

170,5° (*A. C. Bratton* und *J. R. Bailey*<sup>1)</sup> geben 168,5—169,5° an). Für die Analyse wurde 24 Stunden im Hochvakuum bei 65° getrocknet.

3,929 mg Subst. gaben 6,706 mg CO<sub>2</sub> und 1,291 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub> Ber. C 46,43 H 3,60%

Gef. „ 46,58 „ 3,68%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Herrn *W. Manser* ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn.  
Hochschule, Zürich.

### 136. Fettstoffwechsel-Untersuchungen mit Hilfe von Deuterium als Indikator. I. Zur Frage der lebensnotwendigen Fettsäuren

von *Karl Bernhard*, *Heidi Steinhauser* und *François Bullet*.

(12. IX. 42.)

Wird bei Tieren durch Zufuhr von schwerem Wasser eine Anreicherung der Körperflüssigkeiten an Deuteriumoxyd erzielt, so enthalten nach kurzer Zeit sowohl Fett- als auch Aminosäuren stabil gebundenes Deuterium (*Schoenheimer* und *Rittenberg*).

Bei Kohlenhydrat-reich, aber praktisch fettfrei ernährten Mäusen weisen unter solchen Bedingungen Stearin- und Palmitinsäure analoge Deuterium-Mengen auf<sup>2)</sup>. Obwohl die letztere gegenüber der ersteren stark vermehrt vorkommt, werden beide Verbindungen im gleichen Ausmasse auf- und abgebaut. Anders verhalten sich die ungesättigten Säuren. Wie *Bernhard* und *Schoenheimer*<sup>3)</sup> zeigten, sind aus den Körperfetten isolierte Linol- und Linolensäure Deuterium-frei. Der Organismus (Maus) ist zu ihrer Synthese nicht fähig.

Schon 1929 beobachteten *Burr* und *Burr*<sup>4)</sup> bei fettfrei ernährten Ratten nach 70—80 Tagen schwere Hautveränderungen, später Wachstumsstillstand, Gewichtsverlust und Tod. Diese Erscheinungen liessen sich durch Fütterung von Linol-<sup>5)</sup> und Linolensäure<sup>6)</sup> beheben. Ölsäure erwies sich als wirkungslos. Das Auftreten einer spezifischen, durch bestimmte ungesättigte Fettsäuren heilbaren Mangelkrankheit bei stetiger „fettfreier“ Kost wurde ausser von *Evans* und *Lepkovsky*<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup> *Am. Soc.* **59**, 175 (1937).

<sup>2)</sup> *K. Bernhard* und *R. Schoenheimer*, *J. Biol. Chem.* **133**, 713 (1940).

<sup>3)</sup> *K. Bernhard* und *R. Schoenheimer*, *J. Biol. Chem.* **133**, 707 (1940).

<sup>4)</sup> *G. O. Burr* und *M. M. Burr*, *J. Biol. Chem.* **82**, 345 (1929).

<sup>5)</sup> *G. O. Burr* und *M. M. Burr*, *J. Biol. Chem.* **86**, 587 (1930); *L. G. Wesson* und *G. O. Burr*, *J. Biol. Chem.* **91**, 525 (1931).

<sup>6)</sup> *G. O. Burr*, *M. M. Burr* und *E. S. Miller*, *J. Biol. Chem.* **97**, 1 (1932).

<sup>7)</sup> *H. M. Evans* und *S. Lepkovsky*, *J. Biol. Chem.* **96**, 143 (1932).

auch durch andere Autoren bestätigt. Nach *Hume*<sup>1)</sup> besitzt auch Arachidonsäure kurative Wirkung. In der Folge wurden gewisse höher ungesättigte Fettsäuren als „essential fatty acids“, von einigen Autoren auch als „Vitamin F“ bezeichnet.

Ratten erkrankten bei Vitamin B<sub>6</sub>-Mangel wie *György*<sup>2)</sup> nachwies, an einer spezifischen, Akrodynie-ähnlichen Dermatitis. *Birch* und *György*<sup>3)</sup> heilten sie mit gewissen Fetten, *Birch*<sup>4)</sup> durch Fütterung von Adermin und Maisöl, *Steenbock*<sup>5)</sup> mit Linolsäure oder Maisöl.

