

## 239. Über den Abbau aliphatischer Kohlenwasserstoffe mit 8—18 C-Atomen im Tierkörper

von Karl Bernhard, Urs Gloor und Erwin Scheitlin.

(22. VIII. 52.)

Wir haben kürzlich die Resorption von Mineralöl untersucht und festgestellt, dass solches mit Olivenöl an Ratten verabreicht in einem merklichen Ausmasse aufgenommen und offenbar auch abgebaut wird<sup>1)</sup>. Kohlenwasserstoffe mit 10—18 C-Atomen konnten, an Tieren mit Ductus-thoracicus-Fisteln verfüttert, in der Lymphe stets aufgefunden werden, wobei die kurzgliedrigeren analog resorbiert werden wie diejenigen mit höherer C-Zahl<sup>2)</sup>. Arbeiten amerikanischer Autoren über histologisch nachweisbare Gewebsschädigungen an menschlichen Leichen als mögliche Folge fortgesetzter Paraffinaufnahme gegen Obstipationen sind deutliche Hinweise, dass Resorption und Oxydation von Kohlenwasserstoffen in vivo nicht nur theoretisches, sondern auch klinisches Interesse beanspruchen dürfen.

Über den Abbau von phenylsubstituierten Kohlenwasserstoffen, wie Äthyl-, n-Propyl-, n-Butyl- und n-Amyl-Benzol in vivo liegen Untersuchungen von *Thierfelder & Klenk*<sup>3)</sup> vor, welche auf Grund von Ausscheidungsprodukten im Harne eine stattfindende Methyl- und anschliessende  $\beta$ -Oxydation solcher Verbindungen erkennen liessen. Höhere aliphatische Kohlenwasserstoffe wurden indessen auf ihr Verhalten im Tierkörper bis anhin nicht systematisch untersucht, einzig *Stetten*<sup>4)</sup> verfütterte Ratten Deuterium-signiertes Hexadecan und konnte sowohl im Unverseifbaren als auch in den Leberfettsäuren der Tiere den schweren Wasserstoff nachweisen.

Wir haben durch Deuterierung ungesättigter Kohlenwasserstoffe folgende signierte Paraffine mit 8—18 C-Atomen erhalten:

|                                   | Atom-% D |
|-----------------------------------|----------|
| 1,2-Dideuterio-octan . . . . .    | 6,5      |
| 2,3-Dideuterio-octan . . . . .    | 5,8      |
| 1,2-Dideuterio-decan . . . . .    | 6,1      |
| 1,2-Dideuterio-dodecan . . . . .  | 6,4      |
| 1,2-Dideuterio-tetradecan . . . . | 3,8      |
| 1,2-Dideuterio-hexadecan . . . .  | 4,6      |
| 1,2-Dideuterio-octadecan . . . .  | 4,1      |

und unter einheitlichen Bedingungen an Ratten verfüttert (je 10 Tiere erhielten täglich in 15 cm<sup>3</sup> Olivenöl gelöst 5 g, d. h. während 6 Tagen

<sup>1)</sup> K. Bernhard & E. Scheitlin, *Helv. Physiol. Acta* **10**, 54 (1952).

<sup>2)</sup> K. Bernhard, E. Scheitlin & U. Gloor, *Helv. Physiol. Acta*, im Druck.

<sup>3)</sup> H. Thierfelder & E. Klenk, *Z. physiol. Ch.* **141**, 29 (1924).

<sup>4)</sup> De Witt Stetten jr., *J. Biol. Chem.* **147**, 327 (1943).

30 g einer solchen signierten Verbindung). Die Ausscheidungen wurden während dieser Zeit quantitativ gesammelt und die Ratten am siebten Tag getötet und aufgearbeitet. Die Deuterium-Konzentration des Körperwassers geht aus der folgenden Zusammenstellung hervor:

|                                    |            |            |      |      |      |      |      |
|------------------------------------|------------|------------|------|------|------|------|------|
| Verfütterter Kohlenwasserstoff . . | C-8<br>1,2 | C-8<br>2,3 | C-10 | C-12 | C-14 | C-16 | C-18 |
| Atom-% D . . . . .                 | 0,06       | 0,05       | 0,06 | 0,07 | 0,05 | 0,04 | 0,02 |

Es war somit ersichtlich, dass ein Abbau der aufgenommenen Kohlenwasserstoffe stattfand, und wir haben in der Folge Leber, Intestinaltraktus und restlichen Kadaver der Tiere im Hinblick auf den Nachweis unverändert abgelagerter Kohlenwasserstoffe (neutrale Anteile) und die Isolierung der Fettsäuren aufgearbeitet.

