

111. Der Abbau der Behensäure im Tierkörper
von Karl Bernhard und Ernst Vischer.

(11. V. 46.)

Der β -oxydative Abbau unverzweigter Fettsäuren im Tierkörper wurde auf Grund des Verhaltens phenylsubstituierter Monocarbon-säuren bereits 1905 von *Knoop* festgestellt und in der Folge durch verschiedene Autoren für zahlreiche, allerdings gleichfalls körperfremde Verbindungen bestätigt. Nach der ursprünglichen Auffassung bildet sich dabei pro 1 Mol Fettsäure durch sukzessive Abspaltung von C₂-Bruchstücken 1 Mol β -Oxybuttersäure bzw. Acetessigsäure. Untersuchungen über die Oxydation normaler Fettsäuren durch Leberschnitte unter quantitativer Erfassung der entstehenden Keto-körper ergaben indessen weit höhere Mengen an diesen Intermediär-produkten. *Jowett* und *Quastel*¹⁾, *Deuel* und Mitarbeiter²⁾, *Blixenkrone-Möller*³⁾, ferner *Stadie* und Mitarbeiter⁴⁾ versuchten diese Tatsache durch multiple alternative Oxydation zu erklären, eine Vorstellung, die auf *Hurtley*⁵⁾ zurückgeht. Darnach würde eine Fettsäure mit gerader C-Zahl nicht in C₂-Bruchstücke, sondern direkt in C₄-Körper zerfallen.

Das β -oxydativ von den Fettsäuren abgespaltene C₂-Bruchstück verhält sich wie eine Essigsäure-Molekel. *Bernhard* und *Stein-hauser*⁶⁾ konnten durch Verabreichung von Deuterio-essigsäure den Nachweis erbringen, dass im Tierkörper stattfindende Acetylierungen von Aminen unter Beteiligung der Essigsäure erfolgen. Besonders ausgeprägt war dies der Fall bei Gaben von Deuterio-äthanol, welches über Essigsäure abgebaut wird. *Bloch* und *Rittenberg*⁷⁾ verfütterten an Ratten signierte Butter-, n-Valerian- und Myristinsäure gleichzeitig mit Phenyl-aminobuttersäure und fanden in allen Fällen im Harn der Tiere Acetyl-phenyl-aminobuttersäure mit D-haltiger Acetylgruppe. Es darf nach Versuchen, die *Swendseid* und Mitarbeiter⁸⁾ unter Benützung von isotopem Kohlenstoff durchführten, als ge-

¹⁾ *M. Jowett and J. H. Quastel*, Biochem. J. **29**, 2159 (1935).

²⁾ *H. J. Deuel jr., L. F. Hallman, J. S. Butts and S. Murray*, J. Biol. Chem. **116**, 621 (1936).

³⁾ *N. Blixenkrone-Möller*, Z. physiol. Ch. **252**, 117, 137 (1938); **253**, 261 (1938).

⁴⁾ *W. C. Stadie, J. A. Zapp jr. and F. D. W. Lukens*, J. Biol. Chem. **137**, 75 (1941).

⁵⁾ *W. H. Hurtley*, Quart. J. Med. **9**, 301 (1915).

⁶⁾ *K. Bernhard*, Z. physiol. Ch. **267**, 91, 99 (1940); *K. Bernhard und H. Stein-hauser*, Z. physiol. Ch. **273**, 31 (1942).

⁷⁾ *K. Bloch and D. Rittenberg*, J. Biol. Chem. **155**, 243 (1944).

⁸⁾ *E. M. Swendseid, R. H. Barnes, A. Hemingway and A. O. Nier*, J. Biol. Chem. **142**, 47 (1942).

sichert gelten, dass Essigsäure im Tierkörper zu Acetessigsäure kondensiert werden kann. *Weinhouse, Medes und Floyd¹⁾* gaben zu Rattenleber-Schnitten eine Lösung des Natriumsalzes einer Octansäure, deren Carboxyl-Kohlenstoff einen bekannten Gehalt an C¹⁸ aufwies. In der nach Bebrütung erhaltenen Acetessigsäure war das schwere Kohlenstoffisotop gleichmäßig auf die C-Atome der Carbonyl- und der Carboxylgruppe verteilt. Der Ketokörper hat sich also durch Kondensation des β -oxydativ abgespaltenen C₂-Bruchstückes gebildet; aus dem vermehrten Auftreten von β -Oxybuttersäure bzw. Acetessigsäure darf nicht auf multiple alternative Oxydation der C-Kette geschlossen werden.