Weitere Untersuchungen von *Schneider*, *Steenbock* und *Platz*<sup>6)</sup> über Akrodynie und *Burr*'sches Syndrom ergaben, dass beide unabhängig vom Vitamin B<sub>6</sub> durch die „essential fatty acids“ behoben werden. Heilung erzielten diese Autoren ferner durch ein Reiskleie-Konzentrat, das neben B<sub>6</sub> einen weiteren „accessory factor“ enthielt. Fehlt letzterer, so soll die Wirkung von reinem Adermin nur temporärer Art sein. Nach *Salmon*<sup>7)</sup> verschwindet bei Ratten die schwere, nach fettfreier Diät auftretende Dermatitis nur völlig durch drei Faktoren: Pyridoxin, Linol- und Pantothersäure. Zu analogen Beobachtungen gelangten *Richardson* und *Hogan*<sup>8)</sup>. Andererseits sind, wie andere Autoren hervorheben<sup>9)</sup>, ausser Linolsäure und Vitamin E keine weiteren fettlöslichen Verbindungen für das normale Wachstum und die Fortpflanzung bei Ratten notwendig.

Alle diese zum Teil kontradiktorischen Ergebnisse wurden durch Fütterungsversuche erhalten. Für den Menschen liegen in dieser Richtung einstweilen kaum gesicherte Beobachtungen vor. Bei der grossen Bedeutung der Fette für die menschliche Ernährung ist die Frage nach ihrer biologischen Wertigkeit gerade gegenwärtig von besonderer Wichtigkeit.

Mit Deuterium als Indikator lässt sich die Fähigkeit des Tierkörpers zur Fettsynthese beweisen. In dieser Arbeit haben wir unsere Versuche über das Verhalten der Linol- und Linolensäure<sup>10)</sup> auf Ratten ausgedehnt. In einigen Fällen prüften wir einen etwaigen Einfluss von Vitamin B<sub>6</sub> auf den Auf- und Abbau dieser ungesättigten Fettsäuren. Nach *McHenry*<sup>11)</sup> soll bei der Ratte die Fettbildung aus Eiweiss nur in Gegenwart des Pyridoxins erfolgen.

<sup>1)</sup> E. M. Hume, L. C. A. Nunn, I. Smedley-Maclean und H. Henderson Smith, Biochem. J. **34**, 879 (1940).

<sup>2)</sup> P. György, Biochem. J. **29**, 741 (1935).

<sup>3)</sup> T. W. Birch und P. György, Biochem. J. **30**, 304 (1936).

<sup>4)</sup> T. W. Birch, J. Biol. Chem. **124**, 775 (1938).

<sup>5)</sup> F. W., Quackenbush, B. R. Platz und H. Steenbock, J. Nutrition **17**, 115 (1939).

<sup>6)</sup> H. Schneider, H. Steenbock und B. R. Platz, J. Biol. Chem. **132**, 539 (1940).

<sup>7)</sup> D. W. Salmon, J. Biol. Chem. **140**, cix (1941).

<sup>8)</sup> L. R. Richardson, und A. G. Hogan, J. Biol. Chem. **140**, cvi (1941).

<sup>9)</sup> C. G. Mackenzie, J. B. Mackenzie und E. V. McCollum, Biochem. J. **33**, 935 (1939).

<sup>10)</sup> K. Bernhard und R. Schönheimer, J. Biol. Chem. **133**, 707 (1940).

<sup>11)</sup> E. W. McHenry und G. Gavin, J. Biol. Chem. **138**, 471 (1941).

Zehn männliche weisse Ratten wurden zur Erreichung einer nützlichen Deuterium-Konzentration der Körperflüssigkeit mit schwerem Wasser versehen und verschieden lang Kohlenhydrat-reich und weitgehend fettfrei ernährt. Die Tiere Nr. 7—10 erhielten täglich ca. 150  $\gamma$  Adermin dem Futter beigemischt.

Nach Beendigung der Versuche isolierten wir aus den Kadavern nach Entfernung gewisser Organe die Fettsäuren. Einen kleinen Teil derselben verwendeten wir zur Gewinnung von Palmitin- und Stearinsäure, die Hauptmenge bromierten wir in Petroläther, um die Linol- und Linolensäure abzutrennen. Die unlöslichen Bromide bestanden fast ganz aus Tetrabrom-stearinsäure, in einigen Fällen daneben auch aus wenig Hexabromiden. Diese Verbindungen prüften wir auf ihren Gehalt an schwerem Wasserstoff. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle I ersichtlich.

**Tabelle I.**

D-Gehalte der Gesamtfettsäuren, der Linolsäure und der Hexabromide aus den Kadavern von Ratten bei Kohlenhydrat-reicher, fettfreier Fütterung mit und ohne Vitamin B<sub>6</sub>.

Tier Nr.	Dauer des Versuches Tage	Atom % Deuterium			
		Körper- wasser	Fett- säuren	Linol- säure	Hexa- bromide
1	3	1,02	0,09	0,00	—
2	3	1,04	0,06	0,00	—
3	6	2,48	0,40	0,00	0,01*
4	6	2,52	0,58	0,00	
5	9	2,32	0,21	0,00	—
6	12	2,36	0,23	0,01	—
7	9	2,02	0,33	0,02	0,02**
8	9	2,10	0,40	0,02	
9	21	1,90	0,58	0,01	
10	21	1,58	0,42	0,01	

Tiere Nr. 7—10: pro die 150  $\gamma$  Adermin.