Die Oxydation dieser Kohlenwasserstoffe schien in erster Linie in der Leber möglich und musste sich durch die Gegenwart D-haltiger Fettsäuren in diesem Organ manifestieren. Eine blosse Ablagerung brauchte sich indessen nicht auf bestimmte Organe zu beschränken. Dabei war zu berücksichtigen, dass eine am C-Atom 1 einsetzende Methyloxydation bei den in Stellung 1,2 deuterierten Kohlenwasserstoffen zu D-ärmeren Fettsäuren führt, als das bei der Bildung der COOH-Gruppe aus der zweiten Methylgruppe der Fall ist. Indessen dürfte angenommen werden, die Gegenwart von schwerem Wasserstoff an den C-Atomen 1 und 2 würde sich im Sinne einer Bevorzugung der Oxydation der zweiten Methylgruppe auswirken.

In den Fettsäuren aus dem Depotfett war nur mit geringen D-Gehalten zu rechnen, da sich die Verdünnung aus den Kohlenwasserstoffen gebildeter Fettsäuren mit im Depotfett vorhandener zu stark auswirken musste. Wir haben daher die Depotfettsäuren der Destillation unterworfen und je drei anfängliche Fraktionen auf Deuterium geprüft. Die Ergebnisse sind aus der Tab. 1 ersichtlich.

Tabelle 1.

Deuterium-Gehalt (Atom-% D) der Neutral-Anteile und der Fettsäuren aus den Lebern und den Körperfetten nach Fütterung D-haltiger Kohlenwasserstoffe an Ratten.

| Verfütterter<br>Kohlenwasserstoff | C-8<br>1,2 | C-8<br>2,3 | C-10 | C-12 | C-14 | C-16 | C-18 |
|-----------------------------------|------------|------------|------|------|------|------|------|
| Leber:                            |            |            |      |      |      |      |      |
| Fettsäuren, gesamt . . .          | 0,06       | 0,08       | 0,08 |      | 0,14 | 0,31 |      |
| Fettsäuren, flüssig . . .         |            |            |      | 0,07 |      |      | 0,36 |
| Fettsäuren, fest . . . .          |            |            |      | 0,06 |      |      | 0,40 |
| Neutral-Anteile . . . .           | 0,11       | 0,08       | 0,10 | 0,11 | 0,12 | 0,20 | 0,31 |
| Kadaver:                          |            |            |      |      |      |      |      |
| Fettsäure, gesamt . . .           | 0,04       | 0,03       | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,04 | 0,06 |
| 1. Fraktion . . . . .             | 0,02       | 0,08       | 0,03 | 0,08 | 0,13 | 0,13 | 0,05 |
| 2. Fraktion . . . . .             | 0,05       | 0,06       | 0,04 | 0,06 | 0,09 | 0,11 | 0,09 |
| 3. Fraktion . . . . .             | 0,03       | 0,05       | 0,05 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,07 |
| Neutral-Anteile . . . .           | 0,12       | 0,06       | 0,12 | 0,27 | 0,26 | 1,44 | 1,21 |

Aus den nach Octadecan-Fütterung isolierten Körperfettsäuren erhielten wir Ölsäure mit 0,06 Atom-% D, Palmitinsäure mit 0,05 Atom-% D und Stearinsäure mit einem D-Gehalt von 0,13%. Nach Gaben von Hexadecan gelang die Abtrennung von Palmitinsäure, welche 0,12% D aufwies.

