

## 208. Inkorporation von $^{14}\text{C}$ -Acetat in die Fettsäuren der Cerebroside des Rattengehirnes

von **Karl Bernhard, A. Hany, L. Hausheer** und **W. Pedersen**

(3. VII. 62)

Die kürzlich beschriebene quantitativ günstig verlaufende Isolierung reiner Cerebroside aus kleinen Mengen der Gesamtlipide des Gehirns<sup>1)</sup> erleichtert Untersuchungen über den Stoffwechsel dieser wichtigen Lipidfraktion. Letztere ist vor allem charakterisiert durch das Vorkommen von  $\text{C}_{24}$ -Fettsäuren, über deren Biosynthese kürzlich **FULCO & MEAD**<sup>2)</sup> berichteten.

Beobachtungen über die Fettsäurebildungen im Gehirn erwachsener Ratten und wachsender junger Tiere im Zeitpunkte der Myelinisierung erbrachten vor mehr als 20 Jahren **WAELSCH, SPERRY & STOYANOFF**<sup>3)</sup> mit Hilfe von Deuterium als Indikator. **KLENK & Mitarbeiter**<sup>4)</sup> prüften Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Acetat und von  $^{14}\text{C}$ -Glucose in die Polyenfettsäuren der Glycerophosphatide des Gehirns und der Leber.

Um Einblicke in Bildung und Abbau der Cerebroside zu erlangen, untersuchten wir die Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in die Fettsäuren derselben. Das Acetat wurde dabei nicht oral, intraperitoneal oder intravenös verabreicht, wir injizierten es vielmehr in das Gehirn<sup>5)</sup>. Dabei wird weitaus der grösste Teil in ganz kurzer Zeit abgebaut: nach 90 Min. fanden wir bereits 99% der applizierten Aktivität in der Expirationskohlendioxid. In Fig. 1 sind die Gesamt- und spezifischen Aktivitäten des ausgeatmeten Kohlendioxids dargestellt. Schon 15 Min. nach erfolgter intracerebraler Injektion erreichte die spezifische Aktivität ihr Maximum. Kleine Acetatmengen werden indessen im Gehirn zurückgehalten und in die Fettsäuren eingebaut, deren spezifische Aktivität viel grösser ausfällt als diejenige der Leberfettsäuren (Tab. 1). Es gelingt damit eine deutliche Beschränkung der Signierung auf die Hirnfettsäuren.

Tabelle 1. *Spezifische Aktivitäten c/min·mg der Totallipide aus Gehirn und Leber von Ratten nach  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Injektion*

Total-lipide	Dauer (Stunden)						
	3	6	12	24	48	72	144
Gehirn . .	1630	1845	1310	1090	1330	1660	1155
	1110	1690	1060	1050	1230	1160	740
Leber*) . .	86	109	80	64	32	29	18
*) die Lebern von je 2 Tieren wurden vereinigt							

<sup>1)</sup> K. BERNHARD, A. HANY, L. HAUSHEER & W. PEDERSEN, *Helv.* 45, 1290 (1962).

<sup>2)</sup> A. J. FULCO & J. F. MEAD, *J. biol. Chemistry* 236, 2416 (1961).

<sup>3)</sup> H. WAELSCH, W. M. SPERRY & V. A. STOYANOFF, *J. biol. Chemistry* 135, 291, 297 (1940).

<sup>4)</sup> E. KLENK: *Metabolism of the Nervous System*, Pergamon Press, London 1957, p. 396.

<sup>5)</sup> N. J. NICHOLAS & B. E. THOMAS, *J. Neurochemistry* 4, 42 (1959).

