

SUMMARY.

The 20,21-dioxygenated pregnane side chain has been introduced into the 18-substituted *d,l*- Δ^{14} -16-oxo-androstane derivative I by condensation with dimethyl oxalate. The 16-oxo group was selectively eliminated by conversion of the 21-ester IIa into the morpholide Xa, catalytic hydrogenation of the 16-oxo group as well as the 14,15-double bond in the enolacetate XIa, followed by base catalysed elimination of the elements of acetic acid and introduction of a 16,17-double bond with or without concomitant hydrolysis of the amide function (to give XIIIb and XIIIa respectively). Preliminary experiments towards the transformation of the 20-oxo-21-ester grouping obtained from the corresponding acid to the 20,21-ketol side chain are also reported. All reactions were carried out under neutral or alkaline conditions, so that the ketalised oxo-group in ring A could be preserved throughout the synthesis.

In consequence of the association of the 18-carbon atom and the 11 β -oxygen function in a six-membered enol ether ring, the compounds obtained were of the 'unnatural' 14 β -configuration.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

115. Gewinnung und oxydativer Abbau radioaktiver Ö1-, Linol- und γ -Linolensäure¹⁾.

von **Karl Bernhard, M. Rothlin, J.-P. Vuilleumier** und **R. Wyss**.

(29. IV. 58)

Stoffwechsel und Wirkungsweise der essentiellen Fettsäuren²⁾ haben in den letzten Jahren an Interesse zugenommen und zahlreiche experimentelle Bearbeitungen und spekulative Deutungen erfahren.

In vorangehenden Arbeiten³⁾ berichteten wir über Lipidsynthesen des Schimmelpilzes *Phycomyces Blakesleeanus* und haben nun durch Zugabe von [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat zur glucosehaltigen Nährlösung signierte Fettsäuren gewonnen. Damit wurden Untersuchungen über das Verhalten von ungesättigten Fettsäuren, insbesondere der essentiellen Linolsäure und γ -Linolensäure im Tierkörper, ermöglicht.

Die gewünschten Verbindungen erhielten wir aus den flüssigen Säuren des Pilzfettes durch Verteilung nach *Craig*⁴⁾. Ihre Reinheit wurde papierchroma-

¹⁾ Studien zur Biochemie der essentiellen Fettsäuren, 2. Mitt. Vorgetragen in Paris (Faculté des Sciences, Physiologie de la nutrition, am 6. Juni 1957 und anlässlich des 2me Congrès de la Société internationale pour l'Etude des Corps Gras, Paris 21. 10. 57; vgl. *Oléagineux* **13**, 19 (1958).

²⁾ *K. Bernhard*, *Arch. Sci. physiol.* **2**, 257 (1948); *R. T. Holman*, *The Vitamins* **2**, 267 (1954), New York.

³⁾ *K. Bernhard, L. Abisch & H. Wagner*, *Helv.* **40**, 1292 (1957); **41**, 850 (1958).

⁴⁾ *E. H. Ahrens & L. C. Craig*, *J. biol. Chemistry* **195**, 299 (1952).

tographisch und spektrophotometrisch kontrolliert. Die spezifischen Aktivitäten sind aus der Tab. 1 ersichtlich.

Tabelle 1.
Spezifische Aktivitäten (c/mg Min).

Ansatz	Ölsäure	Linolsäure	γ -Linolensäure
I	$0,825 \cdot 10^5$	$1,28 \cdot 10^5$	$2,19 \cdot 10^5$
II	$0,965 \cdot 10^5$	$1,27 \cdot 10^5$	$4,32 \cdot 10^5$
III	$6,96 \cdot 10^5$	$7,60 \cdot 10^5$	$26,0 \cdot 10^5$

Die Signierung beschränkte sich bei diesen Säuren nicht wie bei den synthetisch erhaltenen Verbindungen⁵⁾ nur auf die Carboxylgruppe, sondern erfasste die C-Kette, was aus den folgenden Versuchen hervorgeht. Wir haben eine oxydative Aufspaltung der Doppelbindungen der aktiven γ -Linolensäure nach den Angaben von *Rudloff*⁶⁾ mit Perjodat und Kaliumpermanganat vorgenommen und unter den Spaltprodukten Capron- und Adipinsäure annähernd gleicher Aktivität aufgefunden. Nach Oxydation der Ölsäure wurden Azelain- und Pelargonsäure isoliert und gemessen. Ferner oxydierten wir hochaktive Ölsäure, chromatographierten das Reaktionsgemisch und bestimmten auf dem Papier die Totalaktivitäten der Spaltprodukte.

