

## 124. Zur chemischen Embryologie. Lipid-Synthesen im Hühnerembryo

von Karl Bernhard.

(5. IX. 41.)

Fast die Hälfte des Eifettes wird während der Bebrütung verbraucht, der Rest soll sich nach *Tangl* und *v. Mituch*<sup>1)</sup> ungefähr gleichmässig auf den verbleibenden Dotter und die Körpersubstanz des Kückens verteilen. Dass im Embryo in bezug auf den Lipidstoffwechsel aber nicht ausschliesslich Speicherung von unverändertem Eifett stattfindet, zeigten bereits Untersuchungen von *Eaves*<sup>2)</sup>, welcher für das Dotterfett abnehmende, für das Embryofett ansteigende Jodzahlen erhielt.

Probleme der chemischen Embryologie, z. B. stoffliche Veränderungen im Verlaufe der fötalen Entwicklung lassen sich neuerdings mit Hilfe der Isotopenmethodik verfolgen. So injizierten *Hevesy*, *Levi* und *Rebbe*<sup>3)</sup> zur Untersuchung des Phosphorstoffwechsels in befruchtete Eier radioaktive Natriumphosphatlösung und beobachteten im Phosphatidphosphor der Embryonen eine bemerkenswert hohe, im Phosphatidphosphor aus dem Eigelb dagegen keine spezifische Aktivität. Die im wachsenden Hühnchen vorhandenen Phosphatide stammen daher nicht nur aus den Reserven, also aus dem Eigelb, sie werden vielmehr während des embryonalen Lebens auch aufgebaut.

Unter biologischen Bedingungen im Tierkörper verlaufende Lipidsynthesen können durch Verabreichung von schwerem Wasser bewiesen und kontrolliert werden. Aus den Organen oder den Dépôts solcher Tiere isolierte Fettsäuren enthalten stabil gebundenes Deuterium, das im Verlaufe ihrer Neubildung aufgenommen wurde<sup>4)</sup>.

*Schoenheimer* und *Rittenberg*<sup>5)</sup> injizierten in Hühnereier 0,35 bis 0,5 cm<sup>3</sup> 98-proz. schweres Wasser und isolierten nach 20-tägiger Bebrütung aus dem Gesamt-Eiinhalt die Fettsäuren. Während dieselben praktisch kein Deuterium enthielten, fanden *Bernhard* und *Schoenheimer*<sup>6)</sup> bei einer 1,62 Atom-% D betragenden Anreicherung der Eiflüssigkeit, in den Fettsäuren aus dem Embryo 0,14 Atom-% D.

<sup>1)</sup> *Tangl, F. und A. v. Mituch, Pflüger's Arch.* **121**, 437 (1908).

<sup>2)</sup> *Eaves, E. C., Am. J. Physiol.* **40**, 451 (1910).

<sup>3)</sup> *Hevesy, G. C., H. B. Levi und O. H. Rebbe, Biochem. J.* **32**, 2147 (1938).

<sup>4)</sup> *Schoenheimer, R. und D. Rittenberg, J. Biol. Chem.* **114**, 381 (1936); *D. Rittenberg und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem.* **121**, 235 (1937); *H. H. Ussing, Skand. Arch. Physiol.* **78**, 225 (1938); *K. Bernhard und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem.* **133**, 713 (1940).

<sup>5)</sup> *Schoenheimer, R. und D. Rittenberg, J. Biol. Chem.* **114**, 381 (1936).

<sup>6)</sup> *Bernhard, K. und R. Schoenheimer, J. Biol. Chem.* **133**, 707 (1940).

Es war angezeigt, diesen Versuch in grösserem Umfange zu wiederholen und auch das Schicksal der Sterine zu prüfen. *Thannhauser* und *Schaber*<sup>1)</sup> bemerkten während der Bebrütung von Hühnereiern eine Cholesterin-Zunahme. Nach *Kusui*<sup>2)</sup> soll der Cholesteringehalt bis zum 14. Bebrütungstag zurückgehen, bei der weiteren Entwicklung aber vermehrt sein. *H. Dam*<sup>3)</sup> gelangte auf Grund eingehender Untersuchungen zur Auffassung, dass ein Cholesterinanstieg bis zum Ende der Brutzeit nicht bewiesen sei. Er fand aber eine Vermehrung des Ester-Cholesterins auf Kosten des freien Cholesterins.

Ich habe in 20 Hühnereier 0,5—1,0 cm<sup>3</sup> Deuteriumoxyd (99,8 % D) gebracht und nach einer Bebrütungszeit von 17 Tagen und 12 Stunden 9 normal entwickelte Hühnchen erhalten. Sie wurden sorgfältig vom Eiinhalt getrennt, dessen Deuterium-Gehalt 1,13 bzw. 1,49 Atom-% betrug.

Aus den Kücken isolierte ich das Unverseifbare und die freien Fettsäuren. Letztere wurden über die Bleisalze in gesättigte und ungesättigte Säuren zerlegt. Durch Destillation der Methylester gelang die Abtrennung reiner Palmitinsäure.