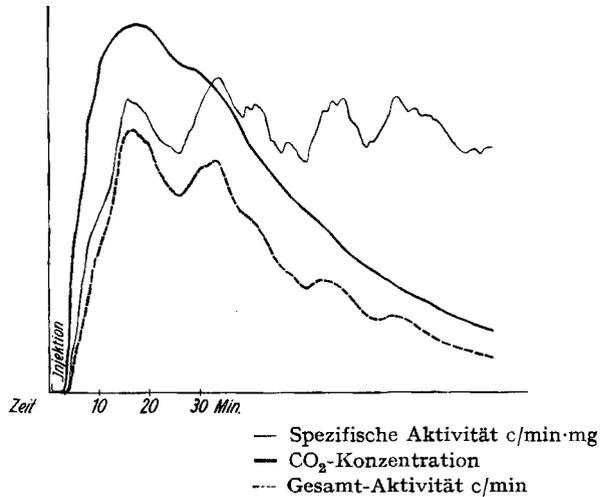


Fig. 1. Aktivität des Expirationskohlendioxids nach intracerebraler Acetatverabreichung

Um Angaben über den zeitlichen Verlauf des Acetat-Einbaues in die *Gesamtfettsäuren der Gehirnlipide* zu erhalten, haben wir 14 männlichen Ratten aktives Acetat injiziert und je zwei von ihnen nach 3, 6, 12, 24, 48, 72 und 144 Stunden getötet. Gehirn und Leber wurden herauspräpariert und durch Extraktion die Gesamtlipide gewonnen. Aus den nach Verseifung der Gehirnlipide erhaltenen Gesamtfettsäuren trennten wir gas-chromatographisch Palmitin-, Stearin- und Ölsäure ab. Ihre Aktivitäten sind aus Tab. 2 ersichtlich.

Tabelle 2. Spezifische Aktivitäten c/min·mg der Gehirnfettsäuren nach  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Injektion

Tiere Nr.	Dauer Std.	Totalfett-säuren	Palmitin-säure	Stearin-säure	Ölsäure
1 und 2	3	1720	2690	705	545
3 und 4	6	2330	4980	1670	950
5 und 6	12	1810	2845	1735	875
7 und 8	24	1655	2520	1690	930
9 und 10	48	1925	2705	1925	1340
11 und 12	72	1950	2110	1790	1750
13 und 14	144	1250	990	1225	1250

Darauf haben wir Gruppen männlicher Ratten im Alter von 8–9 Wochen 3 bzw. 72 Stunden nach erfolgter intracerebraler Acetatinjektion getötet und aus den vereinigten Gehirnen die *Cerebroside* isoliert. Die erhaltenen Mengen und die gemessenen Aktivitäten sind in Tab. 3 dargestellt. Aus den Cerebrosideen gewannen wir die Fettsäuren und trennten sie in gesättigte und ungesättigte und in nichtsubstituierte Säuren und Hydroxysäuren. Sie wurden als Methylester bzw. Methyläther gas-chromatographisch aufgetrennt. Von den in genügenden Mengen vorliegenden Komponenten bestimmten wir die spezifische Aktivität (s. Tab. 4 und 5). Die als Osazon isolierte Galaktose der Cerebroside hatte eine spezifische Aktivität von 10 c/min·mg.

Tabelle 3. Mengen und Aktivitäten aus Rattenhirn isolierter Totallipide und Cerebroside

Dauer Std.	Anzahl Ratten	Hirngewicht g	Totallipide			Rein-Cerebroside		
			mg	%	Spez. Akt. c/min·mg	mg	in % der Total-lipide	Spez. Akt. c/min·mg
3	20	31,1	2460	7,9	1040	300	12,2	198
72	25	38,2	2590	6,8	1240	355	13,7	722

Tabelle 4. Prozentuale Verteilung und Aktivitäten der einzelnen Komponenten des Gemisches der gesättigten bzw. ungesättigten nichtsubstituierten Cerebroside-Fettsäuren

C Zahl	Dauer: 3 h			Dauer: 72 h		
	%	Spez. Akt. c/min·mg	Akt. pro $\mu$ Mol	%	Spez. Akt. c/min·mg	Akt. pro $\mu$ Mol
<i>A. Gesättigte Säuren</i>						
14	1,3	—	—	1,6	—	—
16	21,7	909	$2,45 \cdot 10^5$	21,3	807	$2,18 \cdot 10^5$
18	20,6	544	$1,62 \cdot 10^5$	22,9	685	$2,04 \cdot 10^5$
20	7,5	260	$0,85 \cdot 10^5$	7,1	932	$3,04 \cdot 10^5$
22	12,5	145	$0,51 \cdot 10^5$	14,1	907	$3,21 \cdot 10^5$
23	6,5	0	0	3,4	453	$1,68 \cdot 10^5$
24	29,9	208	$0,78 \cdot 10^5$	29,6	1322	$5,05 \cdot 10^5$
<i>B. Ungesättigte Säuren</i>						
16	2,6	—	—	2,0	—	—
18 1	23,3	270	$0,79 \cdot 10^5$	21,9	1293	$3,82 \cdot 10^5$
18 2	0,5	—	—	0,4	—	—
20	2,1	—	—	2,5	—	—
22	3,5	—	—	3,6	—	—
24	68,0	220	$0,84 \cdot 10^5$	69,6	1270	$4,82 \cdot 10^5$

