

in einem Autoklaven unter 20—30 Atm. Druck mit Wasserstoff bei 135—140° geschüttelt. Nach Aufnahme der für 4 Mol berechneten Menge Wasserstoff blieb die Hydrierung stehen. Es wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet und man erhielt Hexahydro-diphenylessigsäure vom Smp. 150—151°. Der Mischschmelzpunkt mit der aus Diphenylessigsäure-äthylester gewonnenen Substanz zeigte keine Erniedrigung.

Die Analysen wurden unter der Leitung von Herrn Dr. *Gysel* in unserer analytischen Abteilung ausgeführt.

Wissenschaftliche Laboratorien der *Ciba* in Basel,
Pharmazeutische Abteilung.

58. Über den Einfluss von Lecithin und Vitamin E auf die enzymatische Oxydation des Carotins

von H. Süllmann.

(31. III. 41.)

Nach einigen vorangehenden Beobachtungen anderer Autoren¹⁾ wurde von *Sumner* und *Dounce*²⁾ über ein Enzym berichtet, das die Oxydation von Carotin unter Entstehung farbloser Spaltprodukte und die Oxydation von ungesättigten Fetten unter Bildung von Peroxyden katalysiert. Das als „Carotin-oxydase“ bezeichnete Enzym findet sich in der Sojabohne und anderen Leguminosen. In der Folge wurde aber sowohl von *H. Tauber*³⁾ als auch von *J. B.* und *R. J. Sumner*⁴⁾ gezeigt, dass die schnelle enzymatische Oxydation nur in Gegenwart von ungesättigtem Fett erfolgt, und dass der wahrscheinliche Mechanismus der Oxydation des Carotins auf der primären Bildung von Fettperoxyden beruht. Die Peroxydverbindungen für sich oxydieren Carotin nur sehr langsam.

Das System: „Carotin-oxydase“ – Sauerstoff – ungesättigte Fette – Carotinoide verdient unter verschiedenen Gesichtspunkten Interesse, vor allem im Hinblick auf die noch wenig geklärte Funktion und das Schicksal der Polyene im pflanzlichen und tierischen Organismus. Ferner könnte hier eine besondere Rolle der ungesättigten Fettsäuren zum Ausdruck kommen. Über einige Versuche mit diesem

¹⁾ *S. M. Hauge*, J. Biol. Chem. **108**, 331 (1935); *C. N. Frey*, *A. L. Schultz* und *R. F. Light*, Ind. Eng. Chem. **28**, 1254 (1936).

²⁾ *J. B. Sumner* und *A. L. Dounce*, Enzymol. **7**, 130 (1939).

³⁾ *H. Tauber*, Am. Soc. **67**, 2251 (1940).

⁴⁾ *J. B. Sumner* und *R. J. Sumner*, J. Biol. Chem. **134**, 531 (1940).

Enzym, das wahrscheinlich besser als „Lipoxydase“¹⁾ zu bezeichnen ist, wird im folgenden berichtet.

Die aus dem entfetteten Mehl der Sojabohne erhaltenen Enzymlösungen liessen sich 24 Stunden dialysieren, ohne deutlichen Verlust an Aktivität. Im Verlaufe der Dialyse entsteht ein weisser Niederschlag, von dem abgetrennt wurde. Die so erhaltene Enzymlösung ist fast klar und schwach gelblich gefärbt. Erhitzen zerstört ihre Wirksamkeit. Die Notwendigkeit eines ungesättigten Fettes oder einer ungesättigten Fettsäure für diese enzymatisch bedingte Oxydation von Carotin fanden wir bestätigt. Ausser Carotin, Xanthophyll und Bixin²⁾ wird auch Capsanthin oxydiert.

Eine Reihe von Verbindungen vermag in verhältnismässig geringen Mengen die Autoxydation von Fetten und anderen Stoffen zu hemmen. Diese Antioxydantien³⁾ haben auch im Zusammenhang mit Versuchen zur Steigerung der Haltbarkeit von Vitamin A in natürlichen Fetten und in Präparaten besonderes Interesse gefunden. Beispielsweise werden Zusätze von Lecithin, Hydrochinon und anderen phenolischen Verbindungen empfohlen⁴⁾. Nach *Karrer* und *Strauss*⁵⁾ hemmen Lecithin und Ascorbinsäure die Oxydation des Carotins am Licht.