\* Von Tier Nr. 3 und 4; \*\* von Tier Nr. 7 und 8.

### Experimentelles.

Die Versuchstiere, männliche, weisse Ratten, wurden entweder zu zweit im gleichen Käfig in einem Thermostaten bei 22° oder in Einzelkäfigen bei Zimmertemperatur (16—22°) gehalten. Sie bekamen als alleinige Nahrung getrocknetes Brot, das mit Äther erschöpfend extrahiert und zusätzlich mit etwas Calciumcarbonat nach *McCollum* versetzt wurde. Für die Tiere 1—8 diente das zu Beginn des Krieges hergestellte Volksbrot, später das jetzt erhältliche Schwarzbrot von hohem Ausmahlungsgrad. Tägliche Mengen 20—35 g. Reines Adermin von *Merck* haben wir in wässriger Lösung dem Futter beigegeben. Die Deuterium-Konzentration des Trinkwassers betrug bei allen Ver-

suchen 5 Atom % D. Den Tieren 1—8 wurden zur raschen Anreicherung 2—5 cm<sup>3</sup> 99,8-proz. schweres Wasser subcutan injiziert.

Die Tötung der Ratten erfolgte mit Äther. Nach Entfernung von Leber, Nieren und Darmtraktus zerkleinerten wir den verbleibenden Kadaver und brachten ihn in methanolische Kalilauge (250 g KOH, 250 g Methanol, 500 g Wasser). Innerhalb von 2—3 Tagen löst er sich bereits bei Zimmertemperatur weitgehend auf. Nach zweistündigem Erwärmen am Rückfluss filtrierten wir die zurückbleibenden Knochen über Glaswolle ab und verdünnten mit viel Wasser. Das Unverseifbare gewannen wir in üblicher Weise durch Ausschütteln mit Petroläther, wobei wir Emulsionen in einer Winkelzentrifuge zerstörten. Nach Ansäuern mit Salzsäure extrahierten wir im Scheidetrichter wiederholt mit Äther und engten diesen nach Auswaschen mit Wasser und Trocknen mit Natriumsulfat ein. Einen aliquoten Teil der Fettsäuren brachten wir auf dem Wasserbad im Stickstoffstrom zur Gewichtskonstanz und bestimmten die Jodzahl (vgl. Tabelle II).

Tabelle II.

Tier Nr.	Gewicht der Tiere				Fettsäuren	
	vor Versuch	nach	Differenz		Gew. g	JZ
			g	%		
1	298	297	— 1	0,4	14,74	92,3
2	300	292	— 8	2,7	12,68	96,0
3	248	262	+ 14	5,5	21,21	75,7
4	237	253	+ 16	6,8	15,73	75,2
5	360	365	+ 5	1,4	22,27	71,2
6	337	280	— 57	17,0	10,47	82,4
7	233	233	0		11,40	81,3
8	222	211	— 11	5,0	7,79	85,5
9	284	276	— 8	2,8	21,34	82,7
10	277	275	— 2	0,7	20,27	91,1

Die Hauptmenge der Fettsäuren wurde bromiert. Zur Lösung in reinem Petroläther fügten wir bis zur Sättigung in Petroläther gelöstes Brom und filtrierten nach längerem Stehen im Kühlschrank die ausgefallenen, meist weissen Bromide ab. Nach erfolgter Gewichtskonstanz und Schmelzpunktsbestimmung behandelten wir diese zur Abtrennung etwaiger Hexa- und Oktabromide mit heissem Benzol. Durch nochmaliges Umkrystallisieren aus heissem Ligroin erhielten wir reine Tetrabromide, welche im Mischschmelzpunkt mit Tetrabromstearinsäure keine Erniedrigung ergaben (Tabelle III).

Hexabromide wurden, wie aus Tabelle IV ersichtlich ist, nur in vier Fällen aus den Benzol-unlöslichen Rückständen erhalten. Einen Smp. von 179°, wie er der 9:10, 12:13, 15:16-Hexabromstearinsäure aus  $\alpha$ -Linolensäure entspricht, beobachteten wir nur bei einem Präparat, alle übrigen schmolzen scharf bei tieferer Temperatur. Je zwei

dieser Proben mussten infolge der geringen Substanzmengen für die Deuterium-Analyse vereinigt werden.

Tabelle III.

