

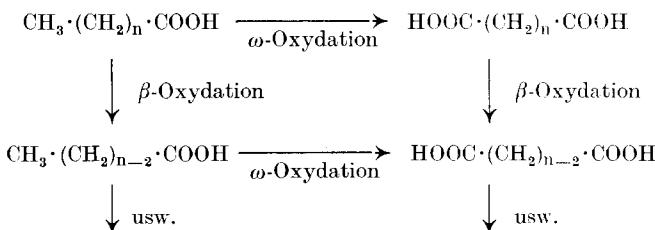
## 159. Zum biologischen Abbau der Fettsäuren durch Methyloxydation.

### Herstellung und Stoffwechsel von Deuterio-Dicarbonsäuren

von Karl Bernhard.

(1. XI. 41.)

Nach *Verkade* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> scheiden gesunde Versuchspersonen nach grossen Gaben von Triglyceriden der Undecyl-, Caprin-, Pelargon- und Caprylsäure im Harn geringe Mengen entsprechender Dicarbonsäuren, also Undecan-dicarbonsäure, Sebacin-, Azelain- und Korksäure aus. Der Abbau aller normaler gesättigter Fettsäuren *in vivo* soll demnach durch  $\omega$ -Oxydation und anschliessende  $\beta$ -Oxydation nach dem Schema<sup>2)</sup>



erfolgen.

*Flaschenträger* und *Bernhard* gelangten in Fortführung von Versuchen über Fettabbau im Tierkörper zu analogen experimentellen Befunden, im Gegensatz zu *Verkade* aber zu anderen Deutungen. Bei Verabreichung bestimmter Fettsäuren, Fettsäure-estern oder Fetten an Hunde<sup>3)</sup> beschränkte sich die „Diacidurie“ auf einige Zehntelprozente Sebacin-, Azelain- oder Korksäure. Als Sonderfall einer Methyloxydation<sup>4)</sup> stellt die  $\omega$ -Oxydation eine Auswegsreaktion dar, die dann etwa auftritt, wenn die vorhandene COOH-Gruppe verschlossen ist. Zur Erzwingung des Abbaues wird eine neue geschaffen. Der Übergang der  $\alpha$ -Methyl-benzol-sulfamido-laurinsäure in die  $\alpha$ -Methyl-benzol-sulfamido-adipinsäure<sup>5)</sup>), ferner das Verhalten bestimmter Alkyl-substituierter Malonsäuren, also von Verbindungen, welche  $\alpha$ -ständig eine sperrende Gruppe aufweisen,

<sup>1)</sup> *Verkade, P. E., M. Elzas, J. van der Lee, H. H. de Wolff, A. Verkade-Sandbergen und D. van der Sande*, Z. physiol. Ch. **215**, 225 (1933); *Verkade, P. E., und J. van der Lee*, Biochem. J. **28**, 31 (1934).

<sup>2)</sup> *Verkade, P. E., und J. van der Lee*, Z. physiol. Ch. **227**, 213 (1934).

<sup>3)</sup> *Flaschenträger, B., und K. Bernhard*, Helv. **18**, 962 (1935); Z. physiol. Ch. **238**, 221 (1936).

<sup>4)</sup> *Flaschenträger, B., und K. Bernhard*, R. **55**, 278 (1936).

<sup>5)</sup> *Flaschenträger, B., K. Bernhard, C. Löwenberg und M. Schläpfer*, Z. physiol. Ch. **225**, 157 (1934).

lassen sich leicht in diesem Sinne interpretieren. Nach Fütterung von n-Octyl-, n-Nonyl- und n-Decylmalonsäure an Hunde entstanden in zum Teil bereits guter Ausbeute entsprechende Tricarbonsäuren<sup>1)</sup>. Auch hier blieb die  $\omega$ -Oxydation, wenn man sich den Malonsäure-rest wegdenkt, auf die Säuren mit 8—10 C-Atomen begrenzt. Da diese aber in den gebräuchlichen Fetten prozentual nur in untergeordnetem Masse vorkommen, erscheint sie schon deshalb ohne grosse biologische Bedeutung.

Gewisse Dicarbonsäuren sind von der Zelle schwer angreifbar. In Stoffwechselversuchen an Menschen und Hunden fanden *Mori*<sup>2)</sup>, *Flaschenträger*<sup>3)</sup>, *Flaschenträger* und *Bernhard*<sup>4)</sup>, *Bernhard* und *Andreae*<sup>5)</sup>, dass Korksäure grösstenteils, Sebacin- und Adipinsäure weitgehend wieder ausgeschieden, vom Organismus also nicht ausgenutzt werden, Beobachtungen, welche *Verkade*, *van der Lee* und *van Alphen*<sup>6)</sup>, *Emmrich* und *Emmrich-Glaser*<sup>7)</sup> bestätigten. Es ist dabei unwichtig, ob die Aufnahme der Verbindungen per os oder subcutan erfolgt, individuelle Schwankungen sind wohl vorhanden, aber nicht entscheidend und wären erst durch ausgedehnte Versuche zu beweisen.

Die genannten Säuren werden aber leichter abgebaut, wenn man eine der beiden COOH-Gruppen verschliesst. Bei Halbestern<sup>8)</sup>, besonders bei Monoamiden der Kork- und Sebacinsäure<sup>9)</sup> ist die Diacidurie geringer, Adipin- und Sebacinsäure-halbanilid verbrennen fast völlig<sup>10)</sup>.