Bei einer Entstehung der Ölsäure aus C_2 -Bruchstücken, d. h. $[1-^{14}C]$ -Acetat, müssen auf die Pelargonsäure vier radioaktive C-Atome und auf die Azelain-säure deren fünf entfallen. Wir fanden in Übereinstimmung mit diesen Vorstellungen die in der Tab. 2 angeführten Verhältnisse, wobei für die analysenreine Azelainsäure der Wert 5 angenommen wurde.

Tabelle 2.
Aktivität der Spaltprodukte der Ölsäure.

Probe Nr.	Aktivitäten c/min. mg		Anzahl der sign. C-Atome	
	Pelargon-säure	Azelain-säure	Pelargon-säure	Azelain-säure
1	1930	2480	3,89	5
2	2930	3700	3,96	5
3	2900	3620	4,01	5
4	1990	2600	3,82	5

Das Auftreten *radioaktiver Exspirationskohlendensäure* bei Versuchstieren nach Verabreichung ^{14}C -signierter Verbindungen ist ein sicherer Beweis, dass der

⁵⁾ D. R. Howton, R. H. Davis & J. C. Nevenzel, J. Amer. chem. Soc. **76**, 4970 (1954); S. Bergström, K. Pääbo & M. Rottenberg, Acta chem. scand. **6**, 1127 (1952).

⁶⁾ E. von Rudloff, J. Amer. Oil Chem. **33**, 126 (1956).

Organismus letztere oxydativ angreifen kann. Wir haben unter solchen Voraussetzungen den Abbau von Linolsäure und γ -Linolensäure bei je 4 männlichen Ratten geprüft und mit demjenigen der Ölsäure verglichen. Dabei wählten wir vorerst Tiere, welche längere Zeit nach *Burr & Burr*⁷⁾ fettfrei ernährt wurden und durch das Fehlen essentieller Fettsäuren hervorgerufene Hauterscheinungen zeigten.

Die Expirationskohlendioxid wurde bei allen 24 Std. dauernden Versuchen nach peroralen Gaben ölgiger Lösungen der Säuren anfänglich stündlich, später alle zwei Std. gesondert aufgefangen und auf Aktivität geprüft. Die Ergebnisse sind graphisch dargestellt (vgl. Fig. 1–3).

Abbau ¹⁴C-signierter Fettsäuren durch Mangel-Ratten.

Aktivitäten der Expirationskohlendioxid in % der applizierten Aktivität

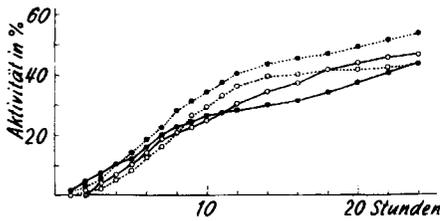


Fig. 1.
Ölsäure Tiere 1–4

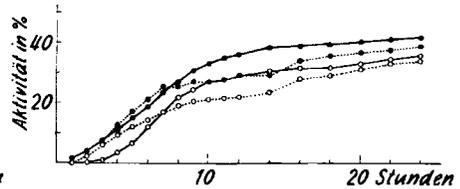


Fig. 2.
Linolsäure Tiere 5–8

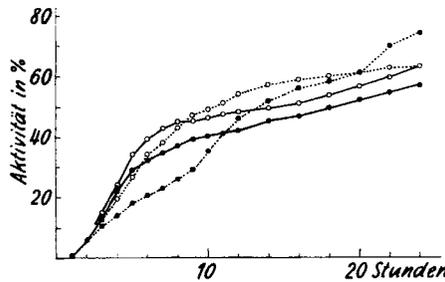


Fig. 3.
 γ -Linolensäure Tiere 9–12

Experimentelles. Die Züchtung des Pilzes in glucosehaltiger Nährlösung bei 20–21° erfolgte wie früher³⁾. Zu 50 ml derselben in 300 ml *Erlenmeyer*-Kolben fügten wir 1,0 ml ¹⁴C-Natriumacetatlösung (vgl. Tab. 3).

