit weniger H-Atome aufgenommen als bei der Synthese der gesättigten Säuren. Es stammen nicht, wie bei jener Synthese, rund die Hälfte der stabil gebundenen H-Atome der gebildeten Säure aus dem Körperwasser, sondern nur noch etwa ein Fünftel. Man hat zahlreiche Formulierungen für die in vivo stattfindende Umwandlung der Kohlenhydrate in Fettsäuren versucht, endgültige Beweise sind bis jetzt keine erbracht worden.

Zusammenfassung.

Bei kohlenhydratreich gefütterten Ratten erfolgt die Regeneration der Dépôtfettsäuren in einer Halbwertszeit von etwa 9 Tagen. Von je zwei stabil gebundenen H-Atomen der neu entstehenden gesättigten Fettsäuren stammt eines aus dem Körperwasser, in Übereinstimmung mit den Befunden, welche analoge Versuche an Mäusen ergeben hatten.

Dagegen weist die als Derivat des p-Amino-azobenzols isolierte, vorher bromierte Ölsäure nur etwa 40 % des D-Gehaltes der Palmitin- oder Stearinsäure auf. Es wird angenommen, die Bildung der ersteren vollziehe sich verschieden von derjenigen der gesättigten Säuren. Von den H-Atomen der Ölsäure sind nur etwa $\frac{1}{5}$ dem Körperwasser entnommen. Ihre Synthese könnte daher von grösseren Einheiten ausgehen, als diejenige der gesättigten Säuren.

Für diese Arbeit standen Mittel der Stiftung „Jubiläumsspende für die Universität Zürich“ zur Verfügung, die wir bestens verdanken.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der
Universität.