Von den höheren Dicarbonsäuren sind die Hexa- und Tetradecadicarbonsäure nach Verabreichung an Menschen und Hunde nicht mehr auffindbar. Die Decadicarbonsäure ist wieder schwerer verbrennlich, trotzdem tritt sie nach Aufnahme grosser Mengen Laurinsäure beim Hunde nicht auf, auch beim Menschen wirkt Laurinsäure-triglycerid kaum diacidogen.

*Verkade* setzt voraus, dass beim  $\omega$ -oxydativen Fettabbau entstehende Dicarbonsäuren als besonders reaktionsfähige Moleküle über Kettenreaktionen völlig verbrennen. Das Ausbleiben der Diacidurie nach Fettgenuss soll kein Beweis für nicht

<sup>1)</sup> *Bernhard*, K., Z. physiol. Ch. **269**, 135 (1941).

<sup>2)</sup> *Mori*, Y., J. Biol. Chem. **35**, 341 (1918).

<sup>3)</sup> *Flaschenträger*, B., Z. physiol. Ch. **159**, 297 (1926).

<sup>4)</sup> *Flaschenträger*, B., und K. *Bernhard*, Z. physiol. Ch. **238**, 221 (1936).

<sup>5)</sup> *Bernhard*, K., und M. *Andreae*, Z. physiol. Ch. **245**, 103 (1937).

<sup>6)</sup> *Verkade*, P. E., J. *van der Lee*, A. J. S. *van Alphen*, Z. physiol. Ch. **250**, 47 (1937); **252**, 163 (1938).

<sup>7)</sup> *Emmrich*, R., und J. *Emmrich-Glaser*, Z. physiol. Ch. **266**, 183 (1940).

<sup>8)</sup> *Flaschenträger*, B., und K. *Bernhard*, Z. physiol. Ch. **240**, 19 (1936); *Bernhard*, K., Z. physiol. Ch. **246**, 133 (1937).

<sup>9)</sup> *Bernhard*, K., Z. physiol. Ch. **256**, 65 (1938).

<sup>10)</sup> *Flaschenträger*, B., und K. *Bernhard*, Z. physiol. Ch. **256**, 71 (1938).

stattfindende  $\omega$ -Oxydation, das Schicksal zugeführter und intermediär gebildeter Dicarbonsäuren folglich grundsätzlich verschieden sein<sup>1</sup>). Nach Verfütterung im Harn auftretende Sebacin-, Kork- oder Adipinsäure wäre mit den aufgenommenen Molekülen nicht identisch, sie würden sich vielmehr aus solchen und aus durch gleichzeitigen Fettabbau entstandenen zusammensetzen. Trifft dies aber nicht zu, so ist der behauptete Fettabbau durch  $\omega$ -Oxydation und nachfolgende bilaterale  $\beta$ -Oxydation unrichtig.

Hier liessen sich durch Verwendung von schwerem Wasserstoff als Indikator eindeutige Beweise erbringen. Zusammen mit Fett verabreichte, stabil gebundenes Deuterium aufweisende Dicarbonsäuren dürfen als „körperfremde“ Verbindungen ihren D-Gehalt im Organismus nicht ändern. Entstehen aber durch gleichzeitigen Fettabbau Dicarbonsäuren, so müssten sie im Verlaufe des Zellgeschehens mit den signierten Molekülen zusammentreffen und dieselben „verdünnen“. Das Ergebnis wäre eine im Harn auftretende Säure von geringerer D-Konzentration.

Ausgehend von dieser Überlegung wurden zur Prüfung ihres Verhaltens im intermediären Stoffwechsel, durch längeres Erhitzen der Natriumsalze in 30—50-proz. schwerem Wasser bei starkem Alkaliüberschuss Deutero-bernstein-, -adipin-, -kork- und -sebacinsäure hergestellt. Vorversuche hatten ergeben, dass unter solchen Bedingungen ein Austausch von H gegen D erzwungen werden kann. Beim Erhitzen in Wasser geht der schwere Wasserstoff der neutralisierten Deutero-säuren nicht verloren. Eine Änderung der Isotopenkonzentration durch Austausch innerhalb des Tierkörpers war daher nicht zu befürchten.

Bernsteinsäure verbrennt selbst in grossen Dosen gegeben leicht. Bei einem Hunde, der im Verlauf von Belastungsversuchen 1, 2 und 3 g als Ammoniumsalz pro Tag und Kilogramm Körpergewicht erhielt, war die Säure im Harne nicht nachweisbar. Anderseits hatten wir früher nach geringeren Dosen bei einem jungen Tier kleine Mengen aufgefunden<sup>2</sup>.

Vier Ratten, welche innerhalb 48—96 Stunden je 1 g schwere Bernsteinsäure aufnahmen, zeigten eine gewisse Anreicherung des Körperwassers an Deuterium. In den Leberfettsäuren war ein sehr geringer D-Gehalt vorhanden, aus dem Harne gelang die Isolierung von Bernsteinsäure nicht.

<sup>1)</sup> Verkade, P. E., J. van der Lee, A. J. S. van Alphen, Z. physiol. Ch. **250**, 47 (1937).

<sup>2)</sup> Bernhard, K., und M. Andreae, Z. physiol. Ch. **245**, 103 (1937).

Tabelle I.

Fütterung von Deuterio-bernsteinsäure (als Natriumsalz)  
ent. 27,6 Atom-% D an Ratten.

Ratte Nr.	Deuterio-bern- steinsäure g/kg/die	D-Gehalt des Körperwassers Atom-%	D-Gehalt der Leberfettsäuren Atom-%
1	1,705	0,05	0,02
2	1,740	0,06	0,02
3	1,030	0,07	0,02
4	1,030	0,05	0,02

Ich fütterte an Hunde zusammen mit Reis, Pferdefleisch und Fett Deuterio-adipin-, -kork- und -sebacinsäure. In den analysenrein aus den Harnen isolierten „schweren“ Säuren bestimmte ich den D-Gehalt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle II ersichtlich.