Nach sechs Tagen wird im allgemeinen ein Maximum des Lipidgehaltes erreicht. Wir erhielten z. B. bei einem Ansatz von 200 solchen Pilzkulturen nach Extraktion des Pilzmycels (51,2 g) mit peroxydfreiem Äther und anschliessend mit Methanol 13,8 g Rohlipide und daraus nach Verseifung 8,77 g Fettsäuren. Wir lösten letztere in 10 ml Aceton pro 1 g und kühlten langsam auf –30° ab. Dabei fallen die festen Fettsäuren als weisser Niederschlag beinahe quantitativ aus, während die flüssigen in Lösung bleiben. Der Niederschlag wird nach 12–18 Std. rasch abfiltriert und mit Aceton von –30° ausgewaschen. Es ergaben sich 5,07 g flüssige und 3,70 g feste Fettsäuren. Erstere haben wir

⁷⁾ G. O. Burr & M. M. Burr, J. biol. Chemistry **82**, 345 (1929).

Tabelle 3.

Der Nährlösung zugefügtes Acetat.

Anzahl der Kulturen	[1- ¹⁴ C]-Acetat		
	Menge mg	in ml H ₂ O	Gesamt- Aktivität
100	15,8	105	1 mc
200	31,6	215	2 mc
200	613	210	9,4 mc

in einer Verteilungs-Apparatur nach *von Metzsch*⁸⁾ (200 Einheiten) aufgetrennt. Als Unterphase verwendeten wir Formamid-Acetonitril-Eisessig 1:1:1 und als Oberphase Heptan. Beide Phasen wurden vor Beschickung gegeneinander abgesättigt. Die flüssigen Fettsäuren wurden in der Oberphase gelöst und in die ersten 10–15 Gläser des mit der Unterphase beschickten Verteilungsapparates eingefüllt. Während der ersten 200 Verteilungen ist eine kontinuierliche Abnahme an Oberphase in den ersten 2–3 Gläschen festzustellen, die durch Flüssigkeitszugabe aus einer Pipette kompensiert wurde. Nach 200 Verteilungen entnahmen wir jedem fünften Gläschen eine Probe und stellten durch Papierchromatographie⁹⁾ (Auftragung von 0,05 ml Lösung und normale Entwicklung) fest, dass die Trennungen noch unvollständig waren. Nach Weiterverteilung über 200 Stufen konnte mit der Entnahme begonnen werden. Wir erhielten aus der 26.–82. Fraktion Ölsäure, aus der 96.–170. Fraktion Linolsäure und aus der 201.–300. Fraktion Linolensäure. Ihre Reinheit wurde chromatographisch und spektrophotometrisch geprüft.

Aus der untenstehenden Tab. sind die mengenmässigen Ausbeuten und spezifischen Extinktionen ersichtlich:

Tabelle 4.

Fettsäure-Ausbeuten und spez. Extinktionen $E_{1\%}^{1\text{cm}}$

	Ansatz I		Ansatz II		Ansatz III	
	g	spez.Ext.	g	spez.Ext.	g	spez.Ext.
Ölsäure	1,03	—	1,84	—	2,39	—
Linolsäure λ 233 mμ	0,55	880	1,00	835	1,42	844
γ-Linolensäure λ 233 und 268 mμ	0,21	618, 640	0,80	620, 650	0,78	611, 615

Als *Versuchstiere* dienten männliche, weisse Ratten unseres Inzuchtstammes, die seit der Entwöhnung eine Diät⁷⁾ aus 84% Rohrzucker (Saccharose), 12% extrahiertem Casein, 4% Salzmischung und genügend Vitaminzusätzen (*Becozym*) erhielten. Alle wiesen schuppige Extremitäten und beginnendes Schachtelhalmschwanz-Symptom auf.

Die signierten Fettsäuren lösten wir in Olivenöl, wobei jeweils 0,5 ml eines solchen Gemisches mit der Schlundsonde verabreicht wurde. Die applizierten Aktivitäten betragen bei der Ölsäure 10'650'000, bei der Linolsäure 9'170'000 und bei der γ-Linolensäure 8'740'000 counts/min/Tier. Die Ratten befanden sich in Stoffwechsellkäfigen, so dass die Expirationskohlendioxid quantitativ gesammelt werden konnte. Die Bariumcarbonat-Fällungen und Aktivitätsmessungen der einzelnen Fraktionen erfolgten wie bei früheren Versuchen.

⁸⁾ E. Hecker, Verteilungsverfahren im Laboratorium, S. 41, Verlag Chemie, 1955.

⁹⁾ H. Wagner, L. Abisch & K. Bernhard, Helv. 38, 1536 (1955).

Diskussion der Ergebnisse.

