

catégorie de solutions. On établit sur la droite  $s_1$  (fig. 3) la position du point  $R_1$  (solution saturée de  $D^{5.1.10}$  exempte de phosphate monocalcique appartenant à la catégorie  $s_1$ ). Dans la construction auxiliaire (fig. 3), on dispose ainsi de deux points ( $R_1$  et  $S_1'$ ) à l'aide desquels on peut tracer la droite  $g_1$ .

On mène par le point  $R_2$  une droite parallèle à  $g_1$ . Le point d'intersection de cette droite  $g_2$  avec la ligne  $h_2$  est le point  $X_2'$  qui fournit les coordonnées  $f_{X_2'}$  et  $d_{X_2'}$  de la solution  $X_2$  cherchée.

2. Le procédé d'interpolation que nous avons utilisé ci-dessus pour obtenir les coordonnées de solutions saturées simultanément de  $Ca^{I} + D^{5.1.10}$  s'applique, sans modification, aussi à l'établissement de points figuratifs situés sur les autres surfaces à 2 sels qui séparent le solide de saturation du  $Ca^I$  des solides de saturation des divers nitrates du système quinaire  $Ca^{++} - NH_4^+ - H^+ - NO_3^- - PO_4^{---} - H_2O$ .

#### RÉSUMÉ.

Nous décrivons un procédé d'interpolation permettant d'établir, dans le système quinaire  $Ca^{++} - NH_4^+ - H^+ - NO_3^- - PO_4^{---} - H_2O$ , la composition de solutions simultanément saturées de phosphate monocalcique et d'un nitrate simple ou double des ions  $Ca^{++}$  et  $NH_4^+$ . Cette méthode utilise le diagramme de solubilité du système quaternaire  $Ca^{++} - NH_4^+ - H^+ - NO_3^- - H_2O$  et des diagrammes indiquant la solubilité du phosphate monocalcique dans des solutions aqueuses de  $Ca(NO_3)_2 + NH_4NO_3 + HNO_3$ .

Laboratoire de chimie minérale et analytique  
de l'Université de Lausanne.

### 38. Über eine biologische Bedeutung der Gallenfarbstoffe. Bilirubin und Biliverdin als Antioxydantien für das Vitamin A und die essentiellen Fettsäuren

von Karl Bernhard, Günther Ritzel und K. U. Steiner.

(14. XII. 53. )

Die Abbauprodukte des Hämoglobins, die Gallenfarbstoffe, gelangen normalerweise in den Darm und werden grösstenteils ausgeschieden. Man ist im allgemeinen geneigt, in diesen vier oder zwei Pyrrolringe aufweisenden Verbindungen lediglich Endprodukte des Blutfarbstoffes zu erblicken, denen keine weiteren Aufgaben im Organismus zufallen.

Unsere Untersuchungen<sup>1)</sup> über die Resorption lipoidlöslicher Anteile der Nahrung bei Ratten mit Ductus-thoracicus-Fistel liessen erkennen, dass Gaben von etwa 1000  $\gamma$  Axerophthol auf Grund der Analyse der Lymphe im Ausmasse von etwa 50–60 % resorbiert werden. Eine kleine Menge des Vitamines A ist im Darm nach 24 Stunden

<sup>1)</sup> K. Bernhard, E. Scheitlin & G. Ritzel, Helv. **35**, 1914 (1952).

noch vorhanden, ein merklicher Anteil wird aber verändert und inaktiviert. Die Aufnahme von Carotin erfolgt in viel geringerem Ausmasse; auch diese Verbindung ist nach 24 Stunden im Intestinaltraktus noch nachweisbar, wird indessen zu einem grossen Teil zerstört. Der Resorption dieser Wirkstoffe verläuft offenbar parallel ihre Zerstörung im Darmtraktus, welche letztere in um so stärkerer Masse in Erscheinung tritt, als erstere zeitlich ausgedehnt wird. Reduzierende Stoffe wie das Vitamin E vermögen eine oxydative Inaktivierung des Axerophthols zu verhindern.