Aus dem Unverseifbaren erhielt ich durch Umkristallisation das Cholesterin.

Alle diese Verbindungen waren Deuterium-haltig. Die Analyse ergab folgende Werte:

Gesättigte Säuren . . . . .	0,09 Atom-% D
Palmitinsäure . . . . .	0,08 Atom-% D
Ungesättigte Säuren . . . . .	0,05 Atom-% D
Cholesterin . . . . .	0,12 Atom-% D

Diese Befunde berechtigen zur Annahme, dass der Hühnerembryo sowohl Fettsäuren als Cholesterin aufbaut, obwohl ihm im Eidotter beträchtliche Lipid-Mengen zur Verfügung stehen. Auf Grund des Deuterium-Gehaltes der gesättigten Fettsäuren, welcher etwa 6—8 % der Deuterium-Konzentration des Eiinhaltes beträgt, scheint die Fettsynthese in einem nicht zu vernachlässigenden Ausmasse stattzufinden.

Die Fettsäuren aus dem Eiinhalt waren frei von schwerem Wasserstoff.

### Experimentelles.

#### Injektionen.

Vor den Injektionen, welche nach den Angaben *Tomita's*<sup>4)</sup> in die Eispitze erfolgten, kühlte ich die Eier zum Druckausgleich kurze

<sup>1)</sup> *Thannhauser, S. J. und H. Schaber, Z. physiol. Ch.* **127**, 278 (1923).

<sup>2)</sup> *Kusui, K., Z. physiol. Ch.* **181**, 101 (1929).

<sup>3)</sup> *Dam, H., Bioch. Z.* **215**, 475 (1929).

<sup>4)</sup> *Tomita, M., Bioch. Z.* **116**, 15 (1921).

Zeit im Eisenschrank. Nach Desinfektion der Einstichstelle mit Jodlösung, wurden unter sterilen Konditionen durch eine kleine, mit einer starken Nadel erzeugte Öffnung 0,5—1,0 cm<sup>3</sup> 0,9% Natriumchlorid enthaltendes Deuteriumoxyd eingeführt. Diese Mengen richteten sich nach den jeweiligen Verhältnissen, bei vielen Eiern trat sofort oder allmählich Eiweiss aus. In einigen Fällen brachte ich zum Abfluss desselben eine weitere, seitliche Öffnung an. Diese Löcher habe ich nach nochmaliger Abkühlung der Eier mit Wachs verschlossen und mit der Bebrütung im elektrischen Brutschrank begonnen. Im Verlaufe derselben mussten von den 20 Eiern 9 ausgeschaltet werden, in zwei weiteren starben die Föten frühzeitig ab, in 9 Eiern gelangten die Hühnchen zur normalen Entwicklung (vgl. Tabelle).

Nr.	Gewicht, g			cm <sup>3</sup> D <sub>2</sub> O 99,9%
	vor Bebrütung	nach Bebrütung	Abnahme g	
1	65,8	61,3	4,5	0,7
2	63,6	59,8	3,8	0,6
3	59,0	53,3	5,7	0,5
4	58,6	55,2	3,4	0,8
5	57,2	53,1	4,1	0,5
6	58,2	54,0	4,2	0,9
7	58,5	53,8	4,7	0,6
8	60,0	55,8	4,2	0,7
9	57,2	53,3	3,9	0,5

### Isolierung der Lipide aus den Hühnchen.

Nach Durchschneiden der Nabelschnur an den Einmündungsstellen wurden die getöteten Hühnchen sorgfältig von Dottersack und Ei getrennt, mit destilliertem Wasser abgespült, mit Filterpapier getrocknet und in methanolische Kalilauge gebracht. Sie lösten sich beim längeren Stehen bis auf einige Knochenreste auf. Vor der Verdünnung mit Wasser erwärmt ich kurze Zeit am Rückflusskühler, filtrierte nach dem Abkühlen über Glaswolle und extrahierte wie üblich mit Petroläther und nach Ansäuern mit Äther.

Die Petrolätherauszüge wurden mit verdünnter Lauge und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Sie hinterliessen eingedunstet 270 mg gelblichen Rückstand, den ich aus Wasser-Alkohol unter Verwendung von etwas Kohle umkristallisierte. Es konnten 148 mg bei 144° schmelzender Krystalle erhalten werden, welche mit Cholesterin (Smp. 146°) im Mischschmelzpunkt keine Erniedrigung ergaben.

D-Gehalt: 0,12 ± 0,01 Atom-% D

Aus den gut ausgewaschenen Ätherextrakten ergaben sich 4,593 g Fettsäuren. Jod-Zahl 70,76. 3,98 g versetzte ich in alkoholischer Lösung mit Bleiacetat und krystallisierte die sich ausscheidenden Bleisalze aus Alkohol um. Gewicht der freien gesättigten Fettsäuren: 1,044 g; Smp. 54°.

D-Gehalt:  $0,09 \pm 0,00$  Atom-% D

Gewicht der freien ungesättigten Fettsäuren: 2,32 g. Jod-Zahl 127,2.

D-Gehalt:  $0,05 \pm 0,00$  Atom-% D

700 mg der gesättigten Fettsäuren habe ich verestert und 718 mg des Methylesters in der von *Rittenberg*<sup>1)</sup> beschriebenen Kolonne im Hochvakuum destilliert. Eine bei 26—27° schmelzende Fraktion ergab nach Verseifung 450 mg Krystalle, welche aus Aceton-Wasser mehrmals umkrystallisiert bei 60° schmolzen. Mischschmelzpunkt mit Palmitinsäure (Smp. 61°) 61°.

3,489 mg verbrauchten 1,360 cm<sup>3</sup> 0,01-n. NaOH

C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> Ber. Äq.-Gew. 256,3

Gef. „ 257,2

D-Analyse:  $0,08 \pm 0,00$  Atom-% D

#### Aufarbeitung der Eier.

Nach Abtrennung der Hühnchen wurden die Eier 1—5 und 6—9 nach Entfernung der Schalen vereinigt und gut durchgemischt. Im Vakuum destillierte ich bei gewöhnlicher Temperatur eine Wasserprobe ab zur Bestimmung der stattgefundenen Anreicherung der Ei-flüssigkeit an Deuterium.

D-Analyse: Eier 1—5  $1,13 \pm 0,00$  Atom-% D

Eier 6—9  $1,49 \pm 0,01$  Atom-% D

Die vereinigten Eiinhalte habe ich mit 25-proz. methanolischer Kalilauge durch 5-stündiges Erwärmen am Rückfluss verseift und nach Ansäuern die freien Fettsäuren isoliert. Sie wogen auf dem Wasserbade im Stickstoffstrom getrocknet 37,04 g.

Jod-Zahl: 75,89; 75,83

D-Analyse: kein Deuterium

#### Zusammenfassung.

1. Durch Injektion von schwerem Wasser in befruchtete Hühner-eier gelang eine Anreicherung des Eiinhaltes an Deuterium. Aus in einem solchen Milieu entwickelten Hühnchen wurden die Fettsäuren und das Cholesterin isoliert. Beide enthielten stabil gebundenes Deuterium. Damit ist unter Benützung des schweren Wasserstoffes als Indikator bewiesen, dass der Hühnerembryo sowohl Fettsäuren als Cholesterin teilweise synthetisiert.

<sup>1)</sup> Schoenheimer, R. und D. Rittenberg, J. Biol. Chem. **120**, 155 (1937).

2. Die Fettsäuren des Eiinhaltes weisen kein Deuterium auf. Ein Einbau desselben in Fettsäuremolekülen erfolgt nur anlässlich ihrer Neubildung z. B. aus kleinen Bruchstücken; Bedingungen, die hier nicht vorliegen.

Ich danke der *Rockefeller Foundation* in New York und der Stiftung „*Jubiläums-*  
*spende für die Universität Zürich*“ für die Unterstützung dieser Arbeit.

Physiologisch-chemisches Institut der  
Universität Zürich.

---

**125. Über einige potentiometrische Folgetitrationen von Verbindungen des Wolframs und Molybdäns neben solchen des Vanadiums und des Eisens**

von W. D. Treadwell und R. Nieriker.

(6. IX. 41.)

In einer kurz vorangegangenen Mitteilung (S. 1067) wurde gezeigt, dass sich Wolframsäure in phosphorsaurer Lösung quantitativ zu Wolfram(IV)- respektive Wolfram(V)-phosphat reduzieren lässt, wodurch rasche und genaue Titrationen dieses Elementes ermöglicht werden. Unter analogen Bedingungen konnte Molybdänsäure in phosphorsaurer Lösung zu Molybdän(III)-phosphat reduziert werden. Dadurch ergeben sich neue Möglichkeiten für die Titration von Wolfram und Molybdän neben anderen wichtigen Komponenten legierter Stähle. Aus der Reihe dieser Möglichkeiten sollen im Folgenden einige Beispiele näher beschrieben werden.

**I. Titration eines Gemisches von Wolfram- und Vanadinsäure.**

a) Das Gemisch der Säuren soll keine anderen reduzierbaren Substanzen enthalten. Um vorhandene Salpetersäure zu zerstören, wird die Lösung mit konz. Schwefelsäure abgeraucht und dann der Rückstand in so viel 1-m. Phosphorsäure aufgenommen, dass die vorwiegende Komponente eine Konzentration von etwa 0,01-m. erhält.

Diese Lösung wird nun in Zeit von 30 Minuten, in gleichmässigem Tempo, durch einen mit elektrolytisch erzeugten Cadmiumflittern beschickten Reduktor<sup>1)</sup> in das mit reinem Stickstoff von Luft vollkommen befreite Titrationsgefäß<sup>2)</sup> abfliessen gelassen. Während der Reduktion wird der Stickstoffstrom durch das Titrationsgefäß mit mässiger Geschwindigkeit in Gang gehalten. In dem Reduktor wird

<sup>1)</sup> Vgl. Helv. 5, 732 (1922).

<sup>2)</sup> Helv. 24, 1069 (1941), Fig. 1.