Aus den auf biologischem Wege unter Heranziehung von $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat gewonnenen Lipiden konnten Ölsäure, Linolsäure und γ -Linolensäure genügend hoher Aktivität und Reinheit erhalten werden, um zu Stoffwechselversuchen verwendet zu werden.

Da über die C-Kette signierte Verbindungen vorlagen, also nicht Carboxyl- ^{14}C -Säuren verfüttert wurden, liess sich aus der Aktivität der Expirationskohlenensäure der zeitliche und quantitative Verlauf des völligen Abbaues bestimmen. In der Tab. 5 sind die nach 6 und nach 24 Std. gemessenen Aktivitäten angeführt, und es lässt sich ersehen, dass von der Ölsäure $46,7 \pm 4,3$, von Linolsäure $38,0 \pm 2,5$ und von der γ -Linolensäure $65,0 \pm 4,8\%$ im Verlaufe von 24 Std. oxydiert wurden. Innerhalb einer Versuchsgruppe von vier Tieren traten keine wesentlichen Schwankungen auf, vielmehr liegen für biologische Versuche bemerkenswerte Übereinstimmungen vor. Am meisten wurde die γ -Linolensäure abgebaut, die Unterschiede gegenüber Linolsäure und Ölsäure sind statistisch gesichert. Von letzterer wurde wiederum signifikant mehr oxydiert als von der Linolsäure. Es zeigte sich somit, dass unsere Mangeltiere diese essentielle Säure nach einmaligen Gaben im Vergleiche zur Ölsäure in etwas geringerem Masse abbauten, vielmehr offenbar als vom Organismus benötigt zurückhielten.

Tabelle 5.

Perorale Gaben ^{14}C -signierter Fettsäuren an Ratten. Aktivität der Expirationskohlenensäure in % der applizierten Aktivität.

	Tier		Aktivität der Exspir.-Kohlensäure	
	Nr.	Gewicht g	nach 6 Std.	nach 24 Std.
Ölsäure	1	158	14,9	43,7
	2	121	17,9	52,9
	3	116	14,3	46,2
	4	108	13,0	43,2
Linolsäure	5	112	19,7	42,0
	6	112	21,3	39,0
	7	102	12,0	36,1
	8	96	14,4	34,9
γ -Linolensäure	9	95	32,4	58,8
	10	99	20,1	74,7
	11	86	39,7	63,5
	12	94	33,1	63,3

Wenn man die Aktivitäten der Ausatemungskohlensäure nicht additiv zur Darstellung bringt, sondern für jede einzelne gemessene Probe in Abhängigkeit

von der Zeit aufträgt, ergeben die Mittelwerte den in Fig. 4 dargestellten Kurvenverlauf. Die höchsten Aktivitäten finden wir bei der γ -Linolensäure nach der fünften Std., bei der Linolsäure nach der sechsten und der Ölsäure nach der achten Std. Da alle drei Verbindungen in 0,5 ml Öl gelöst zur Applikation gelangten, sind unterschiedliche Aufnahmen aus dem Darm wohl kaum die Ursache dieses Verhaltens. Die Maxima betragen bei der γ -Linolensäure etwa 7%, bei den andern beiden Säuren nur etwa 4%. Es wäre denkbar, dass die Triensäure nach ihrer Penetration durch die Darmwand rascher in zum Abbau befähigte Organe (z. B. die Leber) gelangt, oder bevorzugter oxydiert wird als die andern beiden C_{18} -Säuren.

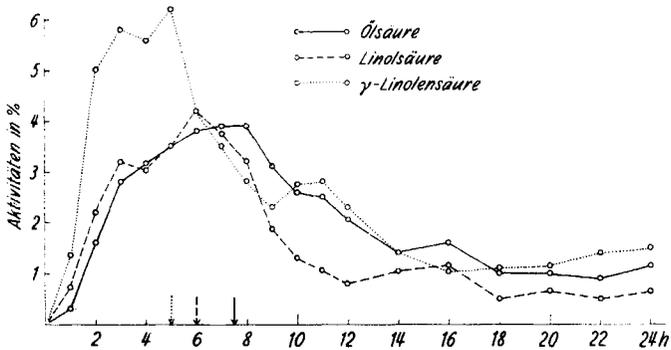


Fig. 4.

Gaben ^{14}C -signierter Fettsäuren.

Aktivitäten der Expirationskohlendioxid der Einzelproben.
Mittelwerte in je 4 Teilen.