In Fortsetzung unserer Untersuchungen über die Abhängigkeit der Lipidresorption von der Galle<sup>1)</sup> haben wir deren Einfluss auch auf die Vitamin-A-Resorption studiert und beobachtet, dass diese bei völliger Fernhaltung der Galle vom Darne (Ratten mit Ductus-thoracicus-Fistel und Choledochus-Fistel) nur noch sehr gering ist und auf 0,3–1,6% sinkt (Tab. 1).

**Tabelle 1.**

Vitamin-A-Resorption bei Ratten unter Ausschluss der Galle vom Intestinaltraktus.

Tier Nr.	Dauer Std.	Appliz. Menge Vitamin A $\gamma$	Lymphe		Vitamin-A- Resorption in %
			ml	Vitamin A $\gamma$	
1	20	500	45	4	0,8
2	20	690	35	11	1,6
3	18	690		2	0,3
4	18	690	25	4	0,6
5	26	750	25	6	0,8

Auch  $\beta$ -Carotin wurde unter solchen Bedingungen praktisch nicht resorbiert (Tab. 2). Die Aufarbeitung des Magen-Darmkanals liess bei den Tieren 6, 7 und 10 wohl 61, 69 und 51% des verabreichten  $\beta$ -Carotins, nicht aber Vitamin A wieder auffinden.

**Tabelle 2.**

$\beta$ -Carotin-Resorption bei Ratten unter Ausschluss der Galle vom Intestinaltraktus.

Tier Nr.	Dauer Std.	Appliz. Menge $\beta$ -Carotin $\gamma$	Lymphe			Vitamin-A- Resorption in %
			ml	$\beta$ -Carotin $\gamma$	Vitamin A $\gamma$	
6	26	550	20	0	0	0
7	26	550	21	0	0	0
8	20	1050	34	0	1,6	0,2
9	18	1050	25	0	0,8	0,1
10	18	1100	36	0	0	0

<sup>1)</sup> K. Bernhard & G. Ritzel, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **11**, 166 (1953).

Wir versuchten zu prüfen, inwieweit der status quo ante durch Gallenzufuhr wieder erreicht werden konnte und beobachteten nach Dauerinfusion von nativer Galle mit Hilfe einer dritten Fistel durch Einführung eines Drains im mittleren Abschnitt des Ductus hepaticus duodenalabwärts einen eindeutigen Resorptionsanstieg.

**Tabelle 3.**

Vitamin-A-Resorption bei Gallenfistel-Ratten nach Dauerinfusion von nativer Galle oder Schweinegalle (Tier Nr. 13).

Tier Nr.	Dauer Std.	Appliz. Menge Vitamin A $\gamma$	Lymphe		Vitamin-A-Resorption in %
			ml	Vitamin A $\gamma$	
11	22	915	30	175	19,2
12	22	1200	45	258	21,5
13	15	485	65	86	18,0

Dass die ursprünglichen Werte von 50–60% nicht erreicht wurden, darf nicht befremden, handelt es sich doch bei diesen Fisteln um für das Tier sehr wesentliche Eingriffe, die zu berücksichtigen sind.

Nachdem den Gallensäuren für die Resorption der Lipide eine allerdings noch nicht völlig geklärte Bedeutung zukommt, war es vorerst naheliegend, die festgestellte verminderte Vitamin-A-Resorption durch den Ausfall dieser Säuren zu erklären. Ratten mit Ductus-thoracicus-Fistel und Gallenfistel erhielten daher mit Vitamin-A-Dosen je 150 mg Taurocholsäure in einem Olivenöl-Wassergemisch mit Tween 20 emulgiert. Aus der Tabelle 4 geht hervor, dass eine gewisse Verbesserung der Resorption erzielt wurde, die indessen den normalen Werten sich bei weitem noch nicht näherte. Den Tieren 18 und 19 haben wir gleichzeitig noch 100 mg Tocopherol verfüttert, von dem, wie eingangs erwähnt wurde, bekannt ist, dass es als Stabilisator für das Vitamin A wirkt.