Tabelle 5. Prozentuale Verteilung und Aktivitäten der einzelnen Komponenten des Gemisches der gesättigten bzw. ungesättigten Hydroxyfettsäuren aus den Cerebroside

C Zahl	Dauer: 3 h			Dauer: 72 h		
	%	Spez. Akt. c/min·mg	Akt. pro $\mu$ Mol	%	Spez. Akt. c/min·mg	Akt. pro $\mu$ Mol
<i>A. Gesättigte Säuren</i>						
18	0,5	—	—	0,6	—	—
20	1,1	—	—	2,0	—	—
21	0,5	—	—	0,4	—	—
22	25,4	111	$0,41 \cdot 10^5$	25,6	731	$2,71 \cdot 10^5$
23	3,5	0	0	3,0	592	$2,27 \cdot 10^5$
24	57,8	269	$1,07 \cdot 10^5$	58,4	908	$3,62 \cdot 10^5$
25	4,3	—	—	3,9	—	—
26	6,9	—	—	6,1	—	—
<i>B. Ungesättigte Säuren</i>						
24	100	175	$0,69 \cdot 10^5$	100	1650	$6,53 \cdot 10^5$

Beim länger dauernden Versuch wurden aus den Gesamtlipiden des Gehirnes zwei Phosphatidfraktionen mit spezifischen Aktivitäten von 1770 und 1100 c/min·mg isoliert. Die Cholesterin-Neutralfett-Fraktion hatte eine spezifische Aktivität von 1082 c/min·mg, das abgetrennte reine Cholesterin eine solche von 992. Wir haben schliesslich die Fettsäuren der Phosphatidfraktion I gewonnen, deren spezifische Aktivität 2840 c/min·mg betrug.

Bei beiden Versuchen wurden zudem auch die Aktivitäten der Leberlipide (vgl. Tab. 6) und einiger Leberfettsäuren gemessen (Tab. 7).

Tabelle 6. *Spezifische Aktivitäten (c/min · mg) der Leberlipide*

Dauer Std.	Gesamtlipide	Fettsäuren	Phosphatide		Cholesterin
			I	II	
3	84	86	–	–	–
72	28,5	30	17	25	50

Tabelle 7. *Prozentuale Verteilung und Aktivitäten der Leberfettsäuren*

C Zahl	Dauer: 3 h		Dauer: 72 h	
	%	Spez. Akt. c/min · mg	%	Spez. Akt. c/min · mg
14	–	–	0,5	–
16	33,7	164	36,4	22
16 1 $\overline{=}$	3,7	–	2,8	–
18	16,5	59	17,9	47
18 1 $\overline{=}$	15,3	16	16,9	24
18 2 $\overline{=}$	18,8	–	15,6	–
20 4 $\overline{=}$	10,4	–	8,3	–
>20	1,6	–	2,1	–

### Experimentelles

A. *Applikation des Na-Acetates*. Die Versuche wurden an weissen männlichen Ratten im Alter von 8–9 Wochen mit einem Gewicht von 150–200 g durchgeführt. Die 1-<sup>14</sup>C-Essigsäure haben wir selber hergestellt, das Na-Acetat hatte eine spezifische Aktivität von  $9,4 \cdot 10^7$  c/min·mg. Es wurde in RINGER-Lösung injiziert.

