

Bei den vorliegenden Versuchen haben wir sowohl die Bestimmungsmethoden, als auch die Prozedur zur Gewinnung normaler menschlicher Darmschleimhaut angewandt, die an anderer Stelle eingehend beschrieben werden<sup>4)</sup>, mit dem einzigen Unterschied, dass das Homogenat für die hier besprochenen Versuche in bidestilliertem Wasser vorbereitet wurde. Die «Mikrosomen-Mikrovilli» wurden als solche als Enzympräparat gebraucht. Zur Herstellung der Lösungen ist ebenfalls bidestilliertes Wasser gebraucht worden.

Wir möchten an dieser Stelle der ASSOCIATION FOR AID FOR CRIPPLED CHILDREN, New York, USA., und dem COLLEGIO GHISLIERI, Pavia, Italien, für die finanzielle Unterstützung recht herzlich danken.

#### SUMMARY

The invertase activity of human intestinal mucosa is activated by  $\text{Na}^+$  and, to a smaller extent, by  $\text{K}^+$ . It is inhibited by  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ . Similar results have been obtained with isomaltase and maltase activities. The activation and the inhibition constants respectively of these cations on invertase activity have been determined.

Aus dem Biochemischen Institut und dem Kinderspital  
der Universität Zürich

<sup>4)</sup> S. AURICCHIO, A. RUBINO, R. TOSI, G. SEMENZA, M. LANDOLT, H. KISTLER & A. PRADER, J. clin. Investigation 1963, im Druck; G. SEMENZA & S. AURICCHIO, Biochim. biophysica Acta 1963, im Druck.

### 194. Vitamin E und Arachidonsäure-Bildung in der Leber

von Karl Bernhard, Susanne Leisinger und Winfried Pedersen

Herrn Prof. Dr. F. LEUTHARDT zum 60. Geburtstag gewidmet

(17. VI. 63)

Die Rolle des Tocopherols als Antioxydants der Lipide *in vivo* und *in vitro* war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen<sup>1)</sup>. Nach DAMM<sup>2)</sup> beruht seine Bedeutung für den Tierkörper vor allem auf dieser Eigenschaft. WISS *et al.*<sup>3)</sup> beobachteten nach Linolsäurefütterung an Ratten eine ausgesprochene Verminderung des Vitamin-E-Gehaltes der Lebermikrosomen und Lebermitochondrien. PRITCHARD & SINGH<sup>4)</sup> wollen auf Grund von Lipoxydase-Bestimmungen bei Vitamin-E-defizitären Ratten Abnahmen des Polyenfettsäuregehaltes der Leber im Ausmasse von 61% festgestellt haben.

Wir konnten zeigen, dass mässige  $\alpha$ -Tocopherol-Gaben an weibliche Ratten, welche längere Zeit eine Vitamin-E-freie, Linolsäure-reiche Diät erhielten, eine ausgeprägte Verminderung des Arachidonsäuregehaltes der Leberlipide bewirken<sup>5)</sup>.

Diese Hemmung der Bildung der Arachidonsäure aus Linolsäure im Tierkörper wurde durch weitere Versuche bestätigt. Wir haben nach normaler oder Vitamin-E-

<sup>1)</sup> A. L. TAPPEL, Vitamins Hormones 20, 493 (1962).

<sup>2)</sup> H. DAM, Vitamins Hormones 20, 527 (1962).

<sup>3)</sup> O. WISS, U. GLOOR & F. WEBER, Helv. physiol. pharmacol. Acta 20, C 91 (1962).

<sup>4)</sup> E. T. PRITCHARD & H. SINGH, Research Communications 2, 184 (1960).

<sup>5)</sup> K. BERNHARD, F. LINDLAR, P. SCHWED, J. P. VUILLEUMIER & H. WAGNER, Z. Ernährungsforsch., im Druck.

