Über die Aldehyde der Glycerinphosphatide des Skelett- und Herzmuskels

Von

E. Klenk, W. Stoffel und H. J. Eggers

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 21. Mai 1952)

Nervengewebe und Muskulatur gehören, wie schon Feulgen und Behrens[1] gezeigt haben, zu den Gewebsarten, deren Glycerinphosphatide besonders reich an höheren Aldehyden sind. Nachdem vor kurzem die Aldehyde der Gehirnphosphatide von Leupold[2] untersucht wurden, haben wir nun eine Untersuchung der Aldehyde der Muskelphosphatide durchgeführt. Es sollte versucht werden, auch die quantitative Zusammensetzung des Aldehydgemischs zu ermitteln, um damit den Vergleich mit der Zusammensetzung des Fettsäuregemischs der Esterphosphatide zu ermöglichen.

Sowohl aus den Glycerinphosphatiden des Skelett- wie auch des Herzmuskels ließ sich das Aldehydgemisch in der üblichen Weise in

[1] R. Feulgen u. M. Behrens, diese Z. **256**, 15 [1938].
[2] F. Leupold, diese Z. **285**, 182 [1950].

Form der Dimethylacetale praktisch quantitativ gewinnen. Die aus den Acetalen in Freiheit gesetzten Aldehyde wurden mit Silberoxyd in die Fettsäuren übergeführt und deren Methylester im Vakuum fraktioniert destilliert (Tab. 1).

Tab. 1. Zusammensetzung des durch Oxydation der Aldehyde gewonnenen Fettsäuregemischs in % der Gesamtfettsäuren.

	C_{14}	C_{16}	C_{18}
Skelettmuskel (Pferd) .	14	47	39
Herzmuskel (Rind) . .	4	72	24

Ebenso wie in den Gehirnphosphatiden fehlen auch hier die Aldehyde der in den Esterphosphatiden in relativ großen Mengen vorkommenden ungesättigten C_{20}- und C_{22}-Säuren. Das Gemisch besteht in beiden Fällen der Hauptsache nach aus gesättigten C_{16}- und C_{18}-Aldehyden.

Feulgen und Mitarbb.[3] erhielten aus Pferdefleischphosphatiden durch Wasserdampfdestillation eine Substanz, die ganz überwiegend aus Palmitinaldehyd bestand. In dem von uns aus Pferdefleisch gewonnenen Aldehydgemisch waren ohne Zweifel reichliche Mengen Stearinaldehyd vorhanden. Es mag sein, daß bei der Wasserdampfdestillation vorwiegend Palmitinaldehyd übergeht, oder aber daß die Zusammensetzung des Aldehydgemischs im Pferdefleisch nicht als konstant angesehen werden kann.

Ungesättigte Aldehyde sind nur in verhältnismäßig kleinen Mengen vorhanden. Es handelt sich vorwiegend um ein Octadecenal. Die Versuchsergebnisse sprechen auch für das Vorhandensein eines Hexadecenals. Jedoch gelang es nicht, das letztere mit Sicherheit nachzuweisen.

Da Leupold in den Gehirnphosphatiden unter den ungesättigten Aldehyden neben Δ^9- auch Δ^{11}-Octadecenal aufgefunden hat, haben wir unsere Präparate auf das Vorkommen dieses Aldehyds besonders geprüft. Bei der Ozonidspaltung der C_{18}-Fraktionen wurde als einzige Dicarbonsäure Azelainsäure gewonnen. Daraus ergibt sich, daß Δ^{11}-Octadecenal fehlt und daß in den Herz- und Skelettmuskelphosphatiden offensichtlich als einziger ungesättigter C_{18}-Aldehyd Δ^9-Octadecenal vorkommt.

Die hier untersuchten Organphosphatide enthalten demnach nur die Aldehyde der in den Säugetierfetten am häufigsten vorkommenden Fettsäuren (Palmitin-, Stearin-, Ölsäure neben kleinen Mengen von Myristin- und Hexadecensäure). Es scheint, daß sich das Vorkommen des Δ^{11}-Octadecenals auf die Phosphatide des Nervengewebes beschränkt.

