

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Institutes der Universität,
Charité, Berlin.)

Über die neue Fettsäuren-Bestimmungsmethode nach W. R. Bloor¹ und über die Jodzahlbestimmung von Organfetten.

Von
Ernst Mislowitz.

(Eingegangen am 31. September 1929.)

A. Die Bestimmung der Fettsäuren von Plasma bzw. Serum.

Bei Untersuchungen über die Veränderungen des Fettgehaltes des Plasmas bzw. Serums benutzte ich die neue *Bloorsche* Modifikation der *Bangschen* Methode. Im Gegensatz zu den vielen Mißerfolgen der ursprünglichen *Bangschen* Methodik erhält man mit der *Bloorsche* Modifikation zufriedenstellende Resultate.

Die Methodik war folgende:

Extraktion der Fette und gleichzeitige Enteiweißung.

3 ccm Serum wurden unter dauernder Bewegung in etwa 40 ccm einer Alkohol-Äther-Mischung (3 Teile 95proz. Alkohol und 1 Teil Äther) getropft, die sich in einem Meßkolben von 50 ccm befand. Das Kölbchen wurde dann unter fortwährendem Schaukeln in siedendes Wasser getaucht, bis die Flüssigkeit gerade einige Sekunden kochte, dann wurde abgekühlt, auf 50 ccm mit der Alkoholmischung aufgefüllt und durch ein trockenes fettfreies Filter filtriert.

Verseifung der Fette.

20 ccm des Filtrates wurden in einem Erlenmeyer-Kolben (100 ccm) mit 2 ccm etwa $\frac{1}{10}$ -Natriumäthylatlösung auf einem Wasserbad bis zum Verschwinden des Alkoholgeruches erhitzt. (Die letzten Alkoholspuren werden durch Luftstrom beseitigt.)

Extraktion der Fette.

Der Rückstand im Kölbchen wurde mit 1 ccm verdünnter H_2SO_4 (1 Teil konzentrierte Säure und 3 Teile Wasser) angesäuert. Dann wurde 1 Minute

¹ W. R. Bloor, B. C. 77, 53 (1928) — Praktikum der Physiologischen Chemie von P. Rona 2. J. Springer, Berlin 1929.

auf dem Wasserbad erhitzt, 10 ccm Petroläther zugesetzt und unter Umschwenken 2—3 Minuten im Sieden gehalten, dann wurde der Petroläther in ein Meßkölbchen von 25 ccm abgegossen und die Erwärmung und Extraktion wiederholt, bis das Kölbchen fast voll war, der Petroläther auf Zimmertemperatur abgekühlt und bis zur Marke aufgefüllt.

Oxydation der Fette.

10 ccm der Petrolätherlösung wurden in einem vorher nach Vorschrift behandelten Erlenmeyer-Kolben verdampft und die letzten Spuren des Petroläthers durch Luft abgeblasen. Zu dem zurückbleibenden Fett wurden 5 ccm des vorgeschriebenen Nielouxschen Silberreagens gegeben und 3 ccm $\frac{n}{1}$ -Bichromatlösung unter Umschwenken. Die Flaschen wurden lose verstopft, für 5 Minuten in den elektrischen Trockenschrank, der genau 124° hatte, gesetzt, dann herausgenommen, umgeschwenkt, die Stopfen fest eingesetzt und noch einmal für 10 bis 15 Minuten in den Trockenschrank gestellt. Sofort nach der Entfernung aus dem Ofen wurden 75 ccm H_2O hinzugefügt und dann abgekühlt. (Bei jeder Oxydation muß eine Leerbestimmung mit denselben Reagenzien angesetzt werden).

Titration.

Der Überschuß des Bichromats wurde nach der Abkühlung zurücktitriert. Unmittelbar vor der Titration wurden 10 ccm 10proz. KJ-Lösung zugefügt und zuerst ohne Umschwenken $\frac{n}{10}$ - $Na_2S_2O_3$ -Lösung zugetropft. Wenn ein Teil des Jods gebunden war, schwenkte man zuerst vorsichtig, dann kräftig um und titrierte bis kein freies Jod mehr von Stärke angezeigt wurde.