In natürlichen Fetten finden sich häufig die Autoxydation hemmende Stoffe. Aus Weizenkeimöl konnten sie in der Fraktion des Unverseiften, die auch das Vitamin E enthält, angereichert erhalten werden⁶⁾. Nach einigen Angaben³⁾ soll Vitamin E selbst jedoch keine Wirksamkeit als Antioxydans haben. Indessen wurde von *Olcott* und *Emerson*⁷⁾ vor wenigen Jahren die hemmende Wirkung der Tocopherole auf die Autoxydation von Schweineschmalz nachgewiesen.

Wir prüften den Einfluss von Lecithin und Vitamin E, die zu den natürlich vorkommenden Antioxydantien gezählt werden können, auf die mit Hilfe des Enzyms aus der Sojabohne stattfindende Oxy-

¹⁾ Diese Bezeichnung wurde von *E. André* und *K. Hou* (C. r. **194**, 645 (1932)) vorgeschlagen für ein von ihnen in der Sojamilch nachgewiesenes Enzym, das ungesättigtes Fett der Sojabohne oxydiert. Vgl. ferner *André* und *Hou*, ebenda **195**, 172 (1932). — „Lipoxydasen“ und die durch sie bewirkte peroxyd-artige Anlagerung von Sauerstoff an ungesättigte Fette wurden ferner von *C. H. Lea* (J. Soc. chem. Ind. **56**, Trans. 376 (1937); Chem. and Ind. **58**, 479 (1939)) im Muskelfleisch von Hering und Schwein, sowie im Fettgewebe nachgewiesen. — „Carotin-oxydase“ und „Lipoxydase“ dürften identische oder doch sehr nahe verwandte Enzyme sein, jedenfalls soweit die Bildung von Fettperoxyden in Betracht kommt. Versuche über diese noch wenig charakterisierten Enzyme sollen später mitgeteilt werden.

²⁾ *J. B. Sumner* und *R. J. Sumner*, J. Biol. Chem. **134**, 531 (1940).

³⁾ Vgl. die Übersicht von *F. Wittka*, Ch. Z. **61**, 387 (1937).

⁴⁾ *H. N. Holmes*, *R. E. Corbet* und *E. R. Hartzler*, Ind. Eng. Chem. **28**, 133 (1936).

⁵⁾ *P. Karrer* und *W. Strauss*, Helv. **21**, 1624 (1938).

⁶⁾ *H. S. Olcott* und *H. A. Mattill*, Am. Soc. **58**, 1627 (1936).

⁷⁾ *H. S. Olcott* und *O. H. Emerson*, Am. Soc. **59**, 1008 (1937).

dation des Carotins. Dabei wurde die bis zur Ausbleiche des Carotins verstrichene Zeit bestimmt. Gelegentlich wurden Messungen mit dem Stufenphotometer durchgeführt.

Lecithin vermag bei Verwendung von Hanfsamen- oder Sojaöl die Carotinentfärbung stark zu hemmen. In diesem Falle kann die Oxydation des Carotins um mehr als das Hundertfache verzögert sein. Jedoch kommt es für die zahlenmässige Bewertung der Lecithinwirkung auf die Mengenverhältnisse der beteiligten Komponenten an; es sei hierzu auf den Versuchsteil verwiesen (vgl. Tabellen I und III).

Auffallend ist der Befund, dass *Lecithin* die Oxydation des Carotins nicht hemmt, wenn anstelle des Öls ungesättigte Fettsäuren („Leinölsäure“, Linolensäure) verwendet werden (Tabellen II und III). Unter den meisten Bedingungen, besonders bei geringen Fettsäuremengen, beschleunigt *Lecithin* sogar den Entfärbungsvorgang. Ob *Lecithin* in unserem Falle als Antioxydans der Oxydation des Carotins wirkt, hängt somit davon ab, ob ein ungesättigtes Öl oder eine ungesättigte Fettsäure den „Vermittler“ zwischen Enzym und Carotin spielt.