Tabelle 1. *Prozentuale Zusammensetzung der Leberfettsäuren nach ölhaltigem bzw. schweinefetthaltigem bzw. wechselndem Futter (% Methyl ester)*

Futter- Fett	Fett- säuren	ohne Vitamin E					mit Vitamin E						
		Gruppe	Tier Nr.					Gruppe	Tier Nr.				
			1	2	3	4	5		6	7	8	9	10
Öl	14:0	A <sub>1</sub>	0,8	1,6	0,7	0,9	0,8	A <sub>2</sub>	0,7	1,6	1,2	0,9	1,5
	14:1		0,5	0,8	—	—	0,5		0,2	0,6	0,8	0,6	0,5
	16:0		18,3	20,8	22,1	17,0	18,9		23,7	21,0	28,1	24,9	23,5
	16:1		2,8	4,1	2,5	2,5	2,6		2,0	3,4	4,9	2,8	4,5
	18:0		28,1	19,1	28,2	19,5	26,5		22,2	19,8	16,4	23,0	19,6
	18:1		13,9	16,5	12,9	16,5	14,3		15,1	17,3	18,6	13,9	16,5
	18:2		17,8	18,8	17,4	22,6	18,3		21,4	27,4	19,0	19,5	18,8
	20:4		17,8	18,8	17,6	20,4	18,1		14,8	8,9	11,2	14,4	15,1
Schweine- fett	14:0	B <sub>1</sub>	0,7	1,3	0,7	0,4	0,8	B <sub>2</sub>	0,7	1,4	1,3	0,9	1,1
	14:1		0,4	—	0,2	0,2	0,7		0,4	1,4	—	0,3	0,8
	16:0		25,0	22,2	30,3	19,0	28,2		22,2	30,2	28,0	28,2	18,7
	16:1		3,4	3,7	3,8	2,6	4,3		4,0	7,6	7,5	5,4	4,6
	18:0		24,1	33,2	24,6	28,8	23,0		22,8	20,9	20,1	22,2	19,7
	18:1		34,3	27,7	33,9	34,0	27,3		31,9	31,0	31,5	29,6	30,2
	18:2		4,5	4,4	3,3	4,7	5,9		4,9	3,5	4,6	5,7	7,7
	20:4		7,8	7,4	3,0	10,5	9,8		13,2	4,0	7,0	7,7	17,2
anfäng- lich Öl, dann Schweine- fett	14:0	C <sub>1</sub>	0,3	0,6	0,6	0,6	0,7	C <sub>2</sub>	0,8	0,7	0,4	1,0	0,8
	14:1		0,1	0,3	0,2	0,3	0,4		0,4	0,5	0,2	0,5	0,4
	16:0		27,2	29,8	25,0	24,0	25,2		27,3	21,7	24,6	20,9	25,4
	16:1		1,9	2,2	3,4	4,4	3,2		4,0	4,4	2,7	3,5	3,2
	18:0		23,0	29,7	22,1	25,4	28,8		22,9	25,4	27,2	24,8	22,9
	18:1		34,4	30,0	32,5	27,6	23,3		27,3	27,9	28,6	26,3	28,5
	18:2		5,7	5,0	5,9	6,8	6,3		6,4	11,4	7,3	7,6	8,8
	20:4		7,4	3,3	10,2	10,3	12,4		11,2	8,1	8,9	15,4	10,1
anfäng- lich Schweine- fett, dann Öl	14:0	D <sub>1</sub>	0,9	0,7	1,0	0,7	0,8	D <sub>2</sub>	1,2	1,2	0,7	1,2	0,6
	14:1		0,8	0,2	0,6	0,5	0,3		—	0,7	0,4	0,7	0,4
	16:0		18,7	20,9	19,8	20,7	22,5		26,5	23,1	23,6	27,5	24,6
	16:1		3,3	2,6	2,9	2,2	2,9		3,9	3,9	2,5	4,4	2,3
	18:0		20,8	22,8	21,9	22,8	22,7		26,8	23,0	19,5	19,7	24,3
	18:1		16,7	17,3	15,5	16,8	17,5		19,2	18,2	17,5	19,3	17,4
	18:2		22,2	19,4	21,8	20,8	17,7		15,7	15,2	23,5	15,6	17,2
	20:4		16,2	16,2	16,7	15,5	15,6		6,8	14,7	12,3	11,8	13,3

freier Fütterung verschiedener Dauer die Fettsäuren der Leberlipide und des Depotfettes von Ratten analysiert. Ferner wurde mit Hilfe von <sup>14</sup>C-Acetat der Einfluss des Tocopherols auf die Kettenverlängerung der Linolsäure zur Arachidonsäure untersucht.