Die weiteren Einzelheiten der Methodik s. in dem Praktikum von P. Rona l. c.

Berechnung. Der Titrationsunterschied zwischen Leerbestimmung und Fettbestimmung gibt die Menge $\frac{n}{10}$ -Bichromatlösung an, die von den Gesamtfettsäuren (+ Cholest.) verbraucht wurden. Als Reduktionskoeffizient (d. h. die ccm 0,1 Chromatlösung, die von 1 mg der Substanz reduziert werden) wurde 3,61 angewandt (als Faktor für Oleinsäure).

Die Bestimmungen von reiner Palmitinsäure sind in der Tab. 1 wieder gegeben.

Tabelle 1. *Fettbestimmungen mit Palmitinsäure.*

In Arbeit genommen	Gefunden	Fehler in %	In Arbeit genommen	Gefunden	Fehler in %
1 mg	0,97	3,0	2 mg	1,90	5,0
	1,02	2,0	3 mg	3,10	3,3
	1,00	0,0		3,08	2,7
	0,95	5,0		3,10	3,3
2 mg	1,90	5,0		3,12	4,0
	2,00	0,0	4 mg	3,88	3,0
	1,99	0,5		4,21	5,2
	1,99	0,5			

Bestimmte Störungen mit den ersten Plasmauntersuchungen wiesen auf einen durch Na-Fluorid-Zusatz verursachten Fehler hin. Nach dem Ausfall der in Tab. 2 wiedergegebenen Kontrolluntersuchungen von Palmitinsäure unter Zusatz von NaF wurden die weiteren Untersuchungen nur noch am Serum angestellt.

Tabelle 2. *Fettbestimmungen in Palmitinsäure mit NaF-Zusatz.*

Angewandt wurde von der 1:4 verdünnten gesättigten NaF-Lösung 0,1 ccm.

In Arbeit genommen	Gefunden	Fehler in %	In Arbeit genommen	Gefunden	Fehler in %
1 mg	0,91	9	2 mg	1,19	41
	0,94	6			
2 mg	1,14	43	3 mg	1,75	40
				1,72	43

Die Tab. 3 gibt die Serumfettwerte von 4 normalen Kaninchen wieder. Die jeweiligen Kontrollen stimmen zufriedenstellend überein, wie auch aus der Tab. 3a hervorgeht.

Tabelle 3. *Fettbestimmungen im Serum.*

A. Fettbestimmungen bei Normaltieren.

Tier	Titrationwerte	Leerwert	Differenz	mg Fett	mg Fett in 1 ccm Serum
1	32,8		3,2	0,89	1,85
	32,6	36,0	3,4	0,94	1,95
2	28,5		7,6	2,11	4,36
	28,8	36,1	7,3	2,02	4,20
3	30,7		5,4	1,50	3,12
	30,9	36,1	5,2	1,44	3,00
4	32,7		3,6	1,00	2,08
	33,0	36,3	3,3	0,91	1,89

Tabelle 3a. *Fettbestimmungen im Serum.*

A. Bei Normaltieren.

Tier	Mittelwert	Abweichung in % gegenüber d. Mittelwert (höchster Wert)	Tier	Mittelwert	Abweichung in % gegenüber d. Mittelwert (höchster Wert)
1	1,90	2,5	3	3,06	2,0
2	4,28	1,8	4	1,99	4,6

Untersuchungen an 9 weiteren Tieren nach einer längeren oder kürzeren Hungerperiode sind in der Tab. 4 wiedergegeben. Auch hier zeigen die jeweiligen Kontrollen untereinander gute Übereinstimmung (s. auch hierzu Tab. 4a).

Tabelle 4. *Fettbestimmungen im Serum.*
B. Fettbestimmungen bei Hungertieren.