Tabelle II.

Fütterung von Deuterio-Dicarbonsäuren (als Natriumsalze) und Fett an Hunde.

Hund	Fett g/mg/die	Säure	Verfüttert			Ausgeschieden		
			total g	mg die/kg	Atom- % D	Atom- % D	Ausbeute % roh	Ausbeute % rein
M	0	Adipin	2,5	108	11,8	11,9	28,0	20,0
B	1460	Adipin	4,5	109	12,0	12,0	50,9	33,5
B	1470	Kork	3,0	74	7,6	7,7	69,4	59,0
M	1740	Kork	1,5	44	7,6	7,4	70,1	45,0
M	1670	Sebacin	3,0	125	3,7	3,7	17,2	8,3

In allen Fällen erwiesen sich die aus den Harnen isolierten Dicarbonsäuren auf Grund ihres Isotopengehaltes mit den verfütterten identisch. Kleine Abweichungen liegen innerhalb der Fehlergrenze der D-Bestimmungsmethode.

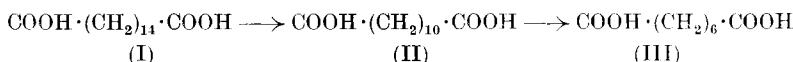
In einem weiteren Versuche wurde an zwei Ratten Deuterio-adipinsäure gegeben. Auch hier trat keine Änderung der D-Konzentration ein. In den Fettsäuren aus den Kadavern und den Lebern war schwerer Wasserstoff nicht nachweisbar, in den Körperflüssigkeiten kaum.

Tabelle III.

Fütterung von Deuterio-adipinsäure (als Natriumsalz) an Ratten.

Tier Nr.	Adipinsäure verfüttert			Adipinsäure ausgeschieden			Atom-% D	
	total g	mg/kg die	Atom- % D	Atom- % D	Ausbeute %		im Körper- wasser	in den Fettsäuren
					roh	rein		
1	1,60	1250	10,1	10,1	38,8	26,4	0,01	0
2	1,60	1680					0,01	0

Mit ansteigender C-Zahl ( $C_{10}$ — $C_{18}$ ) nimmt die Verbrennlichkeit der Dicarbonsäuren zu. *Emmrich* und *Emmrich-Glaser*<sup>1)</sup> konnten an Ratten verfütterte Tetradecan-dicarbonsäure in den Geweben nicht nachweisen, eine Speicherung auch nur temporärer Art scheint daher nicht einzutreten. Der Abbau sowohl der Tetradecan- (I) als auch der Decan-dicarbonsäure (II) durch bilaterale  $\beta$ -Oxydation müsste über Korksäure (III) führen:



Nach gleichzeitigen Gaben von Deuterio-kork- und Tetradecan-dicarbonsäure oder Deuterio-kork- und Decan-dicarbonsäure an Hunde zeigte die ausgeschiedene schwere Säure nur eine geringe Verminderung ihres anfänglichen D-Gehaltes (Tabelle IV).

Tabelle IV.

## Gleichzeitige Fütterung von Deuterio-korksaure und Tetradecan- oder Decandicarbonsäure an Hund M (Natriumsalze).

Tetradecan- oder Decan-dicarbon- säure	Fett mg	Deuterio-korksäure					
		verfüttert			ausgeschieden		
total g	mg kg/die	die/kg	total g	mg die/kg	Atom- % D	Atom- % D	Ausbeute rein %
C <sub>12</sub>	3,0	83	1660	1,5	41	7,7	7,3
C <sub>16</sub>	4,0	88	1750	2,0	44	7,4	7,0

## Experimenteller Teil.

(Mitbearbeitet von Fr. stud. phil. *H. Steinhauser* und Herrn med. dent. *E. Halpern*)

## Herstellung von Deuterio-Dicarbonsäuren.

a) Versuche über den Austausch von H gegen D in Di-carbonsäuren bei Gegenwart von Alkali oder Schwefelsäure<sup>2)</sup>. Die in der Tabelle angeführten, in 4-proz. schwerem Wasser gelösten Säuren wurden in Gegenwart von Kaliumhydroxyd oder Schwefelsäure mit Unterbrüchen während 24 Stunden am Rückflusskühler auf freier Flamme erhitzt. Nach Abdestillieren des schweren Wassers im Falle der Anwendung von Lauge, lösten wir den Rückstand, säuersten an und ätherten aus. Durch Umkristallisieren aus heißem Wasser konnten die Säuren rein erhalten (Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte) und auf D geprüft werden.

<sup>1)</sup> Emmrich, R., und J. Emmrich-Glaser, Z. physiol. Ch. **266**, 183 (1940).

2) Diese Versuche führte ich am Department of Biochemistry, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, City of New York, durch. Die Herren Prof. Dr. R. Schoenheimer † und Prof. Dr. D. Rittenberg haben mich dabei freundlichst beraten.

Tabelle V.

Austausch von H gegen D in Dicarbonsäuren.

500 mg Säure gelöst in 25 cm<sup>3</sup> 4-proz. schwerem Wasser. D-Gehalte nach 24-stündigem Erhitzen.