Tier Nr.	in Petroläther unlösl. Bromide		Tetrabromide	
	g	Schmelzpunkt	Smp.	% Br
1	2,761	2 Frakt. 104 u. 133°	114°	53,38
2	2,625	2 Frakt. 109 u. 128°	113°	53,34
3	3,484	112°	114°	53,15
4	2,484	114°	114°	53,21
5	—	112°	113°	53,61
6	1,338	109°	113°	53,32
7	1,222	bei 210° schwarz werdend	114°	53,51
8	0,952	bei 190° schwarz werdend	114°	53,56
9	4,959	114° und 116°	114°	53,30
10	5,568	bei 185° schwarz werdend	114°	53,49

Berechnet für  $C_{18}H_{32}O_2Br_4$ : 53,31% Br.

Tabelle IV.

Tier Nr.	Bromide		
	mg	Smp.	% Br
3	179	158°	63,80
4	200	168°	63,51
7	159	170°	63,76
8	158	179°	63,55

Berechnet für  $C_{18}H_{30}O_2Br_6$ : 63,32% Br.

Höhere Bromide mit 70,44, 73,25, 73,42 und 73,72 % Br fanden wir bei unscharf unter Schwarz-werden über 200° schmelzenden Fraktionen, deren weitere Reinigung nicht gelang. Die Mengen betrugen dabei meist weniger als 200 mg.

### Diskussion der Ergebnisse.

Nach Gaben von schwerem Wasser an Ratten während 3, 6, 9, 12 und 21 Tagen enthielten die Gesamtfettsäuren aus den Körperfetten der Tiere, bei einer Anreicherung der Körperflüssigkeiten an Deuteriumoxyd von 1,02—2,52 %, 0,06—0,58 Atom % Deuterium. In allen Fällen war die als Tetrabromid isolierte  $\alpha$ -Linolsäure Deuterium-frei. Einige Male konnten auch Hexabromide der Linolensäure erhalten und auf ihren Gehalt an schwerem Wasserstoff untersucht werden. Auch hier hielten sich die Werte innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode (+ 0,01 %). Frühere Befunde an Mäusen wurden also an Ratten bestätigt, Linol- und Linolensäure vermag der Tierkörper nicht aufzubauen. Vitamin B<sub>6</sub> zum Kohlenhydrat-reichen Futter gegeben ist ohne Einfluss

auf diese Tatsache. Ob dem Adermin vielleicht eine einsparende Wirkung auf die höher ungesättigten Fettsäuren zukommt, liesse sich nur an einem grössern Versuchsmaterial beweisen.

Unsere Tiere wurden mit extrahiertem Brot gefüttert. Dies ist zwar keine fettfreie Diät, doch gelingt es durch erschöpfende Extraktion mit Äther den grössten Teil des Brotfettes zu entfernen. Das verwendete Futter enthielt auch etwas Eiweiss und an Vitaminen vor allem Aneurin. Unsere Versuche wurden alle mit normal gefütterten Tieren begonnen und waren von kurzer Dauer, so dass Vitaminschäden nicht auftraten. Selbst nach 21-tätiger Fütterung ergab die Obduktion der Ratten völlig normale Befunde.

Berechnet man aus den in Petroläther schwerlöslichen Bromiden die Menge der Linolsäure, so ergeben sich unter der Voraussetzung, dass erstere nur aus Stearinsäure-tetrabromid bestehen,  $\alpha$ -Linolsäuregehalte von 4,9—12,1 % bezogen auf die Menge der Gesamtfettsäuren (Tabelle V).

Tabelle V.

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% Linolsäure . .	8,9	9,6	7,7	7,4	—	6,0	4,9	5,7	10,6	12,1

Dabei ist die  $\beta$ -Linolsäure nicht berücksichtigt. Trotzdem handelt es sich um einen merklichen Anteil der Fettsäuren des Körperfettes. Es scheint uns daher unangebracht, für die Linolsäure die Bezeichnung Vitamin F zu verwenden, da Vitamine in viel kleinern Mengen wirksam sind. Der Ausdruck „lebensnotwendige Fettsäuren“ (*Burr* und *Burr*) ist in Analogie zu den lebensnotwendigen Aminosäuren richtiger. Die Linolensäure ist prozentual viel weniger als die Linolsäure verbreitet. Bei einigen Tieren gelang ihr Nachweis überhaupt nicht. Vielleicht wird sie rascher verbraucht als die Linolsäure.

#### Zusammenfassung.

Mit Hilfe von Deuterium als Indikator wurde bewiesen, dass die Ratte bei Kohlenhydrat-reicher Diät Linol- und Linolensäure auch bei täglichen Gaben von ca. 150  $\gamma$  Adermin nicht zu synthetisieren vermag. Diese ungesättigten Säuren müssen im Sinne exogener Wirkstoffe mit der Nahrung zugeführt werden. Die Bezeichnung Vitamin F ist unzweckmässig, besser spricht man von „lebensnotwendigen Fettsäuren“.

Der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung* an der Universität Zürich sind wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.