**Tabelle 4.**

Vitamin-A-Resorption bei Gallenfistel-Ratten nach Verabreichung von Taurocholsäure.

Tier Nr.	Dauer Std.	Appliz. Menge Vitamin A $\gamma$	Lymphe		Vitamin-A-Resorption in %
			ml	Vitamin A $\gamma$	
14	18	480	20	10	2,1
15	18	480	25	10	2,1
16	18	330	55	24	7,3
17	18	330	35	17	5,2
18	18	720	30	60	8,4
19	18	720	24	72	10,0

Zwei Ratten mit Doppelfisteln erhielten je 1080  $\gamma$   $\beta$ -Carotin mit 150 mg Taurocholsäure und lieferten während 16 Std. 17 bzw. 15 ml Galle und 27 bzw. 16 ml Lymphe. Letztere war frei von  $\beta$ -Carotin; das in Chloroform gelöste Unverseifbare zeigte jedoch eine schwache, aber deutliche *Carr-Price*-Reaktion.

Die verminderte Resorption konnte demnach nicht ausschliesslich durch das Fehlen der Gallensäuren bedingt sein. Es war vielmehr an die Möglichkeit zu denken, dass die Gallenfarbstoffe gewissermassen als natürliche Antioxydantien die Inaktivierung solcher sauerstoffempfindlicher Verbindungen aufhalten könnten und daher bei Gallenfisteltieren eine gesteigerte Zerstörung des Vitamines A im Verdauungstraktus stattfindet.

Wir haben Ratten, die während zwei Wochen ein an Axerophthol armes Futter erhielten, Gallenfisteln angelegt, den Tieren 24 Stunden nach der Operation, d. h. nach völliger Erholung, bekannte Mengen Vitamin A verabreicht und sie nach 6 Stunden getötet. Wir bestimmten darauf den im Magen, im Darm und in der Leber vorhandenen Wirkstoff, fanden aber nur einen geringen Anteil der applizierten Menge (Tabelle 5). Namentlich die Leber besass bei diesen Tieren wenig Vitamin A im Gegensatz zu Befunden an nichtoperierten Ratten, die gleichfalls nach einer Karenzzeit von 14 Tagen Vitamin A erhielten und 6 Stunden später allein in der Leber z. B. 69 und 75% der verabreichten Menge aufwiesen.

**Tabelle 5.**

Vitamin-A-Gehalte von Magen, Darm und Leber nach Axerophthol-Gaben an Gallenfistel-Ratten (Vitamin-A-Mangeltiere).

Tier Nr.	Appliz. Menge $\gamma$	Aufgefundenes Vitamin A in % der applizierten Menge			
		Magen	Darm	Leber	total
20	2110	5	15	8	28
21	2110	25	9	2	36
22	2380	0,5	22	1,5	24
23	2120	2,5	20	2	25
24	2330	3	18	10	31
25	2330	1	21	10	32
26	2340	2	27	16	46
27	2340	14	20	3	37

Diese Befunde sind im Sinne eines raschen Abbaues des Axerophthols bei Abwesenheit der Galle vom Darm interpretierbar, weshalb wir durch Versuche *in vitro* eine diesbezügliche Wirkung von Bilirubin und Biliverdin auf das Vitamin A prüften; wir stellten so fest, dass seine Zerstörung durch den Luftsauerstoff in Gegenwart kleiner Mengen dieser beiden Farbstoffe tatsächlich stark verzögert wird.

Dabei wurden Vitamin-A-Lösungen mit und ohne Gallenfarbstoffzusätze und Puffer im Brutschrank stehengelassen (Tab. 6).