Die mitgeteilten Befunde wurden an männlichen Ratten erhalten, die während 2–3 Monaten eine sehr einheitliche, kohlenhydratreiche (Rohrzucker), aber eiweissarme (Casein) und an essentiellen Fettsäuren völlig freie Nahrung erhielten. Wachstum und Gewicht sind im Vergleich zu Normaltieren reduziert, der Futterkonsum geringer und mitunter der Fettgehalt der Leber bereits vermehrt. Es handelt sich aber ohne Zweifel um ein sehr einheitliches, noch junges Tiermaterial, welches die Voraussetzungen für seine Verwendung zu Stoffwechselversuchen erfüllt.

Reinius¹⁰) verabreichte eine gleichfalls auf biologischem Wege gewonnene Linolsäure von allerdings nur sehr geringer Aktivität an eine Normal- und an eine Mangelratte. Da der Versuch nur sechs Std. dauerte und auf je ein Versuchstier beschränkt blieb, erlaubt er unseres Erachtens keine verbindlichen Aussagen. Andererseits haben Mead und Mitarbeiter¹¹⁾ nach Applikation carboxylsignierter Stearin- und Linolsäure an normale Mäuse Expirationskohlendioxid geringerer Aktivität erhalten, als bei analogen Versuchen an Tieren, die unter Mangel an essentiellen Fettsäuren litten. Die Ölsäure wurde hingegen von letzteren intensiver abgebaut als von Normaltieren.

¹⁰) L. Reinius & O. Turpeinen, Acta chem. scand. **8**, 1001 (1954).

¹¹) J. F. Mead, W. H. Slaton & A. B. Decker, J. biol. Chemistry **218**, 401 (1956).

Wir konnten bei normal gefütterten Ratten von dem der Mangeltiere ähnlichem Gewichte nach Linolsäure-, Linolensäure- oder Ölsäure-Verabreichung keine gesicherten Unterschiede in Bezug auf die Aktivität der Ausatemungskohlensäure feststellen¹²⁾. Es scheint uns ohne weiteres verständlich, dass bei gutem Ernährungszustande das noch wachsende Tier in Bezug auf die oxydative Verwertung nur geringfügig aufgenommener, selbst essentieller Fettsäuren, nicht unterschiedlich reagiert. Das kann sich aber, wie aus den mitgeteilten Befunden deutlich hervorgeht, ändern, wenn durch Mangel an lebensnotwendigen Fettsäuren und offenbar auch ungenügender Eiweiss-Versorgung geschädigte Tiere vorliegen.

Wir danken dem *Schweiz. Nationalfonds* für seine Unterstützung dieser Untersuchungen.

Zusammenfassung.

Es wird über die Gewinnung von ¹⁴C-Fettsäuren mit über die C-Kette verteilter Signierung berichtet und die Isolierung hochaktiver Ölsäure, Linolsäure und γ -Linolensäure aus dem Mycel in ¹⁴C-Acetat-haltiger Nährlösung gezüchteter Schimmelpilz beschrieben.

Nach peroralen Gaben kleiner Mengen dieser Verbindungen an nach *Burr & Burr* fettfrei ernährte Ratten, liessen sich auf Grund der Aktivität der Expirationskohlensäure Unterschiede im zeitlichen und quantitativen Ausmasse des völligen Abbaues feststellen. Am intensivsten wird γ -Linolensäure oxydiert, während Linolsäure in geringerer Ausmasse dem Abbau unterliegt und offenbar zurückgehalten wird. Der Abbau der Ölsäure ist intensiver als der der Linolsäure, aber geringer als der der Linolensäure.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel.

¹²⁾ *M. Rothlin*, Diss. med. Basel 1958 (im Druck).

116. Etude de composés d'addition des acides de *Lewis*. VII¹⁾. Moment de dipôle de composés formés par des nitrodérivés aromatiques et le bromure d'aluminium

par **P. Gagnaux**, **D. Janjic** et **B. P. Susz**.

(29. IV. 58.)

Au moyen de l'analyse thermique, *Menschutkin*²⁾ a, le premier, étudié les composés d'addition formés de nitrodérivés aromatiques et du bromure d'aluminium. *Ulich*³⁾ détermina ensuite leurs masses moléculaires par ébulliométrie et cryoscopie dans C₆H₆ et CS₂ et expliqua leur dimérisation partielle à l'état

¹⁾ VIème communication: *P. Chalandon & B. P. Susz*, *Helv.* **41**, 697 (1958).

²⁾ *B. Menschutkin*, *ж* **41**, 1053 (1909).

³⁾ *H. Ulich*, *Z. physikal. Chem. Bodenstein* Festband, 423 (1931).