Vor der Injektion erhielten die Tiere eine Äther-Tropfnarkose. Die Einstichstelle wählten wir einige Millimeter vor der Verbindungslinie der beiden oberen Ohransätze. Die Injektion erfolgte in das rechte Parietalhirn paramedian. Die Nadel war mit einer Arretierungseinrichtung versehen, um ein zu tiefes Eindringen zu verhindern. Jeder Ratte injizierten wir 0,1 mg der erwähnten Lösung, enthaltend 0,16 mg Acetat mit einer Aktivität von  $1,5 \cdot 10^7$  c/min. Die Tiere erwachten bereits 2–3 Minuten nach dem Einstich. Wir töteten sie nach Beendigung des Versuches in Äthernarkose durch Punktion des rechten Ventrikels. Die *Vena cava* wurde durchschnitten und in den linken Ventrikel etwa 40 ml 3,8-proz. Natriumcitratlösung zur möglichst vollständigen Entfernung des verbleibenden Blutes injiziert. Die Organe waren danach völlig weiss. Anschliessend erfolgte die Herausnahme des Gehirnes und der Leber. Es konnten gelegentlich Hirnblutungen beobachtet werden. In solchen Fällen war die Aktivität der Fettsäuren meist nur gering, indem die leichte Permeierung des Acetates beeinträchtigt wurde.

B. *Aufarbeitung der Gehirne*. Dieselben wurden bei jedem Versuch vereinigt und daraus nach FOLCH<sup>6)</sup> die Gesamtlipide extrahiert. Die diesbezüglichen Ergebnisse für die Tiere 1–14 zeigt

<sup>6)</sup> J. FOLCH, M. LEES & S. G. H. STANLEY, J. biol. Chemistry 226, 497 (1957).

Tab. 8. Für die Gewinnung der Fettsäuren wurden die Totallipide von je 2 Tieren vereinigt. Die prozentualen Anteile an Palmitin-, Stearin- und Ölsäure ergeben sich gleichfalls aus dieser Tabelle.

Die Abtrennung der Cerebroside erfolgte nach unserem bereits mitgeteilten Verfahren. Beim Versuch von 3tägiger Dauer wurden die Neutralfette mit Cholesterin und zwei Phosphatidfraktionen abgetrennt. Dazu haben wir die Chloroform-Methanol-Fraktion, welche die Aloxkolonne vor dem Gradienten durchlief, eingedampft und 1,37 g Rückstand erhalten. Wir brachten 300 mg davon auf eine Silicagelkolonne (Durchmesser von 1,5 cm), welche mit 45 g Silicagel (Korngrösse 0,2–0,5 mm) gefüllt und mit 100 ml Äther und 100 ml Petroläther durchgespült war. Mit 150 ml Petroläther eluierten wir eine Phosphatidfraktion I, mit 150 ml Äther eine Cholesterin- und Neutralfett-Fraktion und mit 250 ml Chloroform:Methanol 1:1 eine Phosphatidfraktion II. Mengemässig erhielten wir in dieser Reihenfolge: 111,126 und 30 mg. Die P-Gehalte betragen 3,25, 0 und 1,59%. Wir haben aus der ersten, auf Grund des hohen P-Gehaltes hochgereinigte Phosphatide enthaltenden Fraktion die Fettsäuren erhalten, indem wir 100 ml mit 7 ml einer Lösung, bestehend aus 30 ml Methanol, 30 ml Wasser + 20 g KOH 2 Stunden bei Siedehitze hydrolysierten. Die Fettsäuren wogen 40 mg.

Tabelle 8. *Gesamtlipide und Fettsäuren aus den Gehirnen der Ratten 1–14*

Dauer Std.	Total-lipide mg	Fettsäuren*			
		mg	Prozente		
			Palmitins.	Stearins.	Öls.
3	98	55	30,1	23,5	22,2
	110				
6	120	60	29,7	18,5	25,6
	107				
12	113	65	34,3	15,8	25,1
	105				
24	115	65	31,0	16,9	24,2
	126				
48	111	66	28,6	18,6	24,2
	117				
92	112	71	28,6	21,6	20,0
	125				
144	115	58	28,8	20,7	18,4
	108				

\* zur Isolierung wurden die Gesamtlipide von je 2 Tieren vereinigt

Die Abtrennung des Cholesterins erfolgte durch Verseifung der Cholesterin-Neutralfett-Fraktion.