Den β -oxydativen Abbau natürlicher Fettsäuren im Tierkörper bewiesen mit Hilfe der Isotopentechnik erstmalig *Schoenheimer und Rittenberg*: aus den Fettdepots von Mäusen nach vorangehender Fütterung von Deuterio-stearinsäure-ester isolierte Palmitinsäure war D-haltig²⁾.

Es war wünschenswert, das Verhalten noch längerer C-Ketten zu prüfen. Die Fettsäuren des im Kriege in vermehrtem Ausmasse zu Ernährungszwecken wieder herangezogenen Rapsöls bestehen bekanntlich zu etwa 50 % aus der 22 C-Atome aufweisenden, ungesättigten Erucasäure, $\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{CH}=\text{CH} \cdot (\text{CH}_2)_{11} \cdot \text{COOH}$. Wir haben diese Komponente abgetrennt und mit schwerem Wasserstoff hydriert. So hergestellte Behensäure, $\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{20} \cdot \text{COOH}$ enthielt 3,0 Atom-% Deuterium. Sie wurde als Äthylester mit gleichviel Olivenöl in einem Ausmasse von 10 % (5 % Ester und 5 % Öl) einem normalen Futter beigemischt und an 4 Ratten (Nr. 1–4) verfüttert. Zwei der Tiere (Nr. 1 und 2) hungerten drei Tage vor dem Versuch. Obwohl der Schmelzpunkt des Fettgemisches nur 40–43° betrug, wurden im Mittel lediglich 37 % oder 2,56 g der angebotenen Säure pro Tier resorbiert. Zwei weitere Ratten (Nr. 5 und 6), von denen wieder die eine (Nr. 5) vor dem Versuche hungrte, erhielten ein Normalfutter, dem 10 % Behensäure-äthylester (Smp. 48°), aber kein weiteres Fett beigegeben wurde. Die Resorption betrug im Mittel 40 %, d. h. es wurden pro Tier 2,68 g Behensäure aufgenommen.

Nach 8 bzw. 7 Tagen töteten wir die Ratten und gewannen nach Abtrennung der Leber und des Intestinal-Tractus die Fettsäuren. Dieselben trennten wir über die Bleisalze in feste und flüssige Anteile und unterwarfen erstere als Methylester in der von *Schoenheimer und Rittenberg²⁾* beschriebenen Kolonne der fraktionierten Destillation. Aus den Fettsäuren eines jeden Tieres gelang die Isolierung reiner Stearin- und Palmitinsäure; Myristinsäure erhielten wir nur aus den vereinigten tiefstiedenden Fettsäure-ester-Fraktionen aller Ratten. Aus

¹⁾ *S. Weinhouse, G. Medes and N. F. Floyd, J. Biol. Chem. 155, 143 (1944).*

²⁾ *R. Schoenheimer and D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 120, 155 (1937).*

den flüssigen Säuren gewannen wir die Ölsäure als p-Phenylphenacyl-ester.

Die D-Konzentration des Körperwassers betrug 0,02 (Ratten Nr. 1–4) bzw. 0,03 Atom-% (Ratten Nr. 5 und 6). Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass nach Fütterung der signierten Behensäure aus

Tabelle 1.

Ratte Nr.	Atom-% D der						
	Gesamt- Fett- säuren	festen Fett- säuren	flüssigen Fett- säuren	Stearin- säure	Palmitin- säure	Myristin- säure	Ölsäure
1	0,08	0,20	0,06	0,47	0,07		0,09
2	0,08	0,21	0,03	0,48	0,10	0,06	0,08
3	0,05	0,15	0,04	0,30	0,07		0,04
4	0,04	0,11	0,02	0,31	0,07		0,04
5	0,12	0,28	0,07	} 0,39	} 0,06		0,08
6	0,04	0,10	0,04			—	0,04

den Körperfetten isolierte Stearin-, Palmitin-, Myristin- und Ölsäure schweren Wasserstoff enthalten. Die höchsten D-Werte wies die Stearinsäure auf, da sich die Verdünnung durch bereits vorhandene oder anderweitig entstehende Stearinsäure viel weniger auswirkt als im Falle der Palmitinsäure, welche ja die Hauptkomponente der gesättigten Fettsäuren des Depotfettes darstellt. Der D-Gehalt der Ölsäure ist naturgemäß niedriger als derjenige der Stearinsäure, aus welcher sie durch Dehydrierung gebildet wurde. Zudem tritt die Verdünnung durch Ölsäure anderer Herkunft stark in Erscheinung.