Tier	Titrationwert	Leerwert	Differenz	mg Fett	mg Fett in 1 cem
1	33,8		2,10	0,58	1,20
	33,9	35,9	2,00	0,55	1,14
2	28,0		9,80	2,71	5,64
	28,1	37,8	9,70	2,69	5,60
3	30,6		5,10	1,41	2,93
	30,4	35,7	5,30	1,47	3,06
4	34,4		1,90	0,53	1,10
	34,2	36,3	2,10	0,58	1,20
5	32,7		4,20	1,16	2,41
	32,4	36,9	4,50	1,25	2,60
6	29,3		7,50	2,08	4,33
	29,4	36,8	7,40	2,05	4,27
7	33,5		2,50	0,69	1,43
	33,5	36,0	2,50	0,69	1,43
8	30,7		5,60	1,55	3,23
	30,9	36,3	5,40	1,50	3,13
9	32,1		4,30	1,19	2,48
	32,4	36,4	4,00	1,11	2,31

Tabelle 4a. *Fettbestimmungen im Serum.*
B. Bei Hungertieren.

Tier	Mittelwert	Abweichung in % gegenüber d. Mittel- wert (höchster Wert)	Tier	Mittelwert	Abweichung in % gegenüber d. Mittel- wert (höchster Wert)
1	1,17	2,8	6	4,30	0,7
2	5,62	0,4	7	1,43	0,0
3	2,99	2,1	8	3,18	1,6
4	1,15	4,3	9	2,39	3,5
5	2,51	3,7			

Zusammenfassung.

1. Die *Bloorsche* Modifikation der *Bangschen* Bestimmungsmethode der Fettsäuren im Serum gibt anscheinend sehr zufriedenstellende Resultate.

2. Der Zusatz von 1 mg NaF stört die Analyse der Fettsäuren, so daß von einer Bestimmung im Plasma abgesehen wurde.

B. Die Jodzahlbestimmung von Organfetten.

Im Verlaufe einer Versuchsreihe über die Beziehungen zwischen den Kohlehydraten und den Fetten in der Leber wurden Analysen der Fettsäuremengen im autolisierenden Leberbrei und Jodzahlbestimmungen dieser Fettsäuren angestellt.

Zur Feststellung der Jodzahlen ist die Isolierung der Fettsäuren erforderlich. Bei der Abtrennung der Fettsäuren von dem Unverseifbaren (Cholesterin) wurde beobachtet, daß die in der Methode von *Kumagawa-Suto*¹ angegebene zweimalige Extraktion mit Petroläther nicht genügt. Erst nach 4—5maliger Extraktion stimmten die Gewichtsmengen der Fettsäuren mit den Titrationswerten gut überein.

Methodik.

A. Behandlung der Lebersuspension.

Die Lebersuspension wurde zum Abtöten des Fermentes in dem Kölbchen, in dem die Autolyse vor sich gegangen war, aufgeköcht, in ein Becherglas gegossen und im Wassermanteltrockenschrank eingedampft, bis keine Flüssigkeit mehr über den Leberteilchen stand.

B. Hydrolyse.

Das Kölbchen, in dem der Brei zur Autolyse kam, wurde mit 25 ccm $\frac{5}{n}$ -NaOH nachgespült und die Lauge zu der fast trockenen Leber gegeben; dann wurde das Becherglas 3 Stunden zur Hydrolyse der Leber in ein siedendes Wasserbad gestellt.

C. Extraktion von Fettsäuren und Unverseifbarem.

Die heiße Lösung wurde sofort in einen Scheidetrichter gegossen; es wurde 3mal mit heißem Wasser nachgespült, abgekühlt auf etwa 50°, 20 ccm 20 proz. Salzsäure zugesetzt, dann unter Leitungswasser gekühlt, und noch einmal 10 ccm Säure zugesetzt. Nach guter Kühlung 70 ccm Äther hinzugefügt und etwa 5 Minuten ausgeschüttelt. Ablassen der wässerigen Schicht. Der Äther wurde in ein Becherglas gegeben, der Niederschlag im Trichter 2mal mit Äther ausgewaschen, der Äther zu der 1. Portion hinzugegeben. Der Niederschlag wurde in 5 ccm NaOH gelöst, die Lösung mit etwa 30 ccm Äther geschüttelt (der Äther wird jetzt noch nicht entfernt), dann wurde die vorher abgelassene saure wässrige Lösung hinzugegeben, wieder geschüttelt, die wässrige Lösung abgelassen, der Äther mit der übrigen Portion vereint. Die Äthermenge wurde abgedunstet, der Rückstand in etwa 10 ccm Äther aufgenommen, durch Asbest filtriert und wieder verdunstet.