Tabelle 2. Zusammensetzung der Gesamtfettsäuren aus der Leber während 60 Tagen mit einer an Polyenfettsäuren armen Diät ohne oder mit Vitamin E gefütterter Ratten (% Methyl ester)

% Fettsäuren	ohne Vitamin E						mit Vitamin E					
	Tier Nr.						Tier Nr.					
	I	II	III	IV	V	Mittel	VI	VII	VIII	IX	X	Mittel
16:0	26,3	23,5	22,1	23,8	25,2	24,2	26,6	25,7	23,2	31,0	27,5	26,7
16:1	2,8	3,0	2,7	3,4	3,3	3,0	2,5	4,0	4,2	1,8	3,9	3,3
18:0	17,1	13,7	16,8	15,5	18,7	16,4	14,8	18,1	14,2	24,9	15,4	17,5
18:1	37,8	38,4	39,6	38,7	35,8	38,1	44,7	42,8	44,7	31,0	41,0	40,8
18:2	8,8	11,5	10,4	10,3	8,9	9,9	8,1	6,4	7,9	6,5	6,4	7,1
20:4	7,2	9,9	8,4	8,3	8,1	8,4	3,7	3,0	5,8	4,8	5,8	4,6

Tabelle 3. Zusammensetzung der Leberfettsäuren nach vierwöchiger Fütterung mit und ohne Tocopherol (% Methyl ester)

Fettsäuren	Tiere ohne Vitamin E						Tiere mit Vitamin E					
	a	b	c	d	e	Mittel	f	g	h	i	k	Mittel
16:0	24,6	21,2	21,8	27,1	25,2	24,0	20,9	19,1	24,1	25,2	22,5	22,4
18:0	29,5	32,2	26,2	26,8	25,9	28,1	26,3	27,6	25,2	24,5	27,1	26,1
18:1	13,4	14,1	15,9	14,9	15,5	14,8	14,4	15,8	19,6	16,3	13,7	16,0
18:2	20,0	17,3	22,1	21,2	20,4	20,2	23,7	22,9	19,2	23,2	24,2	22,6
20:4	12,5	15,2	14,0	10,0	13,0	12,9	14,7	14,6	11,9	10,8	12,5	12,9

Tabelle 4. Spezifische Aktivitäten der Gesamtfettsäuren und der Arachidonsäure aus der Leber während 4 Wochen mit und ohne Vitamin E ernährter Ratten

Tiere ohne E	c/min · mg			Tiere mit E	c/min · mg		
	Gesamt-Fettsäure	Arachidonsäure	Akt.-Anteil Arachid. x		Gesamt-Fettsäure	Arachidonsäure	Akt.-Anteil Arachid. x
a	1461	2225	18,9	f	1768	1805	14,4
b	1850	2198	18,0	g	918	975	15,5
c	1298	2950	27,1	h	1646	1228	8,9
d	1590	2865	18,6	i	936	1278	14,8
e	1412	2661	23,7	k	1625	1703	13,1
Mittel	1522	2580	26,3	Mittel	1380	1400	13,3

$$x = \frac{\% \text{ Arachidonsäure} \cdot \text{spezifische Aktivität der Arachidonsäure}}{\text{spezifische Aktivität der Gesamtfettsäuren}}$$

Wachsende, weibliche Ratten erhielten bis zum Auftreten der Mangelsymptome ein an Polyenfettsäuren reiches bzw. armes, aber praktisch Vitamin-E-freies Futter. Gruppen dieser Tiere wurden entweder als Kontrollen in gleicher Weise weitergefüttert oder mit Vitamin E versehen. Bei einem Teil der Ratten wurde die anfängliche Fettquelle Sonnenblumenöl bzw. Schweinefett auf Schweinefett bzw. Sonnenblumenöl umgestellt. Nach 40 Tagen wurden aus der Leber und aus Proben des Depotfettes die Fettsäuren gewonnen und gas-chromatographisch analysiert. Die Resultate für die Leberfettsäuren sind in Tabelle 1 dargestellt. Auf die Zusammensetzung der Depotfettsäuren werden wir später zurückkommen.