A. Die Aldehyde der Skelettmuskelphosphatide (experimentell bearbeitet von W. Stoffel*)]

Als Ausgangsmaterial wurde von Blut, Fett und Bindegewebe befreites, schlachtfrisches, noch nicht abgehangenes Pferdefleisch verwendet. Weitere Aufarbeitung des durch die Fleischhackmaschine zerkleinerten und mit Aceton ent-

[3] R. Feulgen, K. Imhäuser u. M. Behrens, diese Z. **180**, 161 [1929].
* Auszug aus der Dissertat. von W. Stoffel, Köln 1952.

wässerten Materials zur Gewinnung der Glycerinphosphatide und der daraus abgespaltenen Dimethylacetale nach Klenk und Friedrichs[4]. Einengen der großen Mengen Chloroform-Methanol-Extrakte mit Hilfe eines Vakuum-Umlaufverdampfers unter möglichst schonenden Bedingungen. Auflösen der Phosphatide in Äther, Abtrennung des ätherunlöslichen Sphingomyelins und Ausfällung der Glycerinphosphatide mit Aceton aus der stark eingeengten ätherischen Lösung mehrere Male wiederholt. Vereinigung der durch Extraktion mit Aceton und mit Chloroform-Methanol gewonnenen Phosphatidfraktionen.

Zur Aufarbeitung kamen 5 verschiedene Ansätze. Das Fleisch stammte teils von Rennpferden (a und c), teils von Ackerpferden (b, d und e). Zusammenstellung der Ausbeuten und des Plasmalgehalts in Tab. 2.

Tab. 2. Ausbeute an Phosphatiden und Dimethylacetalen.

	a	b	c	d	e
Frischgewicht in kg . .	10	10	10	20	50
Glycerinphosphatide					
Menge in g	51	82	30	142	232
Plasmalgehalt in %* .	—	—	—	3,80	7,20
Dimethylacetal					
ber. Menge in g . . .	—	—	—	5,4	16,7
isolierte Menge in g . .	2,4	1,7	2,2	4,8	16,0
Plasmalgehalt in %* .	112	100	116	112	102

* Nach Waelsch-Leupold[5] (siehe auch Klenk u. Friedrichs[4]). Als Testsubstanz diente reines Dimethylacetalgemisch aus Gehirn.

16 g Dimethylacetale in der 30-fachen Menge Eisessig gelöst, nach Stehenlassen über Nacht bei 37° mit demselben Volumen Wasser verdünnt und die freien Aldehyde mit Petroläther ausgeschüttelt. Aldehyde nach Asinger[6] mit Silberoxyd zu den Fettsäuren oxydiert, wobei jedoch die alkalische Lösung zur Freisetzung der Fettsäuren nicht mit Salpeter-, sondern mit 20-proz. Schwefelsäure angesäuert wurde. Ausb. 15,0 g. Äquiv.-Gew. gef. 274,6 (276,5). Plasmalgehalt 2,14 (1,78)%. Substanz also praktisch frei von Aldehyden bzw. Dimethylacetalen. Daraus Methylester dargestellt und diese (13,5 g) in einem Fraktionierapparat (mit kleinen Drahtnetzsätteln gefüllte Kolonne, Länge 50 cm) mit folgendem Ergebnis bei 10^{-3} mm Hg fraktioniert destilliert: s. Tab. 3.

Bei der Jodzahlbestimmung der Methylester wurden für die Fraktionen Werte erhalten, die zwischen 18,2 und 72,4 schwankten. Infolge eines Versehens bei der Bestimmung sind die gefundenen Werte zu hoch, so daß auf die Wiedergabe im einzelnen verzichtet werden muß.