**Tabelle 6.**

Beeinflussung des Vitamin-A-Gehaltes wässriger Lösungen durch Bilirubin und Biliverdin beim Stehen an der Luft bei 35°.

I: Vitamin A ohne Zusatz, II: Vitamin A + Bilirubin, III: Vitamin A + Biliverdin.

Versuch Nr.	Ansätze			Zeit Std.	Vitamin-A-Gehalt in % der eingesetzten Menge		
	Vitamin A	Bilirubin	Biliverdin		I	II	III
	$\gamma$	mg	mg				
1	201	6	6	0	100	100	100
				24	30	94	97
				72	13	66	78
				120	0	40	75
2	180	6	6	0	100	100	100
				16	71	94	94
				72	48	64	75
				96	35	47	61
3	300	0,6	0,6	0	100	100	100
				24	40	68	77
				96	35	44	39
				120	23	33	27

Auch beim Rühren wässriger Vitamin-A-Lösungen bei pH 8,5 unter Luftzutritt mit einem Vibromischer erwies sich die stabilisierende Wirkung kleiner Bilirubinmengen.

**Tabelle 7.**

Abnahme des Vitamin-A-Gehaltes wässriger Lösungen mit und ohne Bilirubinzusätze (4 mg pro 100 ml) bei pH 8,5.

Versuch 4				Versuch 5			
ohne Bilirubin		mit Bilirubin		ohne Bilirubin		mit Bilirubin	
Zeit Std.	Vitamin A $\gamma$	Zeit Std.	Vitamin A $\gamma$	Zeit Std.	Vitamin A $\gamma$	Zeit Std.	Vitamin A $\gamma$
0	3270	0	3100	0	3330	0	3400
2	2730	1	3070	18	1540	17	3070
25	1670	5	3030	24	1070	23	2700
26	1570	23	3000	42	850	41	1970
33	900	29	2570	49	570	—	—
48	433	—	—	—	—	—	—

Schliesslich haben wir in zwei Einliterflaschen je 100 ml Vitamin-A-Lösung (pH 8,5), wovon die eine zusätzlich 10 mg Bilirubin enthielt, während längerer Dauer auf einem Rollbock geschüttelt und auch unter solchen Bedingungen eine langsamere Zerstörung des Vitamins in Gegenwart des Gallenfarbstoffes beobachtet.

Die festgestellten Befunde veranlassten uns, eine protektive Wirkung des Bilirubins und Biliverdins auch für andere Verbindungen, z. B. die essentiellen Fettsäuren zu prüfen, die in der Tat nachgewiesen werden konnte.

**Tabelle 8.**

Vitamin-A-Gehalte wässriger Lösungen mit und ohne 10 mg Bilirubin nach längerem Schütteln auf einem Rollbock.

Versuch 6			Versuch 7		
Zeit Std.	Vitamin A ( $\gamma$ )		Zeit Std.	Vitamin A ( $\gamma$ )	
	ohne Bilirubin	mit Bilirubin		ohne Bilirubin	mit Bilirubin
0	1920	1920	0	1870	1870
30	1230	1630	19	1530	1630
54	950	1470	24	1280	1500
72	820	1460	47	1000	1380
			65	920	1300

**Tabelle 9.**

*Lea*-Zahlen von Linolsäure-Emulsionen mit und ohne Bilirubinzusätze (2–4 mg) nach Schütteln an der Luft bei Zimmertemperatur. Je 150 mg Linolsäure in 5 ml Puffer, pH 8,7.

Zeit, in Std.	24	48	72	96
<b>Versuch 8</b>				
ohne Bilirubin . . . .	47	109	251	332
mit 2 mg Bilirubin . .	10	10	10	10
<b>Versuch 9</b>				
ohne Bilirubin . . . .	55	172	285	558
mit 4 mg Bilirubin . .	10	10	17	25

**Tabelle 10.**

*Lea*-Zahlen von Linolsäure-Emulsionen mit und ohne Bilirubin nach Schütteln an der Luft. Je 150 mg Linolsäure in 5 ml Puffer.