Dieses Verhältnis kommt auch zum Ausdruck, wenn ein Gemisch von Öl und Säure verwendet wird. Die mit Öl allein vorhandene *Lecithin*hemmung ist dann schwächer oder bei Vorhandensein genügender Mengen Fettsäuren sogar ganz aufgehoben (Tabelle IV).

Vitamin E (α -Tocopherol) hemmt die Entfärbung des Carotins ebenfalls bedeutend, und zwar sowohl in den Versuchen mit Öl als auch in denen mit einer der ungesättigten Fettsäuren (Tabelle V). α -Tocopherol-acetat ist hingegen unwirksam. Für die Wirksamkeit als Antioxydans ist also die freie OH-Gruppe des Tocopherols von Bedeutung¹⁾, für die Vitaminwirkung bekanntlich nicht.

Es war weiter der Einfluss des *Lecithins* auf die durch α -Tocopherol bewirkte Oxydationshemmung von Interesse, wenn ungesättigte Fettsäuren verwendet werden. In diesem Falle wird, wie erwähnt, die Oxydation des Carotins durch *Lecithin* nicht gehemmt. In Gegenwart von *Lecithin* und bei Verwendung einer ungesättigten Fettsäure wirkt Tocopherol deutlich weniger hemmend auf die Oxydation des Carotins als im Parallelversuch ohne *Lecithin* (Tabelle VI).

Ausser auf die — allerdings nicht sehr erhebliche — Beschleunigung der Oxydation des Carotins durch *Lecithin* in den Versuchen mit freien Fettsäuren, ist hier auch auf die Empfindlichkeit des Vitamin E gegenüber Oxydationsmitteln hinzuweisen²⁾. Wie bekannt, wird Vitamin E in ranzigem, peroxydhaltigem Fett zerstört. Da

¹⁾ H. S. Olcott und O. H. Emerson, Am. Soc. **59**, 1008 (1937).

²⁾ Vgl. die Übersicht: „Physiologie und Chemie der Vitamin E-Faktoren“ von W. John, Ergebn. Physiol. **42**, 2 (1939).

Lecithin die Carotinoxydation und somit auch die Bildung von Peroxyden der Fettsäuren nicht hemmt, sondern meist noch etwas fördert, kann in den obigen Versuchen mit Leinölsäure Gelegenheit zu einer vermehrten Zerstörung des Tocopherols durch die Fettsäuren bzw. deren Peroxyde gegeben sein.

Diese Ergebnisse sollen noch kurz unter folgenden Gesichtspunkten betrachtet werden. Sofern Bedingungen gegeben sind, unter denen Lecithin als Antioxydant zur Wirkung gelangt, können wesentliche quantitative Unterschiede in der enzymatischen Zerstörbarkeit des Carotins — und wahrscheinlich auch von Vitamin A — auftreten, je nachdem, ob Fettsäure-ester (untersucht wurden nur die beiden genannten natürlichen Öle) oder freie ungesättigte Fettsäuren vorliegen. In diesem letzten Falle wird der zur Oxydation des Carotins führende Vorgang durch Lecithin nicht gehemmt, und Lecithin mildert die hemmende Wirkung anderer Antioxydantien, wenigstens von Vitamin E. Es ergibt sich daraus ein Hinweis auf die Bedeutung des Auftretens freier ungesättigter Fettsäuren für diesen enzymatischen Carotinabbau. Die Wirkung der „Lipoxydasen“ auf Carotinoide könnte somit durch die von Lipasen eine Unterstützung erfahren.