Arachinsäure war im Fettsäure-Gemisch wohl nur in sehr geringen Mengen enthalten, deren Isolierung nicht gelang. Während nach reichlicher Fütterung von Rapsöl im Depotfett Erucasäure abgelagert wird, fand eine merkliche Speicherung der Behensäure nicht statt. Aus den vereinigten hochsiedenden Fettsäure-estern aller Tiere erhielten wir nur 100 mg einer nicht reinen Behensäure mit 1,9 Atom-% D. Fettsäuren mit weniger als 14 C-Atomen sind bekanntlich nur sehr geringfügig am Aufbau der Körperfette beteiligt.

Die Organe, Leber und Intestinaltractus, wurden gesondert aufgearbeitet. Die erhaltenen Fettsäuremengen, deren D-Werte aus der Tabelle 2 ersichtlich sind, waren bei den Tieren Nr. 5 und 6 nur klein.

Sowohl aus den vereinigten Leberfettsäuren als den vereinigten Darmfettsäuren konnten D-haltige Stearin-, Palmitin- und Ölsäure gewonnen werden.

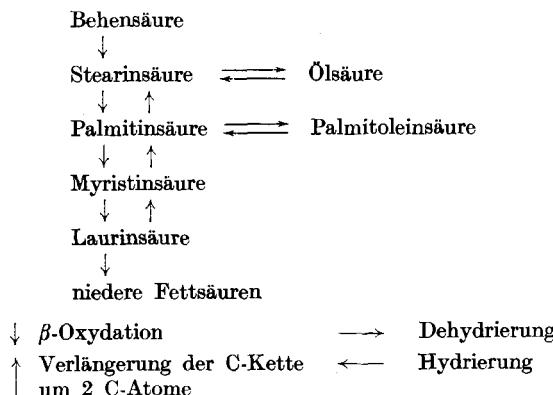
Der β -oxydative Abbau der Behensäure im Tierkörper ist somit unter Anwendung von Deuterium als Indikator bewiesen.

Tabelle 2.

Tier Nr.	Atom-% D in den Gesamt-Fettsäuren aus	
	Leber	Magen- Darm- tractus
1 und 2	0,19	0,15
3 und 4	0,18	0,06
5 und 6	0,25	0,20

Bereits *Stetten* und *Schoenheimer*¹⁾ fanden nach Fütterung von Deuterio-palmitinsäure an Ratten bei der Aufarbeitung der Fettbestände Deuterio-stearinsäure. Die Verlängerung der Fettsäurekette um je 2 C-Atome bewies weiterhin *Klem*²⁾ durch Verabreichung von D-haltiger Laurin- und Myristinsäure als Triglyceride an weibliche Ratten. Aus den Fettsäuren der Versuchstiere gelang im ersten Fall die Isolierung schweren Wasserstoff aufweisender C₁₄-Säure, im zweiten Fall die Gewinnung signierter Palmitinsäure. Männliche Ratten, welche ein Nahrungs-fett aus Deuterio-laurinsäure und Caprylsäure aufnahmen, zeigten sich auf Grund der Analysen des Depotfettes zur Synthese von C₁₄-, C₁₆- und C₁₈-Säuren aus der verfütterten C₁₂-Säure befähigt.

Das Stoffwechselverhalten der natürlichen Fettsäuren im Tierkörper lässt sich somit durch das folgende Schema darstellen:



Andere Abbauwege sind mit Ausnahme der ω -Oxydation *Verkade's*, der wir als speziellen Fall einer Methyloxydation jedenfalls in quantitativer Hinsicht keine wesentliche Bedeutung beimesse[n] können, für die Fettsäuren nicht bewiesen.

¹⁾ *De Witt Stetten jr. and R. Schoenheimer, J. Biol. Chem.* **133**, 329 (1940).