Männlichen Ratten mittleren Gewichtes wurde die erwähnte Schweinefett-Diät mit und ohne Vitamin-E-Zusätzen während 60 Tagen verabreicht. Die Zusammensetzung der Gesamfettsäuren aus den Lebern der Tiere geht aus der Tabelle 2 hervor.

Weiterhin haben wir 10 wachsende weibliche Ratten mit oder ohne Vitamin E 28 Tage mit Polyenfettsäure-reicher Nahrung gefüttert. Wir injizierten den Tieren sodann  $^{14}\text{C}$ -Acetat und töteten sie nach 2 Stunden. Es wurde die Zusammensetzung und spezifische Aktivität der Leberfettsäuren ermittelt und im Gas-Chromatographen die Arachidonsäure abgetrennt und gemessen. Ergebnisse s. Tabellen 3 und 4.

**Experimentelles.** – *Fütterung.* Die Vitamin-E-Mangeldiät setzte sich wie früher aus extrahiertem Casein, Rohrzucker, Trockenhefe und Salzgemisch zusammen<sup>9</sup>). Sie enthielt 10% (g/g) Schweineschmalz bzw. ein umgeestertes Sonnenblumenöl. Letzteres wurde mit Methanol und Natriummethylat erwärmt und das Methylestergemisch im Vakuum destilliert. Nach Umesterung mit Triacetin ergab sich ein nur sehr geringe E-Mengen aufweisendes Öl. Dieses Futter ergänzten wir durch je 0,1 ml einer öligen Lösung von  $\beta$ -Carotin und Vigantol pro Woche und Tier.

Je 20 weibliche Ratten im Gewichte von 60–70 g erhielten eine dieser Mangeldiäten. Nach 120 Tagen bildeten wir Gruppen von je 5 Tieren, wobei 5 als Kontrollen in gleicher Weise weitergefüttert ( $A_1$  und  $B_1$ ) und andere 5 zusätzlich Vitamin E erhielten ( $A_2$  und  $B_2$ ).  $\alpha$ -Tocopherol (3 mg pro Woche und Tier) wurde mit der Fütterungspipette in ölgiger Lösung verabfolgt. Ferner bekamen 5 Ratten aus der Sonnenblumenöl-Gruppe die Schweinefett-Diät ( $C_1$  und  $C_2$ ) und 5 Tiere aus der Schweinefett-Gruppe Sonnenblumenöl-Diät ( $D_1$  und  $D_2$ ).

Nach Beendigung des Versuches gewannen wir durch Verseifung aus den Lebern die Gesamfettsäuren, welche im Mittel auf das Frischgewicht bezogen folgende Anteile ausmachten:

Gruppen: ohne Vitamin E	$A_1$	$B_1$	$C_1$	$D_1$	mit Vitamin E	$A_2$	$B_2$	$C_2$	$D_2$
% Fettsäuren	2,44	2,42	2,32	1,84		2,01	1,70	2,08	2,50

Zur Veresterung erwärmten wir die freien Fettsäuren mit einer 12,5-proz. Lösung von Bortrifluorid in Methanol auf dem Wasserbad zum Sieden. Die Methylester wurden mit einem Gas-Chromatographen von PYE analysiert. Die Angaben beziehen sich auf Prozente Methylester der entsprechenden Säuren.

Je 5 männliche Ratten im Gewichte von 135–145 g erhielten während 60 Tagen eine 10% Schweinefett enthaltende Vitamin-E-freie oder eine durch 3 mg Tocopherol pro Tier und Woche ergänzte Nahrung. Die Aufarbeitung der im Mittel 290–293 g schweren Tiere vollzog sich wie oben angegeben.

Für den Acetatversuch verwendeten wir die Sonnenblumenöl-Diät und je 5 weibliche Ratten (170–200 g schwer), die 3 Wochen mit bzw. ohne Tocopherol (3 mg pro Woche und Tier) ernährt wurden. Jedes Tier erhielt intraperitoneal 0,5 ml einer Na-Acetatlösung, enthaltend in 8,0 ml  $\text{H}_2\text{O}$  18 mg Na-Acetat mit einer spezifischen Aktivität von  $9,4 \cdot 10^7$  c/min. Die Aktivitätsbestimmungen der Leberfettsäuren (201, 219, 229, 224, 241 mg bei den Tieren *a–e*, 217, 204, 201, 281, 210 bei den Tieren *f–h*) erfolgten mit dem *Tricarb*-Flüssigkeits-Scintillations-Spektrophotometer, die Fettsäureanalysen mit einem Gas-Chromatographen von BECKMAN, welcher das Auffangen einzelner Fraktionen zur späteren Aktivitätsmessung erlaubt.