Die Frage nach dem Angriffsort, überhaupt nach der Wirkungsweise der beiden Antioxydantien in dem untersuchten System muss noch offen gelassen werden. Es kann sowohl das Enzym, als auch das Fett (bzw. die Fettsäure) oder das Carotin durch das Antioxydant irgendwie „geschützt“ sein. Wenn, wie in den vorliegenden Versuchen, nur die Ausbleichung des Carotins beobachtet und eine Hemmung derselben festgestellt wird, lässt sich nicht sagen, ob die Hemmung bereits in der Reaktion des Enzyms mit Sauerstoff und dem ungesättigten Fett vorliegt, oder ob dieser Vorgang in normalem Ausmasse noch zustande kommt und lediglich die Oxydation des Carotins ausgeschaltet ist. Eine genauere Analyse der Vorgänge soll in einer späteren Arbeit unter gleichzeitiger Messung der Sauerstoff-Aufnahme erfolgen.

In noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen ergaben sich Anhaltspunkte dafür, dass die Rolle der ungesättigten Fettsäuren in dem vorliegenden System keine rein katalytische ist, insofern mit einer gegebenen (geringen) Menge Fettsäure und ausreichender Enzymmenge anscheinend nur ein begrenzter Carotinumsatz erzielt wird. Es lässt sich zunächst für dieses noch zu sichernde Ergebnis annehmen, dass die ungesättigten Fettsäuren selber im Verlaufe der Reaktion oxydiert werden. Unter dem Gesichtspunkt der Wirksamkeit von Antioxydantien von der Art des Lecithins ergibt sich dann, dass die Oxydation der freien ungesättigten Fettsäuren leichter erfolgen kann als der Abbau der Glyceride.

Versuche.

Die Versuchsanordnung entsprach im wesentlichen den Angaben von *Sumner* und *Sumner*¹⁾. Nachdem wir festgestellt hatten, dass sich die Enzymlösungen ohne deutlichen Verlust an Aktivität dialysieren und von dem ausgefallenen Niederschlag befreien lassen, wurde für alle Versuche dialysiertes Enzym verwendet.

Carotin (kryst. *Roche*) war in der Regel in Aceton-Alkohol (2:1), Hanfsamen-Sojabohnenöl (durch Extraktion mit Petroläther gewonnen), sowie Leinölsäure und Linolensäure (beide *Kahlbaum*) in Aceton, und Lecithin (aus Ei, *Kahlbaum*) in Alkohol gelöst. *d,l*- α -Tocopherol und *d,l*- α -Tocopherol-acetat (*Roche*) wurden in Aceton gelöst und sofort verwendet. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die organischen Lösungsmittel den Vorgang beeinflussen²⁾, wurde in einigen Versuchen Dioxan als Lösungsmittel verwendet, um wenigstens eine spezifische Wirkung des Aceton-Alkoholgemisches auszuschalten. Carotin zeigt in Dioxan gute Löslichkeit. Der Gehalt an organischen Lösungsmittel in der Versuchslösung betrug meistens etwa 5%.

In allen Versuchen wurde der von *Sumner* angegebene Phosphatpuffer, p_H etwa 6,5, verwendet. Die gesamte Wassermenge im Versuchsansatz betrug 105 cm³.

Die Versuche wurden in 300 cm³ fassenden *Erlenmeyer*-Kölbchen angesetzt. Die Kölbchen wurden anfangs häufig, bei langen Versuchszeiten gelegentlich mit Luft durchgeschüttelt.

Es wurde die vom Enzymzusatz an bis zur Ausbleiche verstreichende Zeit vermerkt. Die Messungen sind als halb-quantitative zu betrachten; insbesondere geben sie über den zeitlichen Verlauf des Oxydationsvorganges keine genaue Auskunft. Der Endpunkt war meistens gut zu erkennen. In einigen Versuchen, z. B. mit sehr geringen Fettsäuremengen, erfolgte eine teilweise, gut sichtbare Entfärbung zunächst verhältnismässig schnell, die völlige Entfärbung wurde dann aber sehr langsam bzw. in der Beobachtungszeit überhaupt nicht erreicht.

Um auftretende Unterschiede jederzeit gut erkennen zu können, wurden die Versuche, wie sie nachstehend jeweils in einer Tabelle aufgeführt sind, gleichzeitig in einer Reihe durchgeführt.