D. Trennung der Fettsäuren von dem Unverseifbaren.

Der braune Rückstand aus dem Ätherextrakt wurde 2 Stunden bei 50° im Trockenschrank gehalten und dann noch warm mit etwa 10 ccm Petroläther versetzt, 1 Stunde stehen gelassen, durch Asbest filtriert, mit wenig Petroläther nachgespült. Die Petrolätherlösung im Scheidetrichter mit 150 ccm absoluter alkoholischer KOH geschüttelt, dann mit 150 ccm H₂O versetzt, wieder geschüttelt, die alkoholische Lösung in eine Schale gelassen, den Petroläther, der das Cholesterin enthält, fortgegossen und die alkoholische Lösung noch 3—4mal mit etwa 30 ccm Petroläther geschüttelt². Danach wurde die Lösung mit HCl neutralisiert und auf dem Wasserbad eingedampft, bis sie keinen Alkohol mehr enthielt, abgekühlt, angesäuert und im Scheidetrichter 3mal mit etwa je 20 ccm Petroläther ausgeschüttelt. Der vereinigte Petroläther wurde in gewogenen Bechergläsern verjagt, die restierenden Fettsäuren einige Stunden bei 50° getrocknet, im Exsiccator abgekühlt und gewogen.

¹ Praktikum der Physiologischen Chemie von P. Rona. 3. Teil. Stoffwechsel und Energiwechsel. Berlin: J. Springer 1928.

² Die hier im Druck hervorgehobene Stelle entspricht der gegenüber der Kumagawa-Suto-Methode durchgeführten Veränderung.

E. Titration der Fettsäuren zur Kontrolle der Gewichtsmengen.

Die Fettsäuren wurden in 15 ccm absolutem Alkohol gelöst und mit $\frac{n}{10}$ alk. KOH gegen Phenolphthalein bis zu der ersten erkennbaren Rötung titriert.

Molekular- gewichte	{	Oleinsäure	282,27
		Palmitinsäure	256,26
		Stearinsäure	284,29
		Sa.	822,82
		Mittelwert	274,27

1 ccm $\frac{n}{10}$ KOH = 27,43 mg Fettsäure.

(Der Umrechnungsfaktor war 27,4, als Mittelwert zwischen Palmitin-, Olein- und Stearinsäure.)

F. Erneute Isolierung der Fettsäuren zur Jodzahlbestimmung.

Die alkoholische Lösung wurde mit ungefähr der gleichen Menge Wasser versetzt, auf dem Wasserbad eingedampft, bis aller Alkohol verjagt war, dann abgekühlt, angesäuert, wiederholt mit Petroläther ausgeschüttelt, der vereinigte Petroläther in gewogenen Bechergläsern verjagt, im Trockenschrank bei 50° getrocknet, im Exsiccator abgekühlt, gewogen.

G. Jodzahlbestimmung.

Die Fettsäuren mit 15 ccm Chloroform in Erlenmeyer-Kolben mit eingeschliffenem Stopfen gespült und mit 10 ccm 1:10 verdünnter vorgeschriebener Jodlösung versetzt. Wurde die Lösung hellgelb, so wurden noch einmal 10 ccm Jodlösung zugefügt usf. Nach 6stündigem Stehen 20 ccm 10proz. KJ-Lösung zugesetzt, umgeschüttelt, 150 ccm H_2O dazugegeben und mit $\frac{n}{100}$ $Na_2S_2O_3$ -Lösung bis farblos gegen Stärke titriert.

Die unvollständige Abtrennung des Unverseifbaren ging zunächst aus den schwankenden Jodzahlwerten hervor (s. Versuch 1 und 2).

Versuch 1. Leber bei 6 verschiedenen p_H s im Brutschrank 2 Tage autolytisiert.