**Diskussion der Ergebnisse.** - Wir ernährten weibliche Ratten längere Zeit Vitamin-E-arm, wobei das Futter als Fettquelle Schweinefett oder umgeestertes Sonnenblumenöl enthielt, um höhere bzw. niedrigere Gehalte der Leber- und Depotfette an Polyenfettsäuren zu erzielen. Ein Teil der Tiere erhielt anschliessend während 40 Tagen  $\alpha$ -Tocopherol. Nach dieser Zeit wiesen die Leberfettsäuren (vgl. Tab. 5) nach Ölgaben 18,5 bzw. 12,9% Arachidonsäure auf ( $P < 0,01$ ). Bei der Schweinefett-haltigen Diät fand man ohne bzw. mit Vitamin E Werte von 7,7 bzw. 9,8%. In Abhängigkeit von der Fettquelle betrugen die Linolsäuregehalte nach Sonnenblumenöl 19,0 bzw. 21,2%, nach Schweinefett nur 4,6 bzw. 5,3%. Der Wechsel von der Öldiät zur Fettdiät (Gruppe  $C_1$  und  $C_2$ ) reduzierte die Linolsäure stark, d. h. auf 5,9 und 8,3%, bei nicht signifikant unterschiedlichen Arachidonsäuregehalten von 8,7 und 10,7%. Öldiät nach Fettdiät ergab hohe Werte für die Linolsäure von 20,4 bzw. 17,4% bei signifikant verschiedenen Arachidonsäuregehalten von 16,1 bzw. 11,8% ( $P < 0,01$ ).

Tabelle 5

Prozentuale Zusammensetzung der Leberfettsäuren, Mittelwert von je 5 Tieren (% Methyl ester)

Fett-säuren	Vit. E	$A_1$ Öl	$B_1$ Fett	$C_1$ Öl+ Fett	$D_1$ Fett + Öl	Vit. E	$A_2$ Öl	$B_2$ Fett	$C_2$ Öl+ Fett	$D_2$ Fett + Öl
14:0	ohne	0,9	0,8	0,6	0,8	mit	1,2	1,1	0,7	1,0
14:1		0,4	0,3	0,3	0,5		0,5	0,6	0,4	0,4
16:0		19,4	25,0	26,2	20,5		24,2	25,5	24,0	25,1
16:1		2,9	3,6	3,0	2,8		3,5	5,8	3,6	3,4
18:0		24,3	26,8	25,8	22,2		20,2	21,2	24,6	22,7
18:1		14,8	31,4	29,6	16,8		16,5	30,8	27,7	18,3
18:2		19,0	4,6	5,9	20,4		21,2	5,3	8,3	17,4
20:4		18,5	7,7	8,7	16,1		12,9	9,8	10,7	11,8

Diese Verminderung des Arachidonsäure-Gehaltes trat indessen auch bei geringen Linolsäurewerten, aber längerer Versuchsdauer ein, d. h. bei männlichen Ratten, die während 60 Tagen Tocopherol erhielten. Wir fanden bei Polyenfettsäure-armem Futter (vgl. Tab. 2) 4,6% Arachidonsäure gegenüber 8,4% bei den Mangeltieren ( $P < 0,001$ ).