In den Tabellen werden nur einige Versuchsbeispiele zusammengefasst. Ein Strich (—) in der vorletzten Spalte bedeutet, dass im Verlaufe der Beobachtungszeit keine vollständige Entfärbung erfolgte. Die Beurteilung des Versuchs ist dann in der Spalte „Bemerkungen“ angeführt. Rot-gelb oder tiefgelb = keine sichtbare Ausbleichung; gelb = teilweise Ausbleichung; fahlgelb = nahezu ausgebleicht.

Die Ergebnisse gelten für die angegebenen Mengenverhältnisse und sonstigen Versuchsbedingungen. Soweit diese variiert wurden, ergaben sich keine grundsätzlichen Abweichungen von den schon besprochenen Resultaten.

Mit grösseren Mengen Lecithin ist die Hemmung noch stärker. Die Hemmung durch Lecithin lässt sich auch folgendermassen ausdrücken. In einem Ansatz mit 0,8 mg Carotin, 2,5 mg Hanfsamenöl und 1 mg Lecithin nahm die mit dem Stufenphotometer gemessene Extinktion nach 45 Minuten auf 80%, nach 150 Minuten auf 55% des ursprünglichen Extinktionswertes ab. In dem entsprechenden Parallelversuch ohne Lecithin sank die Extinktion bereits in 9 Minuten auf 3% des Ausgangswertes.

In Gegenwart von Lecithin sind die beim Zugeben von Wasser zu den Carotin-Fettlösungen entstehenden Trübungen deutlich geringer.

¹⁾ J. B. *Sumner* und R. J. *Sumner*, J. Biol. Chem. **134**, 531 (1940).

²⁾ Ausser dem physikalisch-chemischen Einfluss auf die Komponenten ist in Betracht zu ziehen, dass unter Umständen das eine oder andere Lösungsmittel selber durch die aktiven Peroxyde oxydiert werden kann.

Lecithin.

Tabelle I.

Hanfsamenöl (Hs.-öl).

0,8 mg Carotin; 1 cm³ Enzym. — 30°

	Zusätze mg		Entf.-Z. Min.	Bemerkungen
	Hs.-öl	Lecithin		
I	1,0	—	6,5	
Ia	1,0	1	—	nach 4 Stunden noch gelb
II	2,5	—	4	
IIa	2,5	1	—	nach 4 Stunden fahlgelb
III	5,0	—	4,5	
IIIa	5,0	1	75	
IV	10	—	7	
IVa	10	1	60	

Tabelle II.

Leinölsäure.

0,8 mg Carotin; 1 cm³ Enzym. — 30°.

	mg Zusätze		Entf.-Z. Min.
	Leinöls.	Lecithin	
I	2,5	—	39
Ia	2,5	1	22
II	5,0	—	11
IIa	5,0	1	6,5
III	10	—	4
IIIa	10	1	3,5
IV	10	—	5,5
IVa	10	5	3,5

Tabelle III.

Sojaöl und Linolensäure.

A. = Sojaöl; B. = Linolensäure. 0,3 mg Carotin; 1 cm³ Enzym. — Zimmertemp.

	mg Zusätze		Entf.-Z. Min.	Bemerkungen
	Öl bzw. Säure	Lecithin		
A.				
I	5	—	12	
Ia	5	1	—	n. 60 Min. noch tief gelb
B.				
I	2,5	—	15	
II	5,0	—	5	
IIa	5,0	1	4	
IIb	5,0	5	4	

Tabelle IV.

Lecithinhemmung in Fett-Fettsäuregemischen.
0,3 mg Carotin; 1 cm³ Enzym. — Zimmertemp.

	mg Zusätze			Entf.-Z. Min.
	Hs.-öl	Leinöls.	Lecithin	
I	5	—	—	3
II	5	—	1	390
III	—	5	—	3,5
IV	—	5	1	3
V	4,5	0,5	—	6
VI	4,5	0,5	1	85
VII	4	1	—	10
VIII	4	1	1	50
IX	2,5	2,5	—	6
X	2,5	2,5	1	7