Abnahmen		Gef. Gewichtsmengen in g	Jodbindungsvermögen in mg Jod	Jodzahl ¹
Abnahme nach 2 Tagen	Anfangswert	0,1378	75,97	55,1
	$p_H = 4,12$	0,1281	75,47	58,9
	$p_H = 4,81$	0,1366	76,73	56,1
	$p_H = 5,51$	0,1514	76,86	50,7
	$p_H = 6,33$	0,2319	76,34	32,9
	$p_H = 7,29$	0,1405	64,26	45,7
	$p_H = 7,74$	0,1523	67,53	44,3

Versuch 2. Leber bei 6 verschiedenen p_H s 2 Tage im Brutschrank autolytisiert.

Abnahmen	Gef. Gewichtsmengen in g	Jodbindungsvermögen in mg Jod	Jodzahl ¹
Anfangswert	0,1010	55,31	54,8
$p_H = 4,12$	0,1057	56,19	53,2
$p_H = 4,81$	0,1038	53,29	51,3
$p_H = 5,51$	0,1094	55,81	51,0
$p_H = 6,33$	0,1562	57,33	36,7
$p_H = 7,29$	0,1182	54,68	46,3
$p_H = 7,74$	0,1028	49,77	42,1

¹ Jodzahl = Gramm Jod, die von 100 g Fettsäure aufgenommen werden.

Nach Einfügung der 4—5maligen Petrolätherextraktion wurden die Werte für die Jodzahlen im Verlauf der Autolyse konstant (s. Versuch 3 und 5).

Versuch 3. Versuch bei $p_H = 6,33$ mit 2 Abnahmen (nach 2 und 5 Tagen). Die gewogenen Fettmengen durch Titration kontrolliert.

Abnahmen	Gef. Gewichtsmengen in g	Titrl. Fettmenge in g	Fettmenge in g, die zur Best. kam	Jodbindungsvermögen in mg Jod	Jodzahl ¹
Anfangswert	0,1012	0,1003	0,0858	28,22	32,9
I. Abnahme	0,0942	0,09097	0,0806	25,75	32,0
II. Abnahme	0,0858	0,08384	0,0818	23,18	28,3

Versuch 5. Leber bei 6 verschiedenen p_H s im Brutschrank 2 Tage autolysiert. Gewogene Fettmengen durch Titration kontrolliert.

Abnahmen	Gef. Gewichtsmenge in g	Titrl. Fettmenge in g	Fettmenge in g, die zur Jodzahlbest. kam	Jodbindungsvermögen in mg Jod	Jodzahl ¹
Anfangswert	0,1089	0,1101	0,1075	43,09	40,1
Abnahme nach 2 Tagen	$p_H = 4,12$	0,1064	0,1063	40,45	40,0
	$p_H = 4,81$	0,1050	0,1063	41,08	41,5
	$p_H = 5,51$	0,0962	0,0937	37,04	40,2
	$p_H = 6,33$	0,0956	0,0937	37,17	40,5
	$p_H = 7,29$	0,1013	0,1003	41,20	42,0
	$p_H = 7,74$	0,1019	0,1002	41,33	41,9

Bei diesen letzten Versuchen wurde zum Zwecke der Kontrolle der Reinheit der Fettsäuren vor Anstellung der Jodzahlbestimmungen der Titrationswert der Fettsäuren mit den Gewichtsmengen verglichen. Die gute Übereinstimmung zeigte die jetzt erhaltene Reinheit der Fettsäuren.

Zusammenfassung.

1. Die Abtrennung des Unverseifbaren von den nach der *Kumagawa-Suto*-Methode aus der Leber gewonnenen Fettsäuren gelingt nur nach mehrmaliger (4—5) Extraktion mit Petroläther vollständig.

2. Für die Bestimmung der Jodzahl von Fettsäuren aus Organen erscheint eine Kontrolle der Reinheit der gewogenen Fettsäuren durch Titration zweckmäßig vielleicht sogar notwendig.

3. Während der Autolyse erfahren die Jodzahlen der Fettsäuren keine Veränderung. Die Doppelbindungen bleiben bestehen.

4. Wenn überhaupt, so findet im Verlaufe der Autolyse nur ein sehr geringer Fettsäurenabbau statt. Eine bakterielle Verunreinigung, die den geringen Abbau verursacht, ist trotz des angewandten Toluols nicht völlig ausgeschlossen.

¹ Jodzahl = Gramm Jod, die von 100 g Fettsäure aufgenommen werden.