Die C_{16}-Säuren. Die aus 2,5 g der vereinigten Fr. 2—3 erhaltenen freien Säuren wurden in Aceton gelöst und aus der Lösung die gesättigten Fettsäuren bei —5 bzw. —20° ausgefroren, wobei man nach dem Absaugen der ausgefallenen gesättigten Anteile mit einem Filtrierstäbchen das Filtrat vor erneuter Kühlung bis auf ein passendes kleineres Volumen einengte. 1,9 g. Schmp. 59—60°. Äquiv.-Gew. gef. 254,9 (254,0); $C_{16}H_{32}O_2$ ber.: 256,3. Es handelt sich hier um praktisch reine Palmitinsäure.

Aus dem Filtrat nach Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Fraktion der ungesättigten Fettsäuren: 0,15 g. Schwach gelbes Öl. Jodzahl gef. 74,3 (71,9).

[4] E. Klenk u. E. Friedrichs, diese Z., im Druck.

[5] G. Ehrlich, H. E. Taylor u. H. Waelsch, J. biol. Chemistry **173**, 547 [1948]; F. Leupold, diese Z. **285**, 216 [1950].

[6] F. Asinger, Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 656 [1942].

Tab. 3. Ergebnis der fraktionierten Destillation des Fettsäuregemischs.

Fr.	Methylester Menge g	hydrierte freie Säure: Rohprodukte Schmp.	Äquiv.-Gew.	aus Aceton umkrist. Schmp.	Äquiv.-Gew.	Schmp.	Äquiv.-Gew.
1	1,8	48°	241	48°	241	$C_{16}H_{32}O_2$	
2	1,6	56°	265	58°**	255	62,5°	256,3
3	1,5	58°	265				
4	1,6	54°	270	54°	272		
5	1,5	65°	289	67—68°	283,7	$C_{18}H_{36}O_2$	
6	0,8	66°	291			69,2°	284,3
7	0,2	66°	287	69°			
8*	0,2	67°	279				

* Kolonnenrückstand 0,8 g. Kolbenrückstand 1,5 g.
** Mischschmelzpunkt mit Palmitinsäure 59—60°.

$C_{16}H_{30}O_2$ ber. 99,5; $C_{18}H_{34}O_2$ ber. 89,5. Hydrierte Säure. Schmp. 53—54°. Äquiv.-Gew. gef. 280 (275). Es liegt demnach ein Gemisch von C_{16}- und C_{18}-Säuren vor. Das Vorhandensein kleiner Mengen einer Hexacosensäure ist wahrscheinlich.

Die C_{18} Säuren. 2,5 g der vereinigten Fr. 5—7 (Fr. 8 wurde für die Hydrierung völlig verbraucht) wurden, ohne die gesättigten Säuren abzutrennen, in Chloroform gelöst und bei —5 bis —10° ozonisiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels spaltete man die Ozonide nach Asinger, trennte das Säuregemisch durch Aufnehmen in viel Petroläther, wobei die Dicarbonsäuren als unlöslicher Rückstand verbleiben, während die Monocarbonsäuren in Lösung gehen.

Dicarbonsäurefraktion: 0,5 g. Schmp. 99—100°. Aus Wasser umkristallisiert, 0,25 g. Schmp. 104°. Mischschmelzpunkt mit reiner Azelainsäure 104—105°. Äquiv.-Gew. gef. 94,3 (90,6). $C_9H_{16}O_4$ ber. 94,06. Es liegt demnach praktisch reine Azelainsäure vor.

Monocarbonsäurefraktion: 1,1 g. Durch Umkristallisation aus Aceton bei 0 bzw. —15°. 0,55 g einer in weißen, glänzenden Blättchen kristallisierten Säure. Schmp. 68°. Mischschmelzpunkt mit reiner Stearinsäure 68—69°. Äquiv.-Gew. gef. 283,2 (284,2); $C_{18}H_{36}O_2$ ber. 284,3. Es handelt sich demnach um Stearinsäure. Auf die Isolierung der in Lösung verbliebenen niederen Monocarbonsäuren (Pelargonsäure) mußte infolge der geringen Substanzmenge verzichtet werden.