Aus dem während der ganzen Dauer der Fütterung gesammelten Harn erhielten wir bei der ätherischen Extraktion nur sehr geringe Anteile neutraler Stoffe, deren D-Gehalt denjenigen des Körperwassers nicht überstieg. Die Extraktion des angesäuerten Harnes führte indessen zu unter solchen Bedingungen immer erhältlichen Lipidanteilen (braune Öle), die sich, wie aus den umstehenden Daten ersichtlich ist, als D-haltig erwiesen:

|   |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|
| Verfütterter Kohlenwasserstoff . . . . .              | C-12 | C-14 | C-16 | C-18 |
| D-Gehalt der Fettsäuren aus dem Harn (Atom-% D) . . . | 0,97 | 0,52 | 0,45 | 0,14 |

Die Aufarbeitung des Intestinaltraktus und der Faeces auf Neutralanteile wurde nur nach Fütterung der Kohlenwasserstoffe C-14, C-16 und C-18 durchgeführt und ergab D-Gehalte von 3,8, 4,3 und 3,5 Atom-%. Die Fettsäuren haben wir aus den Faeces lediglich nach Gaben des C-18 Kohlenwasserstoffes isoliert und festgestellt, dass sie mit 0,04 Atom-% D die Konzentration des Körperwassers an schwerem Wasserstoff nicht übertrafen.

### Experimentelles.

Von käuflichen, in Stellung 1,2 (bzw. 2,3) ungesättigten Kohlenwasserstoffen bestimmten wir nach Destillation im Vakuum im Sinne eines Reinheitskriteriums die Ultraviolettspektren:

| Kohlenwasserstoff                   | C-8<br>1,2 | C-8<br>2,3 | C-10 | C-12 | C-14 | C-16 | C-18 |
|-------------------------------------|------------|------------|------|------|------|------|------|
| Ext.-Maximum in Å . . .             | 2280       | 2280       | 2280 | 2280 | 2250 | 2280 | 2280 |
| Molare Ext. $\log \epsilon$ . . . . | 1,50       | 1,32       | 1,28 | 1,57 | 1,98 | 1,82 | 1,72 |

Die durch Hydrierung mit Deuterium unter Verwendung von *Raney*-Nickel daraus erhaltenen gesättigten, signierten Verbindungen gelangten analysenrein zur Verwendung.

**Tierversuche.** Je 10 möglichst einheitliche Ratten erhielten mit einem normalen Futter die genannten, in Olivenöl gelösten Kohlenwasserstoffe. Es traten dabei keinerlei Störungen ein, und die Tiere nahmen an Gewicht in normaler Weise zu:

| Verfütterter<br>Kohlenwasserstoff | C-8<br>1,2 | C-8<br>2,3 | C-10 | C-12 | C-14 | C-16 | C-18 |
|-----------------------------------|------------|------------|------|------|------|------|------|
| Anfangsgewicht g . . . .          | 1720       | 1860       | 1880 | 1610 | 1620 | 1600 | 1275 |
| Endgewicht g . . . . .            | 1940       | 2100       | 2060 | 1640 | 1650 | 1690 | 1620 |

Nach Beendigung der Fütterung haben wir die Ratten durch Kopfschlag getötet. Die Leber, der Intestinaltraktus samt Faeces und der restliche Kadaver von je 10 Tieren wurde getrennt aufgearbeitet.

**Aufarbeitung. Kadaver.** Sie wurden nach Zerkleinern in methanolischer Kalilauge unter Erwärmern aufgelöst. Nach Abtrennung der Knochen durch Filtration über Glaswolle und Verdünnen des Filtrates mit viel Wasser erhielten wir durch sechsmaliges Ausschütteln mit je 500 cm<sup>3</sup> Petroläther, welche Extrakte mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft wurden, das Unverseifbare bzw. die Neutralteile. Zur wässerigen Phase fügten wir 5 g Oleylalkohol und extrahierten erneut dreimal mit je 500 cm<sup>3</sup> Äther. Den Rückstand dieser Auszüge haben wir verworfen. Wir durften nach diesem „washing out“ Prozess annehmen, dass nennenswerte deuterierte Neutralanteile, also unveränderte Kohlenwasserstoffe, in der wässerigen Phase nicht mehr vorhanden waren. Dieselbe haben wir sodann mit Salzsäure angesäuert und nun wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Solche Extrakte wurden mit Wasser ausgewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Proben von 20 g dieser Fettsäuregemische haben wir im Vakuum destilliert und drei Fraktionen von je 500 mg (etwa je 1/40 der Gesamt fettsäuren) aufgefangen und auf Deuterium analysiert. Die Mengen der erhaltenen Neutralteile und Gesamt fettsäuren sind unten angeführt:

| Verfütterter Kohlenwasserstoff | C-8<br>1,2 | C-8<br>2,3 | C-10 | C-12 | C-14 | C-16 | C-18  |
|--------------------------------|------------|------------|------|------|------|------|-------|
| Neutralteile, g . . . .        | 1,98       | 2,62       | 1,94 | 1,72 | 1,68 | 1,58 | 1,87  |
| Gesamt-Fettsäuren, g . .       | 87,4       | 86,0       | 83,0 | 89,3 | 92,3 | 82,8 | 104,8 |