C. *Isolierung der Fettsäuren aus den Cerebroside.* Zur Isolierung der Fettsäuren hydrolysierten wir z. B. 340 mg Cerebroside 6 Std. mit 17 ml 10-proz. methanolischer Schwefelsäure bei 85–90°. Das abgekühlte Hydrolysat wurde dreimal mit Petroläther ausgeschüttelt, dieser mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand ergab mit Diazomethan behandelt, 140 mg, bei Versuch II (3 Tage Dauer) aus 305 mg Cerebroside 137 mg Fettsäure-methylester.

1. *Abtrennung der Hydroxyfettsäuren.* 13,5 g Silicagel (Kieselgel MÉRCK, unter 0,08 mm, 10mal mit gewöhnlichem Wasser, zweimal mit dest. Wasser und einmal mit Chloroform-Methanol 2:1 gewaschen und bei 140° getrocknet) wurden in Äthylenchlorid aufgeschwemmt und in eine Kolonne (2 cm Durchmesser) gefüllt. Wir lösten 137 mg des Estergemisches in wenig Äthylenchlorid, mischten etwas Kieselgur bei und fügten ein paar Tropfen einer Lösung von Sudanrot G in Äthylenchlorid hinzu. Das Ganze gelangte auf die Kolonne, worauf die Fettsäureester mit

Äthylchlorid eluiert werden. Im abfließenden Lösungsmittel (ca. 40 ml) sind zuerst die Nicht-hydroxyfettsäureester vorhanden. Anschliessend erscheinen das Sudanrot und, wenn dieses völlig ausgewaschen ist, mit ca. 500 ml Äthylchlorid die Methylster der Hydroxyfettsäuren. Die Trennung wird durch Prüfung auf einer Silicagelplatte verfolgt. Wir erhielten z. B. 51 mg Nicht-hydroxy- und 73 mg Hydroxyfettsäuremethylster.

2. *Trennung in gesättigte und ungesättigte Methylster.* Wir arbeiteten nach den Angaben von KISHIMOTO & RADIN<sup>7)</sup>, verwendeten z. B. 50 mg Estergemisch, eluierten aber die gesättigten Ester von der Florisil-Kolonnen mit 450 ml Hexan-Äther 9:1. Die Ausbeute an ungesättigten Estern betrug 18 mg, an gesättigten 32 mg. Das Verfahren bleibt für die Trennung der Hydroxyfettsäuren dasselbe. Wir erhielten aus 72 mg Hydroxyfettsäure-Estergemisch 42 mg gesättigte und 26 mg ungesättigte Hydroxyfettsäureester.

3. *Analyse der Fettsäuregemische.* Die Nichthydroxyfettsäureester konnten direkt gas-chromatographiert werden, diejenigen der Hydroxyfettsäuren erst nach Überführung in die Methyläther, was mit Hilfe von Methyljodid und Silberoxid fast quantitativ gelingt.

Die gas-chromatographischen Analysen erfolgten mit einem Instrument von BECKMAN, welches das Auffangen einzelner Fraktionen zur späteren Aktivitätsbestimmung erlaubt. Als stationäre Phase verwendeten wir 25% Äthylenglykol-bernsteinsäure-polyester auf Hyflo-Supercell (60–80 mesh). Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden entsprechende Vorsichtsmassnahmen getroffen.

D. *Isolierung der Galaktose aus den Cerebrosiden.* Wir erhitzen 45 mg Cerebroside während 2 Stunden mit 9 ml 3N Salzsäure im siedenden Wasserbad, schüttelten darauf 2mal mit Chloroform aus und dampften die Salzsäurephase im Vakuum ein. Den gelben Rückstand (25 mg) extrahierten wir zur Entfernung von Verunreinigungen mit Aceton. Er enthielt etwa 10 mg Galaktose. Wir gewannen mit Phenylhydrazin und Na-Acetat ein Osazon, das nach Umkristallisation einen Smp. von 197–199° aufwies.

E. *Isolierung der Leberlipide.* Aus den vereinigten Organen erhielten wir durch Extraktion die Gesamtlipide (z. B. 8,21 g aus 20, bzw. 6,3 g aus 10 Lebern) und isolierten die Fettsäuren und Phosphatide mit 3,28 und 2,38% Phosphor.