Säure	Zusätze	D-Aufnahme Atom-%
Bernstein-	20 Mol KOH	1,15 ± 0,01
Bernstein-	20 Mol KOH	0,91 ± 0,01
Bernstein-	10 Mol KOH	0,14 ± 0,00
Bernstein-	1-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,13 ± 0,00
Mucon-*	4 Mol KOH	0,13 ± 0,01
Adipin-	20 Mol KOH	0,11 ± 0,00
Adipin-	1-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,06 ± 0,00
Kork-	20 Mol KOH	0,06 ± 0,01
Kork-	1-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,05 ± 0,00
Azelain-*	10 Mol KOH	0,07 ± 0,01
Sebacin-	20 Mol KOH	0,03 ± 0,00
Sebacin-	1-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,03 ± 0,01
Thapsia-	20 Mol KOH	0
Thapsia-	1-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0

\* D-Konzentration des Wassers 5 Atom-%.

b) Erhitzen von Dicarbonsäuren in schwerem Wasser mit viel Alkali. Zur Gewinnung an D angereicherter Dicarbonsäuren wurden die gut getrockneten Natriumsalze in schwerem Wasser höherer Konzentration gelöst und nach Zugabe von Natriumhydroxyd in Jenaer Rundkolben mit Schliff am Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach 48—72-stündiger Dauer destillierten wir im Ölbad das Deuteriumoxyd ab und lösten den Rückstand in heissem Wasser. Nach Filtration durch eine Glasfilternutsche wurde angesäuert, worauf sich bereits beim Abkühlen ein grosser Anteil der Säure ausschied. Den Rest erhielten wir aus den Mutterlaugen durch Ausäthern. Die gewonnenen Säuren erwiesen sich aus heissem Wasser umkristallisiert als analysenrein. Für die D-Bestimmungen, welche stets doppelt ausgeführt wurden, mussten bei den zu erwartenden hohen Konzentrationen entsprechende Verdünnungen mit den „nicht-isotopen“ Verbindungen vorgenommen werden. Die näheren Angaben und erhaltenen D-Werte sind aus Tabelle VI ersichtlich.

c) Prüfung der Stabilität der D- bzw. H-Atome beim Erhitzen der Dicarbonsäuren als Natriumsalze in gewöhnlichem oder verdünntem schwerem Wasser. Es war grundsätzlich wichtig, den D—H-Austausch der verwendeten Säuren unter gewissermassen biologischen Bedingungen zu kontrollieren. Wir haben zu diesem Zwecke das Verhalten der Natriumsalze der

Tabelle VI.

D-Gehalte von Dicarbonsäuren nach Erhitzen in Deuteriumoxyd mit Natriumhydroxyd  
(je 10 g Dicarbonsäure als Natriumsalz).

Säure	Schweres Wasser		Alkali-zusatz g NaOH in 100 cm <sup>3</sup>	Dauer Stun- den	Deuterio-Dicarbonsäure		
	Vol. cm <sup>3</sup>	Atom-% D			aufgenommen Atom-% D	Smp.	Äq.-Gew.
C <sub>4</sub>	50	50,0	20	48	27,59 ± 0,00	183—84°	59,1
	50	44,0	20	48	27,66 ± 0,20	183°	59,0
	50	38,2	10	48	14,25 ± 0,05	183°	59,0
C <sub>6</sub> *	48	32,0	21	72	11,75 ± 0,00	149°	73,1
	40	34,9	25	48	10,14 ± 0,06	148—49°	72,8
C <sub>8</sub>	44	42,4	20	48	7,59 ± 0,03	137—38°	87,1
C <sub>10</sub> **	50	49,0	10	72	3,66 ± 0,08	132°	100,5

\* 5 g Säure als Natriumsalz.

\*\* 5 g Natriumsalz.

schweren Verbindungen in Wasser geprüft, dabei aber nicht Temperaturen von 38—40° eingehalten, sondern sogar am Rückfluss während 24 Stunden erhitzt. Nachher wurde angesäuert, ausgeäthert, der ätherische Rückstand aus heissem Wasser umkristallisiert und von der analysenreinen Dicarbonsäure (Schmelzpunkt, Äq.-Gew.) je 2 Deuterium-Bestimmungen durchgeführt (Tabelle VII).

Tabelle VII.

Verhalten der Deuterio-Säuren beim Erhitzen ihrer Natriumsalze in Wasser.

1 g Säure mit NaOH neutralisiert und auf 50 cm<sup>3</sup> mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. 24 Stunden am Rückfluss erhitzt.

Säure	Atom-% Deuterium		Schmelzpunkt	Äq.-Gew.
	vor Erhitzen	nach Erhitzen		
C <sub>4</sub> *	14,25 ± 0,05	14,20 14,11 } 14,15 ± 0,05	182—83°	—
C <sub>4</sub>	15,46 ± 0,20	15,65 15,40 } 15,52 ± 0,12	182—83°	—
C <sub>6</sub>	10,14 ± 0,06	10,15 10,24 } 10,20 ± 0,05	149°	72,8
C <sub>8</sub>	7,73 ± 0,14	7,70 7,85 } 7,77 ± 0,07	138°	87,1
C <sub>10</sub> **	3,66 ± 0,08	3,55 3,64 } 3,60 ± 0,05	132°	101,3

\* 500 mg freie Säure in 50 cm<sup>3</sup> Wasser ohne NaOH.\*\* 500 mg neutralisierte Säure in 50 cm<sup>3</sup> Wasser.

Anderseits erhitzten wir die genau neutralisierten Dicarbon-säuren in 5-proz. schwerem Wasser und beobachteten, dass unter solchen Bedingungen lediglich Bernstein- und Adipinsäure in geringem Masse Deuterium aufnehmen. Bei den übrigen Säuren findet praktisch kein Austausch statt.