²⁾ *A. Klem, Fette und Seifen* **51**, 184 (1944).

Experimenteller Teil.

(Mitbearbeitet von cand. med. Hans Edelmann.)

Herstellung der Deuterio-behensäure.

Aus Rapsöl isolierte Erucasäure (Smp. 33—34°, Äq.-Gew. 335,6, J. Z. 74,0) hydrierten wir in ätherischer Lösung mit Deuterium unter Verwendung von Platinoxyd. Die Behensäure fiel aus und wurde aus Eisessig umkristallisiert. Smp. 80,5—81,5°. Äq.-Gew. 341,4 (Ber. $C_{22}H_{24}O_2$: 340,35). D-Gehalt: 3,08, 3,04, 2,98 und 2,96 Atom-%.

Die Hydrierung in Eisessig gelöster Erucasäure führte zu nur 0,83 Atom-% D-haltiger Behensäure.

Der durch Veresterung mit Äthanol erhaltene Äthylester der Behensäure schmolz bei 50—51°.

Tierversuche.

Die Tiere Nr. 1—4 (männliche weisse Ratten in Einzelkäfigen) erhielten in Anlehnung an die Angaben von Stetten und Schoenheimer¹⁾ ein Grundfutter aus 65% gemahlenem Weizen, 22,5% extrahiertem Casein, 6,25% Salzen und 6,25% Hefetrockenextrakt und dazu 10% des Behensäure-äthylester-Olivenöl-Gemisches. Ferner wurden pro Tier und Tag 10 mg Cholin zugefügt. Das Futter wurde in Form kleiner Brötchen gegeben. Jedes Tier bekam innerhalb 8 Tagen 15 g Fett bzw. 7,5 g Behensäure-äthylester, d. h. pro Tag und kg Körpergewicht (im Mittel 279, 271, 282, 294 g) 3,36, 3,46, 3,33 und 3,19 g Behensäure-äthylester. Ratten Nr. 1 und 2 hungrerten 3 Tage vor Beginn des Versuches; Nr. 3 und 4 haben wir zuvor mit einer Normal-Diät nach McCollum ernährt.

Als Futter der Ratten Nr. 5 und 6 benützten wir ein Gemisch aus 67,5% gemahlenem Weizen, 15% Casein, 10% Vollmilchpulver, 0,8% Kochsalz und 1,5% $CaCO_3$. Zu 135 g desselben fügten wir 15,0 g Behensäure-äthylester, 0,22 g Cholsäure (mit Natronlauge neutralisiert) und pro Tier und Tag 10 mg Cholin. Jede Ratte erhielt während 7 Tagen 75 g dieser Nahrung, also 7,5 g oder pro Tag und kg Körpergewicht (im Mittel 202 bzw. 188 g) 5,30 bzw. 5,70 g Behensäure-äthylester.

Das Futter wurde gut gefressen, Störungen konnten nicht beobachtet werden. Die Faeces haben wir quantitativ gesammelt und daraus die Fettsäuren gewonnen. Auf Grund der D-Analyse liess sich ihr Gehalt an Behensäure berechnen. Wir werden auf diese Befunde in einer anderen Arbeit zurückkommen.

Nach Beendigung der Versuche haben wir die Ratten mit Äther getötet und Leber sowie Magen-Darm-Tractus sorgfältig abgetrennt. Die Tierkörper wurden einzeln, die Organe von je zwei Tieren zusammen in methanolische Kalilauge gebracht und wie üblich auf Fettsäuren aufgearbeitet. Aus Tabelle 3 sind die erhaltenen Mengen, ferner die Gewichte der Tiere ersichtlich.

Tabelle 3.

Tier Nr.	Gewicht der Tiere (g)		Tierkörper*)			g Fettsäuren aus	
	vor Versuch	nach Versuch	Gewicht g	Unver- seifbares mg	Fettsäuren	Leber	Intest.- Tractus
					%		
1	267	292	254	254	23,03	9,1	
2	261	280	244	159	27,91	11,4	1,06
3	280	283	248	125	35,29	14,2	
4	290	298	258	145	33,60	13,0	1,44
5	194	207	173	489	4,14	2,4	
6	187	189	164	316	7,37	4,5	0,39
							6,66
							7,31
							0,38

*) Exklusive Leber und Intestinal-Tractus.