F. *Bestimmung der Acetat-Veratmung im Gehirn.* Wir benutzten eine nach HOLT & SCHMIDT<sup>8)</sup> modifizierte TOLBERT-Apparatur<sup>9)</sup> und brachten die bereits vorher an den Käfig angewöhnten Ratten sofort nach der Injektion in die Stoffwechselkammer. Sie verharteten darin 3 Std.<sup>10)</sup>

**Diskussion der Ergebnisse.** – Acetat lässt sich ohne Störungen Ratten intracerebral injizieren. Dabei wird die Hauptmenge sofort veratmet, ein geringer Teil aber im Verlaufe von 6 Std. in die Gehirnlipide eingebaut, deren spezifische Aktivität nach dieser Zeit ein Maximum erreichte. Wir trennten drei der hauptsächlichsten Fettsäuren ab und bestimmten ihre Aktivität. Sie war für die Palmitinsäure nach 6 Std. am höchsten und nahm dann bis zur 144. Std. allmählich ab. Umgekehrt wiesen Stearin- und Ölsäure am Anfang niedrige, gegen das Ende des Versuches höhere spezifische Aktivitäten auf. Wir berechneten auf Grund des Anteiles jeder dieser drei Säuren an den Gesamtfettsäuren (vgl. Tab. 8) ihren prozentualen Aktivitätsanteil und erhielten Werte, die in Fig. 2 dargestellt sind.

Die Aktivität der Leberlipide (vgl. Tab. 1) war um ein Vielfaches geringer als diejenige der Gehirnlipide und ging im Verlaufe von 6 Tagen auf ein Viertel ihres ursprünglichen Wertes zurück. Nur ein kleiner Teil des nicht sofort veratmeten Acetates verliess auf dem Blutwege das Gehirn; was verblieb, wurde sehr rasch in die Fettsäuren eingebaut. Deren spezifische Aktivitäten erfuhren später nur durch

<sup>7)</sup> Y. KISHIMOTO & N. S. RADIN, J. Lipid Res. 1, 79 (1959).

<sup>8)</sup> C. v. HOLT & H. SCHMIDT, Biochem. Z. 334, 516 (1961).

<sup>9)</sup> B. M. TOLBERT, A. M. HUGHES, M. R. KIRK & M. CALVIN, Arch. Biochemistry 60, 301 (1956).

<sup>10)</sup> Wir danken der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG. für die Benützung ihrer diesbezüglichen Einrichtungen und Herrn Dr. G. BRUBACHER für seine wertvollen Ratschläge.

Umwandlungsprozesse Veränderungen, da die Acetatkonzentration nach wenigen Stunden bereits zu gering war, um einen Einfluss auszuüben. Daher erlauben die unterschiedlichen Aktivitäten der aus den Cerebroside isolierten Fettsäuren Rückschlüsse auf ihre Bildung und ihren Einbau in die Cerebroside.

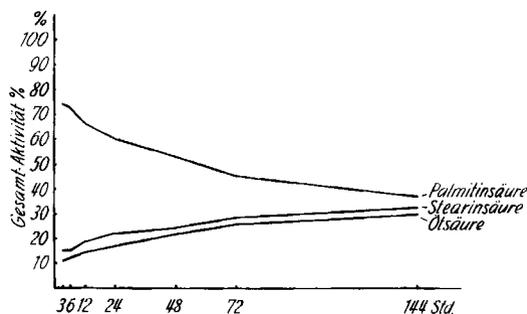


Fig. 2. Verteilung der Aktivität der drei hauptsächlichsten Fettsäuren der Gesamtlipide auf die Einzelkomponenten: Palmitin-, Stearin- und Ölsäure