Tabelle VIII.

D-Aufnahme der Dicarbonsäuren beim Erhitzen ihrer Natriumsalze in 5 Atom-% D enthaltendem Wasser.

1 g Säure als Natriumsalz in 50 cm<sup>3</sup> schwerem Wasser.

Säure	Atom-% Deuterium	Schmelzpunkt
C <sub>4</sub>	0,06 ± 0,01	184°
	0,06 ± 0,00	184°
C <sub>6</sub>	0,03 ± 0,00	149—150°
C <sub>8</sub>	0,02 ± 0,00	139°
C <sub>10</sub>	0,02 ± 0,00	133°

## Stoffwechselversuche.

Die täglichen Fettmengen betrugen bei den Hunden je 20 g, es wurde ein Kochfett bestehend aus Cocosnussfett mit 10 % Butterzusatz verwendet. Die schweren Säuren verfütterten wir als Natriumsalze der Nahrung beigemischt. Störungen traten nicht ein. Die Aufarbeitung der quantitativ gesammelten Harne erfolgte wie bei den früheren Versuchen.

a) Fütterung von Deuterio-bernsteinsäure an Ratten. Vier männliche weisse Ratten erhielten zusammen mit einem Futter nach *Mc Collum* Deuterio-bernsteinsäure und wurden später mit Äther getötet. Aus den Lebern haben wir die Gesamt-Fettsäuren isoliert und wie die Körperflüssigkeit auf ihren Gehalt an Deuterium geprüft.

Tabelle IX.

Fütterung von Deuterio-bernsteinsäure an Ratten.

Dauer des Versuches	Gewicht der Ratten		Leber	
	vor Versuch Std.	nach Versuch g	Gewicht g	mg Fett- säuren
48	293	303	18,5	318
48	287	298	13,8	342
96	243	253	12,6	269
96	242	257	11,0	283

b) Fütterung von Bernsteinsäure an einen Hund. Ein ca. 2 Jahre alter Hund (11,6—12,3 kg Gewicht) erhielt mit Ammoniak neutralisierte Bernsteinsäure (vgl. Tabelle X). Die gesammelten

Harne der Fütterungs- und Nachperiode wurden nach Filtration auf ein kleines Volumen eingedampft und erschöpfend mit Äther extrahiert. Aus den dunkelbraunen ätherischen Rückständen konnte keine Bernsteinsäure isoliert werden. Die Faeces haben wir nicht geprüft. Erst gegen Ende des dritten Versuches war eine geringe Diarrhöe bemerkbar.

**Tabelle X.**  
Fütterung von Bernsteinsäure an Hund B.

Versuch	Bernsteinsäure			Dauer inkl. Nach- periode	Harn- menge cm <sup>3</sup>
	pro Tag g	g kg/die	total g		
1	12	1	73	8	5040
2	24	2	144	9	5280
3	35	3	210	9	6070

c) Fütterung von Deuterio-adipinsäure an Hunde.  
Versuch I: Hund M (Gewicht 11,60 kg) bekam an 2 Tagen je 1,25 g (11,75  $\pm$  0,00 Atom-% D) und schied während des 4 Tage dauernden Versuches 4180 cm<sup>3</sup> Harn aus. Wir isolierten in drei Fraktionen 700 mg rohe Adipinsäure. Nach Umkristallisieren aus heissem Wasser unter Verwendung von etwas Kohle schmolz die Säure bei 149°, ihr Äquivalentgewicht betrug 72,9 (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> ber. 73,0). Ausbeute 500 mg. Versuch II: Der 13,65 kg schwere Hund B erhielt während 3 Tagen je 1 g Deuterio-adipinsäure (12,04  $\pm$  0,08 Atom-% D). Harnmenge von 4 Tagen 3865 cm<sup>3</sup>. Ausbeute an roher Dicarbonsäure 2,289 g, an Rein-Produkt 1,507 g. Smp. 149°, Mischschmelzpunkt mit Adipinsäure 149°. Äq.-Gew. 73,1.

D-Bestimmungen in den isolierten Säuren:

Versuch I: Einwage: 48,0 mg + 492,1 mg gew. Adipinsäure  
D im Verbrennungswasser: 1,06 Atom-%  
D in der Säure: 11,89  $\pm$  0,04 Atom-%

Versuch II: Einwage: 57,3 mg + 519,2 mg gew. Adipinsäure  
D im Verbrennungswasser: 1,21  $\pm$  0,01 Atom-%  
D in der Säure: 12,15  $\pm$  0,07 Atom-%  
Einwage: 62,0 mg + 498,6 mg gew. Adipinsäure  
D im Verbrennungswasser: 1,31  $\pm$  0,01 Atom-%  
D in der Säure: 11,80  $\pm$  0,10 Atom-%

d) Fütterung von Deuterio-adipinsäure an Ratten.  
Hier wurde die Säure (10,14  $\pm$  0,06 Atom-% D) als Natriumsalz der Diät nach *Mc Collum* beigegeben und an zwei weisse männliche Ratten verfüttert (je 1,60 g innerhalb von 5 Tagen). Nach Tötung der Tiere mit Äther trennten wir Leber, Intestinaltraktus und Nieren ab und isolierten aus den Lebern und den Kadavern die Gesamt-Fettsäuren. Sie gelangten wie eine Probe der Körperflüssigkeit zur

D-Bestimmung. Die Harne beider Tiere haben wir zusammen aufgearbeitet.