Zeit, in Std.	2	5	7	8	9	24
<b>Versuch 10, pH 8,5</b>						
ohne Bilirubin . . . .	35	47	59	—	—	78
mit 2 mg Bilirubin . .	21	22	22	—	—	24
<b>Versuch 11, pH 8,5</b>						
ohne Bilirubin . . . .	19	—	31	—	41	119
mit 2 mg Bilirubin . .	13	13	13	13	—	19
<b>Versuch 12, pH 10</b>						
ohne Bilirubin . . . .	18	33	41	—	45	86
mit 2 mg Bilirubin . .	13	13	—	—	13	18
<b>Versuch 13, pH 10</b>						
ohne Bilirubin . . . .	19	23	31	40	—	116
mit 1 mg Bilirubin . .	12	13	—	13	—	20

Werden Emulsionen von Linolsäure bei Zutritt von Luft geschüttelt, so findet sehr rasch Peroxyd-Bildung und starker Anstieg der *Lea*-Zahl statt. Diejenigen Emulsionen,

denen wir geringe Mengen Bilirubin beifügten, im übrigen aber analog behandelten, zeigten auch nach 24 oder mehr Std. keine wesentliche Peroxyd-Zunahme.

Auch aus Versuchen von kürzerer Dauer und wechselnden Mengen Bilirubin geht dessen Wirkung deutlich hervor (Tab. 10).

**Tabelle 11.**

*Lea*-Zahlen von Linolsäure-Emulsionen mit wechselnden Mengen Bilirubin nach längerem Rühren mit dem Vibro-Mischer an der Luft. pH 8,5.

Versuch 14		Versuch 15		Versuch 16		Versuch 17	
13,8 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure		6,6 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure		3,3 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure		1,7 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure	
Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl	Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl	Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl	Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl
1,5	15	2,5	12	—	—	2	7
5	15	5	13	5	9,3	5,5	12
6,5	15	7,5	13	—	—	—	—
7,5	16	8,5	13	8	13	8,5	14
24	19	24	20	24	18	24	15
Versuch 18		Versuch 19		Versuch 20		Versuch 21	
0,83 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure		0,42 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure		0,21 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure		0,1 mg Bilirubin pro 1 g Linolsäure	
Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl	Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl	Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl	Zeit Std.	<i>Lea</i> -Zahl
2	4,0	2	6	2	6,0	2	8
6	8,4	5	8	5	8	4,5	8
9	10,0	8	11	8	8	8	8
24	20	23	28	23	22	23	20

**Tabelle 12.**

*Lea*-Zahlen von Linolsäure-Emulsionen ohne Bilirubin nach längerem Rühren mit dem Vibro-Mischer. Je 2,4 mg Linolsäure in 80 ml Puffer.

Zeit, in Std.	2,5	5	6,5	8,5	24
Versuch 22, pH 8 . .	15	18	31	41	119
Versuch 23, pH 10 . .	18	33	41	45	86
Versuch 24, pH 10 . .	19	23	31	40	116

Ein weiterer Beweis für die antioxydative Wirkung des Bilirubins ging auch aus dem stark verminderten Sauerstoffverbrauch beim Schütteln von Linolsäureproben an der Luft in der *Warburg*-Apparatur hervor. Wir tränkten Filtrierpapierstreifen mit einer Lösung aus 2 mg Bilirubin in 5 ml Chloroform und brachten nach erfolgtem Eintrocknen auf ein so präpariertes quadratisches Papierstück von 2 cm Seitenlänge einen Tropfen, d. h. 10–11 mg Linolsäure. Wurden diese Papierchen bei 37° während 24 Std. geschüttelt, so betrug der Luftverbrauch 49,7, 52,1, 46,4 mm<sup>3</sup> pro 10 mg Linolsäure. Dagegen fanden wir einen Verbrauch von 498,1, 502,1, 568,1 mm<sup>3</sup>, wenn wir die Linolsäure unter sonst analogen Bedingungen auf einem Stück mit Bilirubin nicht imprägnierten Filtrierpapier dem Luftsauerstoff aussetzten.