Tab. 4. Menge der Methylester in g*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	Summe g	Summe in %
C_{14}	0,91	0,20	0,19						1,30	14,2
C_{16}	0,89	1,39	1,31	0,76					4,35	47,3
C_{18}				0,85	1,5	0,8	0,2	0,2	3,55	38,5

* Der Berechnung wurden die Äquiv.-Gewichte der umkristallisierten hydrierten Säuren zu Grunde gelegt, da den nicht umkristallisierten Fraktionen anscheinend noch Spuren von Unverseifbarem beigemengt waren.

B. Die Aldehyde der Herzmuskelphosphatide

(experimentell bearbeitet von H. J. Eggers†)

Darstellung der Glycerinphosphatide und der Dimethylacetale wie unter A beschrieben.

† Auszug aus der Dissertat. von H. J. Eggers, Heidelberg 1952.

Tab. 5. Ausbeute an Phosphatiden und Dimethylacetalen.

	a	b	c
Frischgewicht in kg	34	13,5	29,5
Glycerinphosphatide			
Menge in g	242	88	204
Plasmalgehalt in %	3,85*	5,85	7,2
Dimethylacetale			
ber. Menge in g	9,3	5,15	14,7
isolierte Menge in g	11,9	4,7	13,4
Plasmalgehalt in %	119	113	122

* Der Wert ist zu niedrig, da die Bestimmung nicht mit dem frischen Phosphatidpräparat, sondern mit einer infolge langen Stehenlassens schon weitgehend veränderten Probe ausgeführt wurde.

Aus 26 g Dimethylacetalen wurden wie unter A 20 g Fettsäuren erhalten. Infolge des verhältnismäßig hohen Plasmalgehaltes (5%) löste man die Fettsäuren in Methanol, machte die Lösung mit methanolischer NaOH alkalisch und schüttelte die Dimethylacetale mit Petroläther aus. Die aus den zurückgewonnenen unveränderten Dimethylacetalen (1 g) wieder in Freiheit gesetzten Aldehyde wurden erneut mit Silberoxyd nach Asinger oxydiert und die so gewonnenen Fettsäuren mit der aus den Seifen zurückgewonnenen Hauptmenge vereinigt. Ausb. 19,5 g. Die Plasmalreaktion war jetzt negativ.

Das Ergebnis der sich anschließenden fraktionierten Destillation der Methylester im Vakuum zeigt Tab. 6.

Tab. 6. Ergebnis der fraktionierten Destillation des Estergemischs.

Fr.	Methylester Menge g	Methylester Jodz.	hydrierte freie Säuren: Rohprodukte Schmp.	Rohprodukte Äquiv.-Gew.	nach Umkrist. aus Aceton Schmp.	nach Umkrist. aus Aceton Äquiv.-Gew.
1	1,95	8,2	47°	248,3	48,0°	246,6
2	2,28	11,5	51°	251,8	52—52,5°	254,9
3	2,19	11,5	50,5—51°	258,3	53°	254,4
4	2,04	12,9	51—51,5°	258,8	53°	255,1
5	2,09	14,7	53°	261,4	56—56,5°	257,0
6	2,16	16,2	54,5—55°	264,6	54°	259,4
7	2,03	16,2	53°	266,7	55,5°	260,7
8	1,53	21,3	59°	274,3	58—58,5°	270,5
9	1,46	25,3	60,5—61°	278,3	68°	282,1

Die C_{16}-Säuren. Wie aus Tab. 6 ersichtlich, bestehen die Fr. 1—7 vorwiegend aus C_{16}-Säuren. Auffallenderweise führte keine der Fraktionen bei der Hydrierung zu reiner Palmitinsäure. Die höchstschmelzende Fraktion (Fr. 5) schmolz noch 6,5° niedriger als reine Palmitinsäure. Es ist anzunehmen, daß die schlechte Trennbarkeit des Estergemischs trotz Verwendung eines gut wirksamen Fraktionierapparates auf die Anwesenheit von geringen Mengen ungerader, durch Kettenverkürzung bei der Oxydation mit Silberoxyd aus den C_{16}- und C_{18}-Aldehyden entstandener Homologen (C_{15} und C_{17}) zurückzuführen ist. Mischschmelzpunkt der umkristallisierten Säure von Fr. 5 mit Palmitinsäure 59,5°.

Zur Gewinnung der vorhandenen kleinen Mengen ungesättigter Säuren vereinigte man die für die Hydrierung nicht verbrauchten Anteile der Fr. 2—5 (7,1 g). Trennung durch Tiefkühlkristallisation bei Temperaturen von —20°, —30° und —32°.

Fraktion der gesättigten Fettsäuren. Nochmals aus Aceton umkristallisiert. Schmp. 54°. Äquiv.-Gew. gef. 255,5 (258,1).

Fraktion der ungesättigten Fettsäuren. 0,80 g. Ölige Substanz. Jodz. gef. 46. Die Fraktion enthält demnach noch beträchtliche Mengen gesättigter Säuren. Daraus festes Hydrierungsprodukt, Schmp. 46°. Äquiv.-Gew. gef. 254,3 (253). Offensichtlich liegt ein Gemisch von C_{14}—C_{18}-Säuren vor. Auf Grund dieses Ergebnisses ist das Vorhandensein einer Hexadecensäure noch nicht als endgültig bewiesen anzusehen.

Die C_{18}-Säuren. Mischschmelzpunkt der umkristallisierten hydrierten Säure von Fr. 9 mit Stearinsäure 68,5°. Mischschmelzpunkt mit Palmitinsäure 56°. Es handelt sich also um praktisch reine Stearinsäure. Obgleich in Fr. 8 nicht unbeträchtliche Mengen C_{16}-Säuren enthalten waren, wurde — um für die weitere Untersuchung genügende Substanzmengen zu erhalten — der nicht hydrierte Anteil mit Fr. 9 vereinigt. Daraus erhaltene freie Säuren wie oben durch Tiefkühlkristallisation in gesättigte und ungesättigte Fettsäuren getrennt.

Fraktion der gesättigten Fettsäuren. Schmp. 58°. Äquiv.-Gew. gef. 275,3 (274,1). Jodz. gef. 11.

Fraktion der ungesättigten Fettsäuren. 0,62 g. Jodz. gef. 63. Substanz in Chloroformlösung bei —10° ozonisiert, Lösungsmittel im Vakuum vorsichtig abgedampft, Ozonid in Eisessig (35 ccm) gelöst, 2 ccm Perhydrol zugefügt und im Wasserbad bei 35° gespalten. Nach 72-stdg. Stehenlassen bei 35° Eisessig im Vakuum bei 70° abdestilliert. Rückstand mit Petroläther ausgekocht und die ungelöst zurückbleibende Dicarbonsäurefraktion aus Wasser umkristallisiert. 73 mg. Schmp. 105°. Mischschmelzpunkt mit reiner Azelainsäure 105,5°. Äquiv.-Gew. gef. 98,1 (98,8). Es handelt sich also um praktisch reine Azelainsäure.

Auf die Isolierung der als Spaltprodukte auftretenden Monocarbonsäuren mußte infolge der geringen Substanzmengen verzichtet werden.

Tab. 7. Menge der Methylester in g.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summe g	Summe in %
C_{14}	0,50	0,31								0,81	4
C_{16}	1,45	1,97	2,19	2,04	1,66	1,45	1,21	0,50	0,27	12,74	72
C_{18}					0,44	0,71	0,82	1,03	1,18	4,18	24

Die Untersuchung wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Zusammenfassung

Aus den Glycerinphosphatiden von Pferdefleisch und Rinderherz ließen sich die höheren Aldehyde in Form der Dimethylacetale praktisch quantitativ isolieren. Das Aldehydgemisch bestand in beiden Fällen aus C_{14}-, C_{16}- und C_{18}-Aldehyden. Unter den nur in kleinen Mengen vorkommenden ungesättigten Aldehyden findet sich Δ^9-Octadecenal. Es fehlt das in den Gehirnphosphatiden außerdem vorkommende Δ^{11}-Octadecenal.