**Tabelle XI.**  
Fütterung von Deuterio-Adipinsäure an Ratten.

Tier Nr.	Dauer Tage	Gewicht g		Leber		Fett- säuren aus Kadaver	Adipinsäure aus Harn			Äq.- Gew.
		vor Versuch	nach Versuch	g	mg Fett- säuren		g roh	g rein	Smp.	
1	5	255	255	11,0	141	17,31	1,240	0,845	149—150 <sup>0</sup>	73,1
2	5	190	200	10,7	110	12,91				

D-Bestimmungen in der isolierten Säure:

1. Einwage: 61,3 mg + 534,6 mg gew. Adipinsäure  
D im Verbrennungswasser:  $1,03 \pm 0,00$  Atom-%  
D in der Säure:  $10,04 \pm 0,00$  Atom-%
2. Einwage: 60,7 mg + 526,1 mg gew. Adipinsäure  
D im Verbrennungswasser:  $1,04 \pm 0,00$  Atom-%  
D in der Säure:  $10,10 \pm 0,00$  Atom-%

e) Fütterung von Deuterio-korksäure. Versuch I. Die Harnmenge von 5 Tagen (Hund B, Gewicht 13,63 kg) betrug nach 3 mal 1,0 g Säure ( $7,59 + 0,03$  Atom-% D)  $4230 \text{ cm}^3$ , die erhaltene rohe Korksäure 2,043 g. Nach Umkristallisieren aus heissem Wasser ergaben sich Krystalle von Smp.  $139^0$ , welche im Mischschmelzpunkt mit reiner Korksäure keine Erniedrigung zeigten. Äq.-Gew. 87,0; ( $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$  ber. 87,05). Ausbeute 1,771 g. Versuch II. Der 11,45 kg schwere Hund M erhielt  $3 \times 0,50$  g schwere Säure ( $7,59 + 0,03$  Atom-% D) und schied während des 4 Tage dauernden Versuches  $3110 \text{ cm}^3$  Harn aus. Ausbeute an roher Korksäure 1,007 g. Nach Umkristallisieren schmolz dieselbe bei  $138^0$ , Mischschmelzpunkt mit Korksäure  $138—139^0$ . Das Äq.-Gew. betrug 87,0, die Ausbeute 0,675 g.

D-Bestimmungen in den isolierten Säuren:

- Versuch I: 1. Einwage:  $83,4 \text{ mg} \pm 499,6 \text{ mg}$  gew. Korksäure  
D im Verbrennungswasser:  $1,08 \pm 0,00$  Atom-%  
D in der Säure:  $7,56 \pm 0,00$  Atom-%
2. Einwage:  $77,5 \text{ mg} + 489,8 \text{ mg}$  gew. Korksäure  
D im Verbrennungswasser:  $1,03 \pm 0,01$  Atom-%  
D in der Säure:  $7,56 \pm 0,08$  Atom-%

- Versuch II: 1. Einwage:  $64,2 \text{ mg} + 394,4 \text{ mg}$  gew. Korksäure  
D im Verbrennungswasser:  $1,04 \pm 0,01$  Atom-%  
D in der Säure:  $7,42 \pm 0,06$  Atom-%

f) Fütterung von Deuterio-sebacinsäure. Hund M (Gewicht 12,0 kg) bekam an zwei Tagen 1,5 g Deuterio-sebacinsäure ( $3,66 \pm 0,08$  Atom-%). Harnmenge des 4 Tage dauernden Versuches  $2375 \text{ cm}^3$ . Ausbeute an roher Dicarbonsäure 517 mg. Nach Umkristallisieren aus heissem Wasser resultierten neben Krystall-

gemischen 250 mg reine Sebacinsäure. Smp. 131°, Mischschmelzpunkt mit Sebacinsäure 132°. Äquivalentgewicht: Gef. 101,4, Ber. 101,1.

D-Bestimmungen in der isolierten Säure:

1. Einwage: 48,6 mg + 404,1 mg gew. Sebacinsäure  
D im Verbrennungswasser:  $0,38 \pm 0,00$  Atom-%  
D in der Säure:  $3,60 \pm 0,01$  Atom-%
2. Einwage: 48,0 mg + 404,0 mg gew. Sebacinsäure  
D im Verbrennungswasser:  $0,39 \pm 0,01$  Atom-%  
D in der Säure:  $3,69 \pm 0,07$  Atom-%

g) Fütterung von Deuterio-kork- und Decan-dicarbon-säure (Dodecan-di-säure). Der 12,07 kg schwere Hund M erhielt an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 0,5 g Deuterio-korksäure ( $7,73 \pm 0,14$  Atom-% D) und je 1 g Decan-dicarbonsäure (Smp. 127—28°). Die Aufarbeitung der 2755 cm<sup>3</sup> betragenden Harnmenge ergab in drei Fraktionen 1,267 g Krystalle mit Smp. von 132, 128 und 122°. Durch mehrmaliges Umkristallisieren dieser Dicarbon-säuregemische (Ausbeute bezogen auf die verfütterten Mengen C<sub>8</sub>- und C<sub>12</sub>-er Säuren: 28,2 %) aus Wasser-Alkohol und Wasser gewannen wir 238 mg reine Korksäure. Smp. 138—139°, Mischschmelzpunkt mit reiner Korksäure 139°. Äquivalentgewicht 87,1. Weitere Krystallfraktionen schmolzen bei 130, 131 und 133°.

D-Bestimmungen in der isolierten Säure:

- Einwage: 61,8 mg + 500,4 mg gew. Korksäure  
D im Verbrennungswasser: 0,81 Atom-%  
D in der Säure:  $7,34 \pm 0,05$  Atom-%

h) Fütterung von Deuterio-kork- und Tetradecan-di-carbonsäure (Hexadecan-disäure). Hund M (Gewicht 11,4 kg) bekam während 4 Tagen je 0,5 g Deuterio-korksäure ( $7,39 \pm 0,06$  Atom-% D) und je 1 g Tetradecanddicarbonsäure (Smp. 124°). Die Harnmenge von 5 Tagen (3425 cm<sup>3</sup>) ergab 922 + 501 = 1423 mg Krystalle vom Smp. 130 und 127°. Nach wiederholtem Umkristallisieren konnten 848 mg reine Korksäure erhalten werden. Smp. 139°, Mischschmelzpunkt mit Korksäure 139°. Das Äquivalentgewicht betrug 87,1. Anfallende Krystallgemische mit 136 und 118° Schmelzpunkt haben wir nicht weiter geprüft.

D-Bestimmungen in der isolierten Säure:

1. Einwage: 69,8 mg + 502,9 mg gew. Korksäure  
D im Verbrennungswasser:  $0,85 \pm 0,00$  Atom-%  
D in der Säure:  $7,00 \pm 0,00$  Atom-%
2. Einwage: 68,9 mg + 502,7 mg gew. Korksäure  
D im Verbrennungswasser:  $0,84 \pm 0,01$  Atom-%  
D in der Säure:  $7,00 \pm 0,10$  Atom-%

### Diskussion der Ergebnisse.

Beim Erhitzen von Dicarbonsäuren in schwerem Wasser bilden sich in Gegenwart von Natriumhydroxyd wohl infolge von zunehmen-

der Enolisierung Deuterio-dicarbonsäuren mit für biologische Versuche genügend hohen D-Gehalten. Der schwere Wasserstoff tritt in  $\alpha$ -Stellung in die Molekel ein, in der Bernsteinsäure ist der D-Gehalt am höchsten, in der Sebacinsäure am niedrigsten. Wie Kontrollversuche bewiesen, ist das Deuterium stabil gebunden. Beim Erhitzen der neutralisierten schweren Säuren in viel Wasser bleibt ihre Isotopenkonzentration erhalten. Umgekehrt nehmen Dicarbonsäuren als Natriumsalze in 5 Atom-% D-haltigem Wasser erhitzt, kein oder nur sehr wenig D auf. Damit sind die Voraussetzungen erfüllt, welche an für Stoffwechselversuche Verwendung findende Deuterio-Verbindungen gestellt werden müssen.

Belastungsversuche mit grossen Mengen Ammonium-succinat führten bei einem Hunde nicht zum Auftreten der Säure im Harn. Nach Fütterung von Deuterio-bernsteinsäure an Ratten war eine deutliche Anreicherung der Körperflüssigkeit an schwerem Wasserstoff feststellbar, ein weiterer Hinweis auf die rasche, völlige Verbrennung dieser Verbindung. Eine Umwandlung in Fettsäuren findet nicht statt, die Leberfettsäuren der Tiere enthielten nur sehr wenig D.

An Hunden und in einem Fall auch an Ratten durchgeföhrte Versuche ergaben in bezug auf die mengenmässige Ausscheidung von Adipin-, Kork- und Sebacinsäure eine Bestätigung früherer Befunde. Die D-Konzentration der schweren Verbindungen bleibt bei ihrem Durchgang durch den Tierkörper vollständig unverändert.

Adipinsäure wird auch von Ratten zu einem grossen Teil nicht ausgenutzt. Eine Ablagerung im Fettgewebe findet nach den D-Gehalten der aus den Depots isolierten Fettsäuren zu schliessen, nicht statt.

Da die Tiere gleichzeitig Fett erhielten und während der Versuche ihr Gewicht praktisch nicht änderten, darf ein normal verlaufender Fettabbau vorausgesetzt werden. Die Nahrung war zudem Kohlehydrat-reich, was nach *Verkade* und *van der Lee*<sup>1)</sup> Dicarbonsäureacidosis und Diacidurie begünstigt.

Mit Hilfe von Deuterium als Indikator gelang der eindeutige Beweis, dass die schwer verbrennlichen Dicarbonsäuren mit 6 bis 10 C-Atomen beim normalen Fettabbau in einem wesentlichen Ausmaße als Intermediärprodukte nicht gebildet werden. Die Behauptung *Verkade's*, dass alle gesättigten Fettsäuren über Dicarbonsäuren verbrennen, trifft nicht zu. Auf Grund von Tatsachen beurteilt, erleiden nach einer gewissen Überschwemmung des Organismus mit Fett, lediglich die Säuren mit 8—11 C-Atomen teilweise eine Methyloxydation zu entsprechenden Dicarbonsäuren. Für den Abbau un-

<sup>1)</sup> *Verkade, P. E., und J. van der Lee, Z. physiol. Ch.* **227**, 213 (1934).

gesättigter körpervertrauter Fettsäuren ist kein derartiger Beweis erbracht. Die Hauptbestandteile der Nahrungsfette, die Säuren mit 16 und 18 C-Atomen bewirken keine Diacidurie. Ihre Verbrennung erfolgt, wie die hier mitgeteilten Versuche mit Deuterio-Verbindungen beweisen, nicht durch  $\omega$ -Oxydation.

Der Abbau gesättigter Dicarbonsäuren durch (bilaterale)  $\beta$ -Oxydation ergibt sich aus dem Auftreten entsprechender niederer Homologer nach ihrer Verabreichung. *Emmrich* und *Emmrich-Glaser*<sup>1)</sup> isolierten nach Fütterung von Hexa- oder Tetradecan-dicarbonsäure aus den Hundeharnen 10,72 bzw. 2,90 % Sebacin-, Kork- und Adipinsäure. Ich beobachtete bei allerdings kleineren Dosen, welche zusammen mit schwerer Korksäure gegeben wurden, eine mässige Reduktion des D-Gehaltes der letzteren. Auch nach Fütterung von Thapsiasäure an den gleichen Hund enthielt der Harn nur sehr geringe Mengen von Dicarbonsäuren in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Verkade*, *van der Lee* und *van Alphen*<sup>2)</sup>. Es scheint daher, dass nur ein kleiner Teil dieser Verbindungen bilateral  $\beta$ -oxydiert wird und über niedrigere Dicarbonsäuren verbrennt. Nachdem eine Ablagerung auszuschliessen ist, bestehen mit grosser Wahrscheinlichkeit andere Abbauwege.

Die  $\beta$ -Oxydation *Knoop's* ist, solange keine experimentellen Befunde gegen sie vorliegen, die am besten gesicherte Vorstellung über den Abbau der Fette *in vivo*.

#### Zusammenfassung.

1. Zur Prüfung ihres Verhaltens im intermediären Stoffwechsel wurden Deuterio-dicarbonsäuren hergestellt und zusammen mit Fett an kohlehydratreich ernährte Hunde und Ratten verfüttert.

2. Deuterio-adipin-, -kork- und -sebacinsäure änderten dabei ihren D-Gehalt nicht. Da gleichzeitig durch Fettabbau gebildete Dicarbonsäuren zu einer Verdünnung der im Harnen auftretenden „schweren“ Verbindungen führen müssten, ist die Entstehung ersterer auszuschliessen.

3. Mit Hilfe des schweren Wasserstoffes als Indikator gelang somit der Nachweis, dass die normale Fettverbrennung praktisch nicht über Dicarbonsäuren als Intermediärprodukte führt. Die wichtigsten Komponenten der Nahrungsfette, die Säuren mit 16 und 18 C-Atomen werden nicht  $\omega$ -oxydiert.

4. *Verkade's* Theorie der Verbrennung aller gesättigter Fettsäuren durch  $\omega$ -Oxydation und anschliessende bilaterale  $\beta$ -Oxydation ist eine Verallgemeinerung eines nur für einige Fettsäuren mit bestimmter C-Zahl bewiesenen, in quantitativer Hinsicht un wesentlichen Abbauweges.

<sup>1)</sup> *Emmrich, R., und J. Emmrich-Glaser, Z. physiol. Ch.* **266**, 183 (1940).

<sup>2)</sup> *Verkade, P. E., J. van der Lee, A. J. S. van Alphen, Z. physiol. Ch.* **250**, 47 (1937).

5. Nach Fütterung von Deuterio-bernsteinsäure an Ratten enthalten die Leberfettsäuren praktisch keinen schweren Wasserstoff. Die Körperflüssigkeiten zeigten aber eine gewisse Anreicherung an D. Bernsteinsäure verbrennt, wie auch Belastungsversuche an einem Hund ergaben, rasch und vollständig. An Ratten verfütterte Adipinsäure wird nicht abgelagert.

6. Nach gemeinsamen Gaben von Tetradecan- oder Decan-dicarbonsäure und Deuterio-korksäure erfährt letztere eine gewisse Herabsetzung ihres D-Gehaltes. Dieser Befund bestätigt die beobachtete  $\beta$ -Oxydation jener Dicarbonsäuren, zeigt aber gleichzeitig, dass dieselben grösstenteils über andere Wege abgebaut werden.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung* an der Universität Zürich und solchen der *Rockefeller Foundation* in New York durchgeführt.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

---

### 160. Zur Kenntnis der Diterpene

(52. Mitteilung<sup>1</sup>).

#### Über das Chinonaddukt und die Permanganatoxydation der Lävo-pimarsäure

von L. Ruzicka und St. Kaufmann.

(I. XI. 41.)

Vor kurzem berichteten wir über die Ozonisation und die Permanganatoxydation des Maleinsäure-anhydrid-Adduktes der Lävo-pimarsäure<sup>2</sup>). Die dabei erhaltenen Resultate waren für die genaue Festlegung der Lage der konjugierten Doppelbindungen im Ringe B der Lävo-pimarsäure nicht verwertbar. Dagegen führte die Ozonisation<sup>3</sup>) des aus dem Maleinsäure-anhydrid-Addukt der Lävo-pimarsäure erhältlichen Methylesters zu einer Reihe gut krystallisierter und charakterisierter Abbauprodukte, die mit grosser Wahrscheinlichkeit für die Formel I der Lävo-pimarsäure sprechen<sup>4</sup>). In zweiter Linie wäre die Formel II in Betracht zu ziehen, die auf Grund der Ergebnisse der Ozonisation nicht ausgeschlossen werden konnte,

<sup>1</sup>) 51. Mitt. Helv. **24**, 1389 (1941).

<sup>2</sup>) Ruzicka und La Lande jr., Helv. **23**, 1357 (1940).

<sup>3</sup>) W. Sandermann, B. **74**, 153 (1940), schreibt: „Die Ozonisation ist für das Gebiet der Harzsäuren wenig geeignet“. Gerade das oben erwähnte Beispiel, wie auch die kürzlich von Ruzicka, Bernold und Tallichet, Helv. **24**, 223 (1941), beschriebene Einwirkung von Ozon auf Agathen-disäure zeigt, dass auch diese Methode gelegentlich wertvolle Resultate auf dem Gebiete der Polyterpene liefern kann.

<sup>4</sup>) Ruzicka und Kaufmann, Helv. **23**, 1357 (1940).