Einen Teil der Gesamt fettsäuren trennten wir in üblicher Weise über die Bleisalze in feste und flüssige Anteile. Durch fraktionierte Destillation der Methylester in einer kleinen Kolonne gelang die Abtrennung von Ölsäure (JZ 89,6), von Palmitinsäure (Smp. 61°, Äq.-Gew. 257,2) und von Stearinsäure (Smp. 67°, Äq.-Gew. 282,5).

**Lebern.** Die Aufarbeitung gestaltete sich analog. Lebergewicht, Menge der isolierten Neutralteile und der Gesamt-Fettsäuren sind tabellarisch dargestellt:

| Verfütterter Kohlenwasserstoff | C-8<br>1,2 | C-8<br>2,3 | C-10 | C-12 | C-14 | C-16 | C-18 |
|--------------------------------|------------|------------|------|------|------|------|------|
| Lebergewicht, g . . . .        | 72         | 74         | 75   | 73   | 76   | 76   | 69   |
| Neutralteile, mg . . . .       | 263        | 261        | 273  | 250  | 240  | 243  | 310  |
| Gesamt-Fettsäuren, g . .       | 1,80       | 2,90       | 2,01 | 2,15 | 2,21 | 2,20 | 2,00 |

**Intestinal-Traktus und Faeces.** Die vereinigten Proben haben wir auf dem Wasserbad mit methanolischer Kalilauge verseift, das Alkohol-Wassergemisch im Vakuum abdestilliert, den Rückstand getrocknet und im Soxhlet mit Äther extrahiert. Die resultierenden Neutralteile gelangten zur D-Bestimmung. Durch Ansäuern konnten schliesslich die Fettsäuren gewonnen werden, die indessen nur nach Fütterung des Kohlenwasserstoffes mit 18 C-Atomen isoliert wurden.

Aus dem Harn haben wir durch Extraktion bei neutraler bzw. bei saurer Reaktion mit Äther die Neutralteile und Fettsäuren gewonnen.

### Diskussion der Ergebnisse.

Die Verfütterung signierter Kohlenwasserstoffe mit 8–18 C-Atomen führte, wie dies auf Grund unserer Versuche an Fistelratten zu erwarten war, ohne dass sich damit sichtbare störende Einflüsse verbanden, zur Resorption merklicher Anteile dieser Verbindungen. In bezug auf ihre Ablagerung sind deutliche Unterschiede im Verhalten der höheren Homologen gegenüber den niedrigeren ersichtlich.

Octadecan und Hexadecan können auf Grund der D-Werte der Neutralanteile sowohl in der Leber als in den Fettdepots des Körpers nachgewiesen werden. Es lässt sich berechnen, dass letztere (aus 10 Tieren stammend) etwa 40 mg Octan bzw. Decan, 70 mg Dodecan, 120 mg Tetradecan, 500 mg Hexadecan und 550 mg Octadecan enthielten. In bezug auf die verabreichten bzw. resorbierten Mengen sind die wieder aufgefundenen aber verhältnismässig gering, und die Fähigkeit der tierischen Zelle, solche Kohlenwasserstoffe abzubauen, ist nicht zu unterschätzen. Die Verweilzeit der höheren Homologen ist vermutlich grösser als diejenige der Kohlenwasserstoffe mit nur 8—10 Atomen.