Die Gesamtfettsäuren aus den Lebern von Vitamin-E-Mangelratten enthielten also mehr Arachidonsäure als solche aus den Lebern von mit E versorgten Kontrolltieren. Will man nicht annehmen, der Bedarf der Zelle an Arachidonsäure werde durch  $\alpha$ -Tocopherol gesteigert und ihr Abbau demzufolge beschleunigt, so bleibt als plausible Erklärung unserer Befunde die Vorstellung, die Kettenverlängerung der Linolsäure werde als Sauerstoff-abhängige Reaktion durch die antioxydativen Eigenschaften des Tocopherols gehemmt. In diesem Falle müsste die Aktivität der Arachidonsäure nach  $^{14}C$ -Acetatgaben bei den Mangeltieren höher ausfallen. Das Auftreten von Mangelsymptomen bräuchte dabei nicht abgewartet zu werden, und unsere Versuche an Tieren, die nur 4 Wochen mit bzw. ohne E ernährt wurden, liessen in der Tat signifikante Aktivitätsunterschiede erkennen (Tab. 4) trotz annähernd gleicher prozentualer Linol- und Arachidonsäuregehalte.

Wir konnten also bei den E-Mangel-Tieren keine Abnahme der Leberlipide an Polyenfettsäuren feststellen. Der beobachtete Effekt des Tocopherols auf den

Arachidonsäure-Gehalt der Rattenleber kann durch die antioxydativen Eigenschaften des Vitamins E bedingt sein und vielleicht auch nach Gaben anderer Antioxydantien auftreten, was wir zu prüfen gedenken.

Ferner besteht die Möglichkeit, dass nicht nur die von MEAD & HOWTON<sup>6)</sup> erstmalig gezeigte Bildung der Arachidonsäure aus Linolsäure, sondern auch die von KLENK *et al.*<sup>7)</sup> bewiesenen Kettenverlängerungen anderer Polyenfettsäuren durch Vitamin E beeinflusst werden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Mitteln des SCHWEIZ. NATIONALFONDS durchgeführt.

#### SUMMARY

The liver lipids of rats on a vitamin E-free diet showed much higher contents of arachidonic acid than control animals receiving  $\alpha$ -Tocopherol.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel

<sup>6)</sup> J. F. MEAD & D. R. HOWTON, *J. biol. Chemistry* **229**, 575 (1957).

<sup>7)</sup> E. KLENK, K. OETTE, J. KOHLER & H. SCHÖLL, *Z. physiol. Chem.* **323**, 270 (1961).

## 195. Neuere Untersuchungen zur präparativen Dünnschichtchromatographie

von C. G. HONEGGER

(22. VI. 63)

Über die Beeinflussung des Rf-Wertes einer Substanz in der Dünnschichtchromatographie bei erhöhter Schichtdicke (über 0,25 mm) liegen nur vereinzelte Untersuchungen vor. Wie bei normaler Schichtdicke<sup>1)</sup>, beeinflussen auch hier zahlreiche Faktoren den Sättigungsgrad der Atmosphäre in der Trennkammer, Aktivitätsgrad der Adsorptionsschicht und Temperatur die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten. Bei früheren Versuchen<sup>2)</sup> an dicken Adsorptionsschichten wurde eine verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit einer Substanz an der Oberfläche der Adsorptionsschicht gegenüber tieferliegenden Schichten beobachtet; in Anbetracht der Verwendbarkeit dickerer Adsorptionsschichten zur präparativen Dünnschichtchromatographie ist die nähere Kenntnis der dafür verantwortlichen Faktoren bedeutungsvoll.

Eine Abhängigkeit der Rf-Werte (von Indophenol, Sudanrot G und Buttergelb) im Sinne einer Zunahme mit der Schichtdicke wurde kürzlich von PATAKI & KELLER<sup>4)</sup> bei Kammersättigung (Laufmittel<sup>5)</sup>) auf luftgetrockneten Kieselgel-G-Schichten (0,25–1 mm) beschrieben. Wir bestimmten die Rf-Werte auf Schichtdicken von 0,2–3 mm in vier Kammersystemen: Normaler Sättigungsgrad (KN),

<sup>1)</sup> M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI & A. R. FAHMY, *Experientia* **18**, 101 (1962).

<sup>2)</sup> C. G. HONEGGER, *Helv.* **46**, 1730 (1963).

<sup>3)</sup> C. G. HONEGGER, *Helv.* **45**, 1409 (1962).

<sup>4)</sup> G. PATAKI & M. KELLER, *Helv.* **46**, 1054 (1963).

<sup>5)</sup> Im Laufmittel Benzol (G. PATAKI, persönliche Mitteilung).