Beim kurzfristigen Versuch wies die Palmitinsäure weitaus die höchste spezifische Aktivität auf. Sie war an den Gesamt-Cerebrosidefettsäuren (vgl. Tab. 9) zu etwa 6% und an der Gesamtaktivität zu 21% beteiligt. Die Lignocerinsäure hatte nach 3 Std. eine spezifische Aktivität von 208, nach 72 Std. eine solche von 1322, und übertraf damit alle übrigen gesättigten Säuren. Nachdem der Verdünnungseffekt durch vorhandene, nicht signierte Anteile beim ähnlichen prozentualen Vorkommen (6 bzw. 8%) für Lignocerinsäure und Palmitinsäure nicht sehr verschieden sein konnte, spricht die anfänglich geringe spezifische Aktivität der Lignocerinsäure für ihre Bildung durch Kettenverlängerung aus Palmitinsäure. Wir gelangten somit bei unserer Versuchsordnung zu einem anderen Resultat als FULCO & MEAD<sup>2)</sup>, welche, nach wiederholter intraperitonealer Injektion von <sup>14</sup>C-Acetat, auf Grund der Isotopenverteilung die Synthese der Lignocerinsäure von Acetat ausgehend postulierten. Unseres Erachtens ist unter diesen Bedingungen keine solche Entscheidung möglich, die gleichmässige Verteilung der Aktivität auf alle C-Atome kann durch die stets nachfolgenden Acetatmengen zustande kommen.

Auch Arachin- und Behensäure, die nur geringfügig vorkamen und erst später eine höhere spezifische Aktivität aufwiesen, werden langsamer als Palmitinsäure aufgebaut. Nach 3 Std. stellten wir in der C<sub>23</sub>-Säure keine, nach 72 Std. aber eine merkbare Aktivität fest, was ganz analog für die C<sub>23</sub>-Hydroxysäure galt. Letztere bildet sich offenbar gleichzeitig mit oder aus der unsubstituierten Tricosansäure.

Die Ölsäure wies im kurzdauernden Versuch nur die Hälfte der Aktivität der Stearinsäure auf. Nach drei Tagen war ihr Wert aber fünfmal höher und entsprach der spezifischen Aktivität der Nervonsäure, von welcher FULCO & MEAD annehmen<sup>2)</sup>, sie entstehe aus Ölsäure durch Kettenverlängerung.

Die Aktivität der Cerebronsäure betrug beim Versuch von kurzer Dauer 269 und war nach 3 Tagen von der Grössenordnung derjenigen der C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-nicht-substituierten gesättigten Säuren. Die spezifische Aktivität war also anfänglich höher, dann aber tiefer als diejenige der Lignocerinsäure. Cerebronsäure wird rascher

Tabelle 9. *Prozentuale Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren und prozentuale Anteile der einzelnen Komponenten an der Gesamtaktivität*

C Zahl	Dauer: 3 h		Dauer: 72 h	
	% des Fettsäure- gemisches	% Anteil an der Ge- samtaktiv.	% des Fettsäure- gemisches	% Anteil an der Ge- samtaktiv.
<i>Gesättigte Normalfettsäuren</i>				
14	0,36	–	0,46	–
16	5,95	21,4	6,15	4,5
18	5,61	12,2	6,62	4,1
20	2,06	2,1	2,05	1,8
22	3,43	2,0	4,06	3,4
23	1,78	0	0,98	0,5
24	8,18	6,7	8,54	10,3
<i>Ungesättigte Normalfettsäuren</i>				
16	0,38	–	0,27	–
18 1 <sup>  </sup>	3,50	3,7	2,94	3,5
18 2 <sup>  </sup>	0,07	–	0,05	–
20	0,32	–	0,34	–
22	0,52	–	0,48	–
24	10,03	8,9	9,33	10,9
<i>Gesättigte Hydroxyfettsäuren</i>				
18	0,18	–	0,19	–
20	0,39	–	0,63	–
21	0,18	–	0,12	–
22	9,13	4,0	7,93	5,3
23	1,27	0	0,94	0,5
24	20,81	23,8	18,00	15,0
25	1,55	–	1,2	–
26	2,49	–	1,89	–
<i>Ungesättigte Hydroxyfettsäuren</i>				
24	21,81	15,1	26,88	40,2

auf- und abgebaut als Lignocerinsäure, aus welcher sie nicht entsteht, sie müsste sonst die gleiche Aktivität wie diese haben.