¹⁾ De Witt Stetten jr. and R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. 133, 329 (1940).

Die Fettbestände bei den Ratten Nr. 5 und 6, welche nur Behensäure-äthylester, aber kein Olivenöl erhielten, sind bedeutend geringer. So betrug der Fettsäuregehalt der Lebern nur 2,6 gegenüber 4,3 und 6,0% bei den Tieren Nr. 1 und 2 bzw. 3 und 4, der Gehalt des Magen-Darm-Tractus an Fettsäuren nur 1,6 gegenüber 21,7 bzw. 21,9%.

Aufarbeitung der Fettsäuregemische.

Beabsichtigt war in erster Linie die Gewinnung chemisch reiner Säuren, weniger eine quantitative Abtrennung der Einzelkomponenten.

a) Feste Säuren.

Die schwerlöslichen Bleisalze der Körperfettsäuren haben wir zwei- bis dreimal aus Alkohol umkristallisiert; sie lieferten nach Zersetzung 4,69, 6,24, 7,85, 8,31, 0,96 und 1,46 g feste Säuren mit Schmelzpunkten von 50—52°.

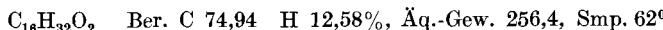
Die vereinigten Fettsäuren aus den Lebern gaben 0,520 g, diejenigen aus den Magen-Darmtracten aller Tiere 3,00 g feste Säuren.

Eine erste Destillation der Methylester im Vakuum lieferte verschiedene Fraktionen noch unreinen Palmitin- und Stearinsäure-methylesters. Durch nochmalige Fraktionierung konnten im allgemeinen Destillate erhalten werden, die nach Verseifung und Umkristallisation aus wässrigem Aceton reine Palmitin- bzw. Stearinsäure lieferten (vgl. Tabelle 4).

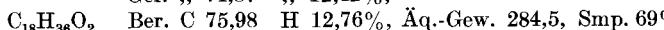
Tabelle 4.

Tier Nr.	destill. Methyl- ester g	Palmitinsäure				Stearinsäure			
		g	Schmelz- punkt	Misch- schmelz- punkt	Äq.- Gew.	g	Schmelz- punkt	Misch- schmelz- punkt	Äq.- Gew.
1	4,41	1,740	61—62°	61—62°	255,3	0,380	69—70°	68—69°	285,9
2	6,24	2,510	62—63°	62°	256,0	0,275	69—70°	69—70°	283,1
3	6,40	2,562	62°	61—62°	256,1	0,587	68—70°	69—70°	286,1
4	5,40	1,270	62°	62°	256,2	0,350	70—71°	70—71°	284,8
5 u. 6	2,20	0,525	61—62,5°	61—62°	257,7	0,134	68—69°	68—69°	287,0

Analysen:

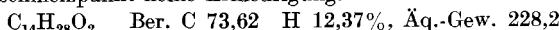


Gef. „ 74,87 „ 12,42%,



Gef. „ 76,10 „ 12,75%,

Aus den vereinigten niedersiedenden Fraktionen der Körperfettsäuren konnten durch fraktionierte Destillation 695 mg Myristinsäure-methylester erhalten werden. Die durch Verseifung daraus gewonnene Myristinsäure schmolz bei 52—54° und zeigte im Mischschmelzpunkt keine Erniedrigung.



Gef. „ 73,64 „ 12,27%, „ „ 227,0

Die vereinigten hochsiedenden Anteile wurden gleichfalls fraktioniert destilliert. Aus 14 erhaltenen Fraktionen gelang die Isolierung von 250 mg reiner Stearinsäure, Smp. 70—71°, Äq.-Gew. 284,7, Atom-% D: 0,32, und von 100 mg unreiner Behensäure, Smp. 82—83°, Mischschmelzpunkt mit Behensäure 80—82°, Äq.-Gew. 347,3 (Ber. 340,4). Im übrigen lagen nur noch untrennbare Gemische vor.