Zur Ausführung der Versuche. Zu den Tierversuchen benützten wir ausschliesslich kräftige, männliche weisse oder weiss-schwarze Ratten. Die Anlegung der Fisteln erfolgte in der bereits früher angegebenen Weise<sup>1)</sup>. Vitamin A und  $\beta$ -Carotin waren Roche-Präparate, z. B. wasserlösliches Vitamin A „Roche“. Die Vitamin A-Bestimmungen führten wir nach Carr-Price aus stets nach vorangegangener Verseifung der Proben. Die Linolsäure hatte eine Jod-Zahl von 160–162 und eine Lea-Zahl von 0. Letztere bestimmten wir nach den Angaben von Iselin<sup>2)</sup>. Bei den in-vitro-Versuchen rührten wir die entsprechenden Emulsionen in einem offenen Glaszylinder mit einem Vibro-Mischer (Glasrührer). In anderen Fällen befand sich die Emulsion in kleinen, nicht verschlossenen Erlenmeyer-Kölbchen und wurde mittels eines Vibrators geschüttelt. Schliesslich haben wir Vitamin-A-Lösungen mit und ohne Zusätze in kleinen Bechergläsern im Thermostat bei 38° aufgehoben. Das Bilirubin war gleichfalls ein „Roche“-Präparat; daraus stellten wir nach den Angaben von Lemberg<sup>3)</sup> das Biliverdin her.

Die mitgeteilten Beobachtungen über eine stabilisierende Wirkung von Bilirubin und Biliverdin auf Vitamin A und auf Linolsäure bei pH 8,5 berechtigen zur Annahme, den Gallenfarbstoffen komme im Verdauungstraktus eine analoge protektive Wirkung zu. Unsere Versuche in vivo zeigten, dass Ratten nach Fernhaltung der Galle vom Darm durch eine Choledochus-Fistel sowohl Vitamin A als  $\beta$ -Carotin ausgesprochen schlecht resorbieren und Taurocholsäure-Gaben nur eine mässige Verbesserung der Resorption dieser Wirkstoffe herbeiführen. Dass nur geringe Mengen Vitamin A bei Gallenfisteltieren in der Lymphe nachweisbar sind, beruht zu einem grossen Teil auf einer raschen Zerstörung des aufgenommenen Axerophthols, welche normalerweise durch die Gallenfarbstoffe eingeschränkt oder verhindert wird. Bilirubin und Biliverdin sind offenbar natürliche Antioxydantien, befähigt, sauerstoffempfindliche, in sehr kleinen Mengen vorkommende Verbindungen, wie z. B. das Vitamin A zu schützen und wirksam zu erhalten. Damit wird erstmalig eine physiologische Bedeutung der Gallenfarbstoffe nachgewiesen.

#### SUMMARY.

Rats with a thoracic duct fistula absorb vitamin A and  $\beta$ -carotene very poorly in the total absence of bile from the intestine. Administration of taurocholic acid improves the degree of absorption but fails to raise it to its normal level. It was demonstrated in vitro that small quantities of bilirubin and biliverdin exert a stabilizing action towards vitamin A. Consequently, it may be assumed that the bile pigments play the same role in vivo, serving as natural antioxidants which protect easily oxidizable substances from destruction in the intestinal tract.

Even the rapid oxidation of linoleic acid is prevented by minute concentrations of bilirubin.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität  
und Schweizerisches Vitamininstitut, Basel.

<sup>1)</sup> K. Bernhard, H. Wagner & G. Ritzel, Helv. **35**, 1404 (1952).

<sup>2)</sup> E. Iselin, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **35**, 113 (1947).

<sup>3)</sup> R. Lemberg, A. **499**, 25 (1933).