Von allen vier C-24-Säuren wies nach 3 Tagen die Hydroxynervonsäure die höchste spezifische Aktivität auf. Hydroxynervonsäure war im Fettsäuregemisch mit 22 und 27% vorhanden, also reichlicher als die Cerebron- und vor allem die Lignocerin- und Nervonsäure. Die festgestellten Aktivitätsunterschiede (1270 und 1650) sprechen nicht für die Entstehung der Hydroxynervonsäure aus der Nervonsäure. Ersterer wird bevorzugt gebildet, war mengenmässig am reichlichsten vertreten und machte 40% der Gesamtaktivität aus.

Cholesterin zeigte nach 72 Stunden eine Aktivität, welche diejenige der Gesamtcerebroside etwas übertraf, während die Phosphatide, insbesondere ihre Gesamtfettsäuren in viel stärkerem Masse signiert waren als die stärkst aktive Cerebrosidefettsäure. Der Fettsäureeinbau in die Phosphatide dürfte daher rascher verlaufen als in die Cerebroside.

Unsere Versuche lassen erkennen, dass im Gehirn ein rascher Auf- und Abbau von Palmitinsäure stattfindet und die langkettigen, geradzahligen, normalen und substituierten Fettsäuren aus Palmitinsäure durch Kettenverlängerung entstehen.

Die mitgeteilten Untersuchungen wurden mit Mitteln der ATOMKOMMISSION DES SCHWEIZ. NATIONALFONDS durchgeführt, wofür wir bestens danken.

Herrn Dr. HERIBERT WAGNER sind wir für seine wertvollen Ratschläge, insbesondere für die Mitteilung des Verfahrens zur Phosphatidabtrennung, zu Dank verpflichtet.

#### SUMMARY

Acetate injected into rat brains is rapidly oxidized, a small part, however, is incorporated into the brain lipids. Already after six hours the total fatty acids show a maximum activity, which is highest for palmitic acid. As there is practically no more acetate available after this time, we have to explain later changes of activity as transformations. Cerebrosides were isolated from rat brains 3 and 72 hours after injection. Their fatty acids were separated by gas-chromatography. Palmitic acid had a high initial activity, acids with 18, 20, 22, 23 and 24 C-atoms at the beginning had a low one, which increased remarkably later on. The conclusion may be drawn that palmitic acid has a rapid turnover in brain. It is the precursor for the higher saturated and unsaturated, evennumbered fatty acids, whose rate of synthesis is lower.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel

### 209. 14 $\beta$ -Artebufogenin

Über Krötengifte, 29. Mitteilung<sup>1)</sup>

von M. S. Ragab, Horst Linde und Kuno Meyer

(5. VII. 62)

Resibufogenin (I) wird durch kurzes Erhitzen in Aceton, das katalytische Mengen Perchlorsäure enthält, u. a. zum 14 $\alpha$ -Artebufogenin (III) umgelagert<sup>2)</sup>. Dessen Acetylverbindung IV geht bei der Chromatographie an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> grösstenteils in das isomere 14 $\beta$ -Keton VI über, das in Kristallen gewonnen werden konnte<sup>3)</sup>. Auch 14 $\alpha$ -Artebufogenin (III) selbst wird durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (oder HClO<sub>4</sub>) in das isomere Keton V umgelagert, doch scheint hier diese Isomerisierung weniger gut zu verlaufen, denn die rohen Reaktionsprodukte enthielten auf Grund der Papierchromatographie jeweils etwa gleiche Mengen von III und V<sup>2)</sup>. III konnte aus diesen Gemischen leicht durch Kristallisation zurückgewonnen werden. 14 $\beta$ -Artebufogenin (V) dagegen liess sich nur durch präparative Papierchromatographie als einheitliche Substanz erhalten, die aber bisher nicht kristallisierte<sup>3)</sup>.

Dem 14 $\beta$ -Artebufogenin (V) kommt besondere Bedeutung zu, da es am Asymmetriezentrum C-14 gleiche Konfiguration (*cis*-Verknüpfung der Ringe C/D) wie die

<sup>1)</sup> 28. Mitt.: F. BERNOULLI, H. LINDE & K. MEYER, Helv. 45, 240 (1962).

<sup>2)</sup> H. LINDE & K. MEYER, Helv. 42, 807 (1959).