Um eine Beeinflussung des D-Gehaltes der Palmitinsäure durch geringe Beimengungen schwerer Behen- bzw. Stearinsäure völlig auszuschliessen, haben wir die vereinigten reinen Palmitinsäure-Fraktionen im Sinne des Verdünnungsverfahrens („washing out“) von Schoenheimer und Rittenberg¹⁾ mit der doppelten Menge reiner Behensäure zusammen mit Methanol verestert. Die sich ergebende reine Palmitinsäure (Smp. 62°,

¹⁾ R. Schoenheimer and D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 120, 155 (1937).

Äq.-Gew. 254,7) enthielt 0,07 Atom-% D. Wir mischten sie nun mit reiner Stearinäure, veresterten und destillierten wieder zur Gewinnung reiner Palmitinsäure: Smp. 62°, Atom-% D: 0,07.

b) Flüssige Säuren.

Die flüssigen Säuren haben wir zur Abtrennung eventuell noch vorhandener kleiner Mengen D-haltiger gesättigter Säuren mit der halben Menge reiner Palmitinsäure versetzt, in der fünffachen Menge Äthanol gelöst und mit dem gleichen Volumen äthanolischer Bleiacetatlösung versetzt. Die ausgefallenen Bleisalze wurden nach 24 Stunden abfiltriert, das Filtrat auf einen Drittel des Volumens eingedampft und nach weiteren 24 Stunden die kleinen Mengen noch abgeschiedener Bleisalze abgetrennt. Die so von den festen Säuren befreiten flüssigen Säuren erhielten wir aus den Bleisalzen durch Zersetzung mit Salzsäure und prüften sie auf ihren Gehalt an Deuterium. Im allgemeinen konnte durch diesen „washing out“-Prozess keine Änderung am Deuteriumgehalt festgestellt werden.

Zur Isolierung der Ölsäure haben wir 2,5 g der flüssigen Fettsäuren in 10 cm³ Methanol gelöst und mit ca. 500 mg Natriumcarbonat neutralisiert. Nach Zugabe von 2,5 g p-Phenyl-phenacylbromid kochten wir 2½ Stunden am Rückfluss. Die sich beim zwölfstündigen Stehen bei 0° abscheidenden Krystalle wurden abgenutscht, mit kaltem Äthanol gewaschen und in Äther gelöst. Die ätherische Lösung haben wir dreimal mit Soda und viermal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Den Rückstand krystallisierten wir zuerst aus Äthanol unter Beigabe von etwas Tierkohle um, dann aus Amylalkohol und anschliessend mehrere Male aus einer verdünnten, äthanolischen Lösung. So konnten höher ungesättigte Anteile entfernt werden, und wir erhielten analysenreinen p-Phenyl-phenacylester der Ölsäure.

$C_{32}H_{44}O_3$ (MG 476,66) Ber. C 80,63 H 9,30%, J. Z. 53,26, Smp. 58—59,5°¹⁾
Gef. „ 80,55 „ 9,15%, „ „ 52,2 „ 58—59,5°

Bei den D-Bestimmungen erfreuten wir uns der Mithilfe von Hrn. Karl B. Schmid.

Zusammenfassung.

1. Wir hydrierten aus Rapsöl gewonnene Erucasäure mit schwerem Wasserstoff und fütterten Ratten, einem normalen Futterbeigmisch, Deuteriobehensäure-äthylester. Die Resorption betrug bei Zulagen von 5 und 10% Ester zur Nahrung berechnet auf Behensäure rund 40%.

2. Aus den Körperfetten der Tiere isolierte reine Stearin-, Palmitin-, Myristin- und Ölsäure enthalten Deuterium, womit der β -oxydative Abbau der 22 C-Atome aufweisenden Behensäure über die C_{18} -, C_{16} - und C_{14} -Säure bewiesen ist.

3. Intermediär entstehende Stearinäure wird zu Ölsäure dehydriert.

4. Auch aus der Leber und dem Magen-Darm-Tractus der Ratten konnten gleichfalls D-haltige Stearin-, Palmitin- und Ölsäure erhalten werden.

5. Die Behensäure verbrennt leicht und gelangt nur in einem sehr geringen Ausmasse zur Ablagerung.

Der Isotopenkommission der Schweizerischen Akademie der medizinischen Wissenschaften verdanken wir bestens eine erhaltene Subvention.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

¹⁾ C. R. Noller and R. A. Bannerot, Am. Soc. 56, 1563 (1934); N. L. Drake and J. Bronitsky, Am. Soc. 52, 3715 (1930).