Ob es auf das Verhältnis von Fett : Fettsäure ankommt oder auf die absolute Menge ungesättigter Fettsäuren, zeigen diese Versuche nicht. Es ist die Frage, ob beim Vorliegen etwa optimaler Fettsäuremengen die Carotinoxidation durch vorhandenes ungesättigtes Neutralfett beeinflusst wird. Mit 2,5 mg Hanföl ist dies in nennenswertem Umfange nicht der Fall, wie die niedrigen Entfärbungszeiten in den Versuchen IX und X erkennen lassen. Von der Verwendung grosser Ölmengen (etwa über 10 mg) wurde noch abgesehen, da dann in der gewählten Versuchsanordnung beim Verdünnen mit Wasser eine Ausscheidung von Öltröpfchen, die Carotin einschliessen, eintritt und die Feststellung der völligen Ausbleiche schwierig machen.

Vitamin E.

Tabelle V.

Hanfsamenöl und Linolensäure.

0,3 mg Carotin; 1 cm³ Enzym. — Zimmertemp. — T. = *d,l*- α -Tocopherol.

	mg Zusätze				Entf.-Z. Min.	Bemerkungen
	Hs.-öl	Linolens.	T.	T.-acetat		
I	2,5	—	—	—	3	
Ia	2,5	—	1	—	—	nach 20 Stunden noch tief gelb
Ib*	2,5	—	—	5	9	
II	—	5	—	—	7	
IIa	—	5	1	—	—	nach 20 Stunden noch tief gelb
III	—	10	—	—	7	
IIIa	—	10	1	—	—	war nach 20 Stunden ausgebleicht
IIIb**	—	10	1	—	40	

* Die kleine Verzögerung der Carotin entfärbung in diesem Versuch dürfte geringen Mengen freien Tocopherols zuzuschreiben sein.

** In diesem Versuch wurden ausserdem 5 mg Lecithin zugesetzt, wodurch die Entfärbungszeit gegenüber Versuch IIIa erheblich verkürzt wurde. Vgl. weiter Tabelle VI.

Tabelle VI.

Einfluss von Lecithin auf die Hemmung durch Vitamin E.
(Versuche mit Leinölsäure.)
0,3 mg Carotin; 1 cm³ Enzym. — Zimmertemp.

	mg Zusätze			Entf.-Z. Min.	Bemerkungen
	Leinöls.	α -T.	Lecithin		
I	5	—	—	2,5	nach 7 Stunden fahl gelb
Ia	5	0,5	—	—	
Ib	5	0,5	5	45	
II	10	—	—	2,5	nach 7 Stunden noch tief gelb
IIa	10	0,5	—	18	
IIb	10	0,5	2,5	7	
III	10	1,2	—	—	
IIIa	10	1,2	2,5	255	
IIIb	10	1,2	10	30	

Zusammenfassung.

Es wird der Einfluss von Lecithin und α -Tocopherol auf die durch ein Enzym der Sojabohne im Verein mit einem ungesättigten Fett oder einer ungesättigten Fettsäure bewirkte Oxydation von Carotin untersucht. Lecithin hemmt diese Oxydation, wenn ein ungesättigtes Fett, hemmt sie dagegen nicht, wenn eine ungesättigte Fettsäure verwendet wird. Mit Fett-Fettsäuregemischen ist die Lecithinhemmung geringer oder aufgehoben, gegenüber Fett allein. α -Tocopherol hemmt in beiden Fällen. α -Tocopherol-acetat ist unwirksam. In Versuchen mit Fettsäuren setzt Lecithin die oxydationshemmende Wirkung des Tocopherols herab.

Basel, Augenklinik der Universität.

59. Über Steroide und Sexualhormone.

(67. Mitteilung¹).

Herstellung eines Homologen des Progesterons

von Pl. A. Plattner und W. Schreck.

(31. III. 41.)

Ausgehend von der vor einiger Zeit beschriebenen $\Delta^{5,17}$ -3-Oxy-pregnadien-21-säure I haben wir das Δ^4 -3-Keto-17-[17²-oxo-propyl]-androst-4-en IV, ein Homologes des Progesterons, hergestellt. Dieser Übergang liess sich nach dem Formelschema I—IV in einer Reihe glatt verlaufender Operationen verwirklichen.

¹) 66. Mitt. Helv. **24**, 76 (1940).