Auch der D-Gehalt der Gesamtfettsäuren aus der Leber oder den Körperfetten ist nach Gaben von Octadecan oder Hexadecan am grössten, und es gelang in diesen Fällen, D-haltige Öl- und Stearin- bzw. Palmitinsäure zu isolieren, womit der einwandfreie Nachweis einer stattfindenden Methyloxydation und Fettsäurebildung erbracht ist. Niedermolekulare Fettsäuren, d. h. solche mit weniger als 12 C-Atomen, sind bekanntlich im Körperfett höherer Tiere nicht anzutreffen. Unsere Versuche beweisen deutlich, dass aus entsprechenden Kohlenwasserstoffen entstehende kurzgliedrige Fettsäuren offenbar rasch abgebaut, aber nicht deponiert werden. Die D-Gehalte der Leber- oder Körperfettsäuren nach Fütterung von Octan, Decan oder Dodecan überschreiten kaum wesentlich diejenigen des Körperwassers, welches durch die völlige Oxydation dieser verabreichten Kohlenwasserstoffe an schwerem Wasserstoff etwas angereichert wurde.

Eine Kettenverlängerung, wie sie von *Klem*<sup>1)</sup> nach Gaben deuterierter Myristinsäure durch Isolierung D-haltiger Palmitinsäure bzw. Öl- und Stearinäure bei Ratten beobachtet wurde, trat nach Fütterung von Octan und Decan nicht ein. Obwohl diese Verbindungen sehr merklich resorbiert und, wie aus den mitgeteilten Versuchen hervorgeht, auch oxydiert werden können, beteiligen sich ihre Intermediärprodukte offenbar nicht am Aufbau höherer Fettsäuren. Bei reinen Pflanzenfressern, welche mit Hilfe der Darmbakterien aus Zellulose niedere Fettsäuren gewinnen, und bei denen die Möglichkeit des Aufbaus von Öl-, Stearin- oder Palmitinsäure aus solchen grösseren Bruchstücken gegeben sein könnte, dürfte eine Kettenverlängerung niederer Fettsäuren gleichfalls nicht stattfinden. Nach Verabreichung von deuterierter Capronsäure an Meerschweinchen fanden wir nämlich in den Fettsäuren keine die Konzentration der Körperflüssigkeit an schwerem Wasserstoff übersteigende D-Gehalte. Die Fütterung von Tetradecan führte indessen, wie aus Tab. 1 ersichtlich ist, zu Leberfettsäuren mit 0,14 At.-% D. Damit könnte eine

<sup>1)</sup> *A. Klem*, Fette u. Seifen 51, 184 (1944).

Verlängerung der Kette angedeutet sein; Materialmangel erlaubte uns aber keine exakte Trennung des erhaltenen Gemisches.

Bemerkenswert erscheinen uns die Feststellungen über den D-Gehalt der Harnfettsäuren. Hier liegen die Verhältnisse umgekehrt: die kurzgliedrigen Kohlenwasserstoffe führen zu Harnfettsäuren mit höheren D-Gehalten; die aus ersteren gebildeten Oxydationsprodukte gelangen demnach teilweise im Harn zur Ausscheidung. Die Kohlenwasserstoffe selbst sind aber darin nicht nachweisbar. Vielleicht liegen Oxysäuren vor, die in der Niere gebildet wurden.

Unsere Versuche beweisen eindeutig die im tierischen Organismus (Ratte) mögliche Methyloxydation der verfütterten Kohlenwasserstoffe zu Fettsäuren. Inwiefern sich eine solche zusätzliche Leistung, für die wahrscheinlich in erster Linie die Leber verantwortlich ist, bei fortgesetzten Mineralölgaben, z. B. beim Menschen auswirken kann, lässt sich auf Grund unserer kurzfristigen Versuche an wachsenden Ratten nicht beurteilen.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung* zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz durchgeführt.

#### SUMMARY.

Labelled paraffins with 8–18 C atoms prepared from unsaturated hydrocarbons by addition of deuterium have been added in oily solution to normal rats' food.

After six days an increase of deuterium content in the body fluid of all the rats was observed indicating that the labelled compounds had been metabolized.

The fatty acids of the body fats and the liver lipides contained deuterium especially after feeding octadecan and hexadecan. By isolating oleic, stearic and palmitic acids containing deuterium, methyl- and  $\beta$ -oxydation of these hydrocarbons has been established.

Fatty acids resulting from the metabolism of hydrocarbons with shorter chains were not deposited but in these cases the urine contained fatty acids with higher deuterium content than after administration of octadecan and hexadecan.

According to the deuterium content of the neutral fractions from the liver and body lipides all the hydrocarbons tested were deposited only to a small extent, the largest depots occurring mainly after feeding with octadecan and hexadecan.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel.