

Zusammenfassung.

1. *p,p'*-Dichlordiphenyl-trichlor-äthan kristallisiert in der orthorhombisch-hemimorphen Klasse C_{2v} und zwar mit C_{2v}^5 —Pbc als wahrscheinlichem Raumsystem.

2. Die Elementarzelle mit den Dimensionen $a = 19,2$ Å.E., $b = 10,00$ Å.E. und $c = 7,84$ Å.E., enthält vier Molekel (Dichte der Verbindung: 1,54).

3. Auf Grund einer *Patterson*-Analyse nach (001) lässt sich für die *x*- und *y*-Koordinaten der Chloratome ein Vorschlag machen.

Wissenschaftliche Laboratorien der Firma *J. R. Geigy A.G.*, Basel, Laboratorium für technische Röntgenographie und Feinstrukturuntersuchung an der E.M.P.A. und am Mineralog. Institut der E.T.H., Zürich.

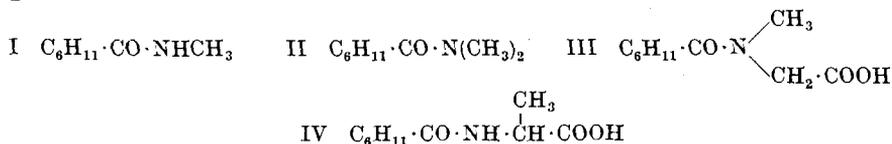
217. Zur Dehydrierung der Hexahydro-benzoessäure im Tierkörper

von Karl Bernhard und Henriette Caffisch-Weill.

(31. X. 45.)

Die nahen chemischen Beziehungen zwischen Sterinen, Gallensäuren, Sexualhormonen und gewissen cancerogen wirkenden polycyclischen Kohlenwasserstoffen lassen an die Möglichkeit des Überganges hydrierter in dehydrierte Ringsysteme *in vivo* denken. Im Tierkörper stattfindende Dehydrierungen des Sterans sind sehr wahrscheinlich.

Wir haben in früheren Versuchen¹⁾ das Schicksal einer Reihe einfacher hydrocyclischer Verbindungen im tierischen Organismus (Hund) geprüft. Eine Aromatisierung des Cyclohexanringes konnte für die Hexahydro-benzoe- und für die Hexahydro-*m*-toluylsäure gezeigt werden. Diese Dehydrierung erwies sich abhängig vom Vorhandensein oder von der Entstehung einer am Ring befindlichen freien Carboxylgruppe und von deren Stellung zu gewissen anderen Substituenten. *N*-Methyl-hexahydro-benzamid (I); *N*-Dimethyl-hexahydro-benzamid (II) und Hexahydro-hippursäure gehen in Benzoessäure über, während Hexahydro-benzoyl-sarkosin (III) und Hexahydro-benzoylalanin (IV) nach subcutanen Gaben unverändert ausgeschieden werden.



¹⁾ K Bernhard, Z. physiol. Ch. **248**, 256 (1937).

Aus dem Verhalten der Cyclohexyl-propion- und Cyclohexyl-valeriansäure geht hervor, daß ω -Cyclohexyl-substituierte Fettsäuren mit ungerader C-Zahl der Kette durch β -Oxydation intermediär Hexahydro-benzoesäure und damit Benzoesäure ergeben¹⁾²⁾. Hexahydro-o-toluylsäure wird nicht dehydriert, sondern unverändert ausgeschieden zum Unterschied der Hexahydro-m-toluylsäure, welche verfüttert in guter Ausbeute in m-Toluylsäure übergeht. Hexahydro-p-toluylsäure verbrennt weitgehend.

Grundmann und Löw³⁾ prüften das Verhalten partiell ungesättigter Derivate des Cyclohexans und fütterten an Kaninchen teilweise hydrierte o-Toluylsäure. Die $\Delta^{4,6}$ -Dihydro-o-toluylsäure und das $\Delta^{4,6}$ -Dihydro-o-toluylsäure-amid wurden zu o-Toluylsäure bzw. o-Toluylsäure-amid dehydriert, die cis- Δ^5 -Tetrahydro-o-toluylsäure gelangte zum Teil unverändert in den Harn, welcher daneben aber auch Δ^6 -Tetrahydro-o-toluylsäure enthielt.

Von Verbindungen mit heterocyclischen Ringen führte das 1,2,3,4-Tetrahydro-chinolin nach subcutaner Injektion an Hunden zur Ausscheidung von 2-Oxy-chinolin⁴⁾. Der Hund kann also im Pyridinring hydriertes Chinolin dehydrieren, ein im Hinblick auf die Tatsache, dass das Nicotinsäure-amid Wirkungsgruppe wasserstoffübertragender Fermente ist, interessanter Befund. Nach H. v. Euler, P. Karrer und Mitarbeitern⁵⁾ beeinflussen das Guvacin, d. h. die 1,2,5,6-Tetrahydro-nicotinsäure und die Hexahydro-nicotinsäure das Wachstum von Staphylococcus aureus und Bacillus Proteus vulgaris in analoger Weise wie Nicotinsäure, diese Mikroorganismen sind also offenbar zur Dehydrierung der beiden hydrierten Säuren leicht befähigt.

Die Dehydrierung der Hexahydro-benzoesäure im Tierkörper bietet eine erwünschte Möglichkeit, das Verhalten des Wasserstoffes und seines schweren Isotopen den Fermenten gegenüber zu vergleichen, indem eine Bevorzugung von H oder D das Verhältnis der beiden in der ausgeschiedenen Benzoesäure verschieben müsste. Eine Cyclohexan-carbonsäure, die durch Hydrierung von Benzol-carbonsäure mit Deuterium erhalten wurde und demnach die Hälfte ihres Wasserstoffes als ${}_1\text{H}^2$ enthält, muss eine Benzoesäure mit dem gleichen Verhältnis H:D ergeben (vorausgesetzt, dass letztere nicht gleichzeitig aus anderen Quellen gebildet wird) oder aber im Falle, dass der leichte Wasserstoff sich anders verhält als der schwere, den ersteren oder den letzteren angereichert enthalten.

¹⁾ K. Bernhard, Z. physiol. Ch. **248**, 256 (1937).

²⁾ K. Bernhard, Z. physiol. Ch. **256**, 49 (1938).

³⁾ Ch. Grundmann und I. Löw, Z. physiol. Ch. **256**, 141 (1938).

⁴⁾ K. Bernhard, Z. physiol. Ch. **258**, 96 (1939).

⁵⁾ H. v. Euler, B. Högberg, P. Karrer, H. Salomon und H. Ruckstuhl, Helv. **27**, 382 (1944).

Zudem erlaubt uns die Anwendung von Deuterium als Indikator, die Dehydrierung der Hexahydro-benzoesäure auch beim Menschen und bei Tieren zu studieren, welche Benzoesäure bzw. Hippursäure als normales Stoffwechselprodukt in wechselnden Mengen ausscheiden und eine Vermehrung der letzteren nach Gaben von Cyclohexan-carbonsäure kein sicherer Beweis für stattfindende Dehydrierung wäre.

Es galt indessen zuerst festzustellen, ob der Wasserstoff der Hexahydro-benzoesäure nicht leicht austauscht und damit die Signierung dieser Verbindung fragwürdig wird. Durch Erhitzen von Hexahydro-benzoesäure in Deuterium-haltigem Wasser, dem Schwefelsäure oder Kaliumhydroxyd entsprechend der Konzentration einfacherer Lösungen zugefügt wurde, ergab sich ein gleichmässiger Austausch in saurem oder alkalischem Milieu. Die so behandelte, über das Alkalisalz zurückgewonnene Cyclohexan-carbonsäure wies einen D-Gehalt auf, der 11,5% desjenigen des verwendeten Wassers betrug. Es ist demnach neben dem Wasserstoff der polaren Gruppe mindestens ein „semilabiles“ H-Atom vorhanden, wahrscheinlich in α -Stellung zur COOH-Gruppe. Unter biologischen Voraussetzungen ist ein Wasserstoffaustausch nicht zu erwarten. Benzoesäure nahm unter analogen Bedingungen in schwerem Wasser in Gegenwart von Säure oder Alkali erhitzt, praktisch kein Deuterium auf.

Da Hunde, wie wir erneut feststellten, bei geeigneter Nahrung nur wenig, nach Fütterung von Hexahydro-benzoesäure aber viel Benzoesäure ausscheiden, haben wir an zwei verschiedene Tiere während 4 Tagen je 1 g einer Deuterio-hexahydro-benzoesäure verabreicht, die $36.05 \pm 0,15$ Atom-% D enthielt. Die aus dem Harn isolierte Benzoesäure wies $33.52 \pm 0,25$ und $34,57 \pm 0,25$ Atom-% D bzw. 93% und 96% der theoretisch möglichen D-Menge auf. Es darf daher angenommen werden, diese geringe Verdünnung werde durch gleichzeitig endogen aus anderen Quellen gebildete Benzoesäure bewirkt, und es bestehe im Verhalten des schweren und des leichten Wasserstoffes bei dieser Dehydrierung in vivo kein Unterschied.

Bei der Hydrierung von Benzoesäure mit Deuterium und Platin als Katalysator findet bei Verwendung von Eisessig als Lösungsmittel ein weitgehender Austausch des Deuteriums wahrscheinlich mit dem Wasserstoff der Carboxylgruppe der Essigsäure statt. Wir hydrierten z. B. 5 g Benzoesäure in 50 oder 80 cm³ Eisessig mit einem Deuterium-Wasserstoffgemisch aus 87 Atom-% D-haltigem Wasser und erhielten eine Hexahydro-benzoesäure mit nur 7,09 bzw. 4,40 Atom-% D. Der vereinigte Eisessig von beiden Hydrierungen wies 1,58 Atom-% D auf. In der Folge wurde dieser D-haltige Eisessig zur Gewinnung deuterierter Hexahydro-benzoesäure verwendet, indem er zur Lösung der Benzoesäure diente, welche mit Wasserstoff hydriert wurde. Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, dass sich auf diese Weise Hexahydro-benzoesäuren mit für unsere Zwecke

ausreichenden, unter biologischen Bedingungen nicht austauschenden Deuterium-Gehalten ergaben.

Tabelle 1.

Hydrierung von je 5 g Benzoesäure in D-haltigem Eisessig mit Wasserstoff

Vol. cm ³	Deuterio-Eisessig		Deuterio-Hexa- hydro-benzoesäure	
	Atom-% D		Atom- % D	D-Wert*)
	vor Hydrierung	nach Hydrierung		
50	1,58	1,36	1,16	74
50	1,58	1,35	1,15	73
35	1,58	1,20	1,12	71
35	1,58		1,08	69
50	1,41	1,27	0,95	67
43	1,35	1,14	0,89	65
50	1,15	1,00	0,83	72
50	1,15	1,05	0,77	67
50	1,15	0,94	0,62	54
50	1,15	0,95	0,64	56
50	0,97	0,83	0,68	70

$$*) \frac{\text{D-Gehalt der Hexahydro-benzoesäure}}{\text{D-Gehalt des Eisessigs}} \cdot 100$$

Wir haben an gesunde Versuchspersonen verschiedenen Alters und Geschlechts, die sich normal ernährten, im Verlaufe von 36 Stunden je 4 g D-haltige Hexahydro-benzoesäure verabreicht. In zwei Fällen (Versuchspersonen 1 und 2) wurde der Harn während 3 Tagen und einer anschliessenden zweitägigen Nachperiode, im übrigen während 2 Tagen und einem Tag Nachperiode gesammelt. Es zeigte sich nämlich, dass die Ausscheidung der D-haltigen Benzoesäure im Verlaufe von 48 Stunden, vom Zeitpunkt der Aufnahme der Hexahydro-benzoesäure an gerechnet, in der Hauptsache beendet ist. Die Benzoesäure aus dem Harn der Nachperiode weist nur geringe D-Werte auf. Aus Tabelle 2 ergibt sich, dass die Hexahydro-benzoesäure von allen Versuchspersonen dehydriert wird, wobei der Deuterium-Gehalt der isolierten Benzoesäure bei den Versuchen 3–6 etwa 70–78% desjenigen der verabreichten Cyclohexan-carbonsäure betrug. Etwa 3/4 der ausgeschiedenen Benzoesäure sind demnach durch Dehydrierung entstanden. Die tieferen Werte der Versuche 1 und 2 sind wohl dadurch bedingt, dass hier der Harn von 3 Tagen aufgearbeitet wurde, womit die Verdünnung durch anderweitig entstandene Benzoesäure stärker in Erscheinung trat. Ferner sind bei diesen Versuchen die Ausbeuten an Benzoesäure aus Hexahydro-benzoesäure geringer.

Tabelle 2.

Aufnahme von D-haltiger Hexahydro-benzoesäure durch Versuchspersonen bei üblicher Ernährung.

Versuchsperson			aufgenommene Deuterio-hexahydro-benzoesäure		Benzoessäure		
Nr.	Geschlecht	Alter Jahre	mg/kg/die	Atom-% D	der Hauptperiode*)		der Nachperiode
					Atom-% D	D-Wert	Atom-% D
1	m	18	45,8	1,14	0,68	60	0,06
2	w	24	50,1	0,89	0,51	57	0,03
3	m	16	47,5	0,88	0,61	70	0,03
4	m	41	45,8	1,16	0,90	78	0,03
5	w	47	44,3	0,68	0,53	78	0,07
6	m	52	40,0	0,68	0,49	72	0,06

*) Versuche 1—2: Benzoessäure aus Harn von 3 Tagen.

Versuche 3—6: Benzoessäure aus Harn von 2 Tagen.

Aus dem Harn eines Kaninchens, dessen Benzoe- bzw. Hippur-säure-Ausscheidung bei gleichbleibender Nahrung während vier und anschliessend sechs Tagen sich als nur geringfügig erwies, isolierten wir nach Gaben von 2 mal 1 g Hexahydro-benzoesäure 1,86 g oder 97 % der Theorie reine Benzoessäure. *Grundmann* und *Löw*¹⁾ beobachteten nach Verfütterung gewisser Substanzen an Kaninchen eine stark vermehrte Benzoessäureausscheidung, die mit dem verabreichten Produkt in keinem direkten Zusammenhang stand. Als Ursache nehmen sie eine von der applizierten Verbindung ausgehende

„Reiz- oder Giftwirkung an, welche Benzoessäure aus unbekanntenen Quellen im Organismus mobilisiert oder aber normale Stoffwechselfvorgänge an irgendeiner Stelle derart pathologisch verändert, dass gewisse Zwischenprodukte, die sonst weiter verbrennen, in Form von Benzoessäure stabilisiert werden“.

Fischer und *Bielig*²⁾ bestätigen diese gesteigerte Benzoessäurebildung bei Kaninchen und vermuten gleichfalls irgendwelche Beeinflussungen des normalen Stoffwechsels durch den zugeführten Fremdstoff.

Wir fanden in während 4 Tagen gesammeltem Harn eines Kaninchens, das per os täglich 1 g, im ganzen 4,00 g deuterierte Hexahydro-benzoesäure enthaltend 1,14 Atom-% D bekam, 2,03 g oder 53,4 % d. Th. reine Benzoessäure mit 1,08 Atom-% D bzw. einen D-Wert von 95 %. Aus dem Harn der viertägigen Nachperiode konnte präparativ keine Benzoessäure erhalten werden. Das Tier hatte demnach während der Fütterung von Hexahydro-benzoesäure nur minimale Benzoessäure-Mengen aus anderen Quellen gebildet und erstere rund zur Hälfte zu Benzoessäure dehydriert. Ein anderes

¹⁾ *Ch. Grundmann* und *I. Löw*, Z. physiol. Ch. **256**, 141 (1938).

²⁾ *F. G. Fischer* und *H.-J. Bielig*, Z. physiol. Ch. **266**, 73 (1940).

Kaninchen, das während 3 Tagen 3,00 g Hexahydro-benzoesäure mit 4,40 Atom-% D erhielt, lieferte mit dem Harn von 4 Tagen nur 0,76 g oder 26,72% d. Th. reine Benzoesäure, welche einen D-Gehalt von 0,99 Atom-% und damit einen D-Wert von nur 22,5% aufwies. Hier fand die Dehydrierung offenbar nur in einem mässigen Ausmasse statt, wobei anderweitig gebildete Benzoesäure stark zur Verdünnung der kleinen Menge D-haltiger beitrug. Die beiden Versuche dürften indessen genügen, um zu zeigen, dass auch das Kaninchen zur Dehydrierung der Cyclohexan-carbonsäure befähigt ist. Eine stark gesteigerte Benzoesäure-Ausschüttung im Sinne von *Grundmann* und *Löw* oder *Fischer* und *Bielig* konnten wir nicht beobachten, indessen dürften, insofern diese drei Versuche überhaupt zu einer solchen Beurteilung ausreichend sind, hinsichtlich der Dehydrierungsfähigkeit beim Kaninchen grosse individuelle Schwankungen bestehen.

Unsere früheren Befunde über die Dehydrierung der Cyclohexan-carbonsäure durch den Hund wurden am selben, jetzt nunmehr 12 Jahre alten Tier bestätigt, das nach täglichen Gaben von 1 g Hexahydro-benzoesäure während 8 Tagen 4,83 g oder 63,4% d. Th., nach Verabreichung von 4 g während 4 Tagen 2,309 g oder 60,6% d. Th. Benzoesäure ausschied.

Ferner verabreichten wir an junge Zwillingshunde, einer Nahrung bestehend aus je 1 kg gekochter Kartoffeln und 50 g Fleisch beigemischt, deuterierte Hexahydro-benzoesäure, und zwar an die Zwillinge A, AA täglich 1 g, im ganzen 8 g, an die Zwillinge B, BB während vier Tagen je 1 g. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, beträgt der D-Wert der ausgeschiedenen Benzoesäure bei den ersten über 90%, bei den zweiten Zwillingen rund 80%. Die nach Gaben von Cyclohexan-carbonsäure auftretende Benzol-carbonsäure verdankt ihre Bildung zum weitaus grössten Teil stattfindender Dehydrierung.

Tabelle 3.

Fütterung von D-haltiger Hexahydro-benzoesäure an männliche junge Hunde.

Hunde		aufgenommene D-Hexahydro- benzoesäure		ausgeschiedene Benzoesäure	
Bezeichnung	Alter Monate	mg/kg/die	Atom-% D	Atom-% D	D-Wert
A	6	77	1,10	1,05	96
AA	6	72	0,95	0,88	93
B	10	69	0,82	0,67	82
BB	10	68	0,82	0,66	81

Der Einwand von *Grundmann* und *Löw*, man müsste auch beim Hund, ähnlich wie beim Kaninchen, mit spontanen Benzoesäureausschüt-

tungen rechnen, und die Bemerkung, es wäre deshalb bei der Auswertung unserer früheren Versuchsergebnisse, zum mindesten was die quantitative Seite anbelangt, eine gewisse Zurückhaltung geboten, sind daher völlig unbegründet.

Bei diesen jungen Tieren sind die Ausbeuten an Benzoesäure nach Cyclohexan-carbonsäure-Fütterung etwas geringer als im oben genannten Falle des 12-jährigen Tieres. In Anbetracht der hohen D-Werte folgt, dass die angebotene Hexahydro-benzoesäure bei diesen jungen Hunden in einem geringen Ausmasse dehydriert wird. Durch ätherische Extraktion der sauren Harne und anschliessende Destillation der Extrakte mit Wasserdampf wurden Gemische gewonnen, die neben Benzoesäure offenbar unverändert ausgeschiedene Hexahydro-benzoesäure enthielten. Die Isolierung und Rein-Darstellung der Benzoesäure musste durch wiederholte Vakuum-Sublimation und anschliessendes Umkrystallisieren aus Wasser erfolgen, um D-haltige Hexahydro-benzoesäure völlig zu entfernen. Das verlustreiche Verfahren führte bei den Tieren A und AA zu Ausbeuten von 19,5 und 24,3, bei den Hunden B und BB zu solchen von 33,2 und 24,7 % d. Th. Die wirklich ausgeschiedenen Mengen dürften aber höher liegen.

Schliesslich haben wir D-haltige Hexahydro-benzoesäure auch parenteral appliziert, um erneut zu zeigen, dass die Dehydrierung nicht auf die Tätigkeit der Darmbakterien zurückzuführen ist. Den beiden Hunden A und AA wurden im Verlaufe von 6 Tagen 6 g deuterierte Cyclohexan-carbonsäure subcutan injiziert; aus der Tabelle 4 ist ersichtlich, dass die D-Werte etwas niedriger sind als nach Verfütterung. Indessen betragen auch die Ausbeuten an reiner Benzoesäure nur 7,3 und 11,5 %, womit der Verdünnungseffekt durch nicht im Zusammenhang mit der verabreichten Hexahydro-benzoesäure sich bildende Benzoesäuremengen sich stärker bemerkbar macht.

Tabelle 4.

Subcutane Injektion D-haltiger Hexahydro-benzoesäure an 6 Monate alte, männliche Hunde.

Hund	D-Hexahydro-benzoesäure		ausgeschiedene Benzoesäure	
	mg/kg/die	Atom-% D	Atom-% D	D-Wert
A	77	0,72	0,56	78
AA	73	0,72	0,53	74

Mit Nieren-, Leber- und Muskelbrei von Hunden und Pferden gelang es uns bis jetzt noch nicht, Hexahydro-benzoesäure zu dehydrieren.

Experimentelles.

Austauschreaktionen: Chemisch reine Hexahydro-benzoesäure oder Benzoesäure wurden in 4 Atom-% D-haltigem Wasser, dem bis zu einer Konzentration einfach normaler Lösungen Kaliumhydroxyd oder konz. Schwefelsäure zugefügt wurde, während 24 Stunden auf freier Flamme erhitzt. Anschliessend haben wir mit Wasser verdünnt, gegebenenfalls mit Kalilauge versetzt, angesäuert und ausgeäthert. Die Äther-Rückstände wurden in wenig Kalilauge aufgenommen, wieder mit HCl angesäuert und erneut ausgeäthert. Gewinnung der reinen Säuren durch Umkrystallisieren aus Äther nach Trocknen des Äther-Extraktes im Exsikkator.

Tabelle 5.

Austausch von		D-haltige Lauge cm ³	D-haltige Säure cm ³	Atom-% D der Hexahydro-benzoesäure, bzw. Benzoesäure nach Austausch
	mg			
Hexahydro-benzoesäure	300	25	—	0,44
„ „	1000	50	—	0,46
„ „	300	—	25	0,47
Benzoesäure	1000	50	—	0,02
„	500	—	25	0,05

Herstellung von D-haltiger Hexahydro-benzoesäure.

5 g chemisch reine Benzoesäure wurden in 40 cm³ Äther gelöst und in Gegenwart von 4,1 g Platinoxid (Katalyt hergestellt nach *Adams*) mit Deuterium hydriert. Nach Abdestillieren des Äthers destillierten wir den Rückstand im Vakuum.

D-Bestimmung: Einwage: 25,53 mg Deuterio-hexahydro-benzoesäure
482,78 mg Stearinsäure
D-Gehalt: 51,4 ± 0,6%

C, H-Bestimmung: Gef. C 62,67; 62,82 H 9,02; 9,34%
C₆H₈D₆O₂ Ber. „ 62,69 —

Das Präparat ging leider verloren. Die folgenden Hydrierungen mussten mit einem Deuterium-Wasserstoff-Gemisch aus ca. 88 Atom-% D-haltigem schwerem Wasser durchgeführt werden. Je zweimal 5 g Benzoesäure in ca. 50 cm³ Äther damit hydriert, ergaben nach Reinigung über das Natriumsalz eine D-Hexahydro-benzoesäure von folgendem D-Gehalt:

Einwage: 25,8 mg D-Hexahydro-benzoesäure + 554,9 mg gew. Hexahydro-benzoesäure
D-Gehalt der Säure: 35,91 Atom-%

Einwage: 21,8 mg D-Hexahydro-benzoesäure + 591,0 mg gew. Hexahydro-benzoesäure
D-Gehalt der Säure: 36,20 Atom-%
Mittelwert: 36,05 ± 0,15 Atom-% D.

Die Herstellung von Cyclohexan-carbonsäure mit niederen D-Gehalten wurde bereits angegeben. Als Deuteriumquelle und Lösungsmittel diente Eisessig, dessen Carboxylgruppe wohl das Deuterium enthält. Nach beendeter Hydrierung mit Wasserstoff haben wir den Katalyten abgetrennt und die Essigsäure im Vakuum abdestilliert. Gewinnung der Hexahydro-benzoesäure über das Alkalisalz.

Stoffwechselversuche.

Die verabreichten Präparate von D-Hexahydro-benzoesäure waren analysenrein und verursachten, als Natriumsalze in wässriger Lösung aufgenommen, keine Störungen. Den während der Versuchsperiode ausgeschiedenen Harn haben wir in der Regel nach Filtration über Kieselgur bei leicht alkalischer Reaktion im Vakuum auf ein kleineres

Volumen eingengt und diese Konzentrate nach Ansäuern erschöpfend mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherischen Extrakte wurden zur Gewichtskonstanz gebracht und anschließend in Mengen von ca. 3 g mit Schwefelsäure (entsprechend einer Konzentration von ca. 30% H_2SO_4) im Wasserdampf destilliert. Modellversuche ergaben, dass dem Harn zugesetzte Hippursäure (z. B. 50 cm³ Harn + 206, 227 oder 103 mg) sich zu rund 94% wieder auffinden liess. Aus den Wasserdampf-flüchtigen Anteilen erhielten wir durch Sublimation im Vakuum im allgemeinen leicht reine Benzoesäure. Lagten indessen Gemische von Benzoe- mit Hexahydro-benzoesäure vor, so führte die Vakuum-Sublimation nicht zum Ziel. Hier war eine Abtrennung reiner Benzoesäure nur durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Wasser zu erreichen. Die zur D-Analyse gelangende Benzoesäure war analysenrein.

a) Versuche an Menschen.

Die Aufarbeitung der nach Aufnahme von je 4 g Hexahydro-benzoesäure während 2 bzw. in 2 Fällen (Nr. 1 und 2) während 3 Tagen gesammelten Harne führte zu den in Tabelle 6 angegebenen Mengen an Äther-Extrakt, Wasserdampf-flüchtigem und reiner Benzoesäure. Die Tabelle enthält gleichzeitig die für die 24-stündige Nachperiode gefundenen Werte. Bei den Versuchen 1, 2 und 3 haben wir den Harn an zwei aufeinander folgenden Tagen nach Abschluss der Hauptperiode gesammelt; die für diese Versuche angegebenen Daten stellen das Mittel von 2 Tagen dar.

Tabelle 6.

Äther-Extrakte, Wasserdampf-flüchtiges und reine Benzoesäure aus den Harnen der Haupt- und Nachperiode.

Versuchs-Person Nr.	Äther-Extrakt g	Wasserdampf-flüchtiges g	reine Benzoesäure g
A. Harne der Hauptperiode (2 Tage)			
1	16,240	5,421	4,820*)
2	11,183	5,232	4,594*)
3	14,502	4,980	4,460
4	15,858	4,834	4,424
5	9,295	4,828	4,364
6	13,706	4,178	3,683
B. Harne der Nachperiode (1 Tag)			
1	3,429	1,286	0,913
2	2,566	0,925	0,783
3	2,146	0,691	0,500
4	3,043	0,833	0,713
5	1,849	0,903	0,705
6	1,356	0,425	0,332

*) pro 3 Tage.

Auf Grund dieses Zahlenmaterials besteht die Möglichkeit, die prozentualen Ausbeuten an Hexahydro-benzoesäure zu berechnen. Es ist von der nach Hexahydro-benzoesäure-Gaben aufgefundenen Benzoesäure die von den entsprechenden Individuen unter normalen Bedingungen gebildete Benzoesäure in Abzug zu bringen, die sich aus der Untersuchung der Nachperiode ergibt. Wir erhalten somit:

für Versuch 1:	4,820	—	3·0,913	=	2,081 g	oder	54,6%	der Theorie	Benzoessäure
„ „	2:	4,594	—	3·0,783	=	2,245 g	„	58,9%	„ „ „
„ „	3:	4,460	—	2·0,500	=	3,460 g	„	90,8%	„ „ „
„ „	4:	4,424	—	2·0,713	=	2,998 g	„	78,6%	„ „ „
„ „	5:	4,364	—	2·0,705	=	2,954 g	„	77,5%	„ „ „
„ „	6:	3,683	—	2·0,332	=	3,019 g	„	79,2%	„ „ „

b) Versuche an Kaninchen.

Die drei Tiere Nr. 1, 2 und 3 im Gewicht von 1,95, 2,40 und 4,50 kg wurden in Stoffwechselkäfigen mit Runkelrüben (Nr. 1) bzw. mit gekochten Kartoffeln (Nr. 2 und 3) gefüttert. Die Hexahydro-benzoessäure wurde mit der Schlundsonde verabreicht. Dosen per kg/die: 513, 418 und 223 mg. Tier Nr. 1 schied während der Vorperiode im Verlaufe von 4 Tagen täglich 15,5, während 6 Tagen täglich 14,8 mg Benzoessäure aus. Unter Berücksichtigung dieser normalen Benzoessäure-Bildung reduziert sich die nach Hexahydro-benzoessäure-Fütterung erhaltene Menge entsprechend $1,857 - 5 \times 15$ mg auf 1,782 g und die prozentuale Ausbeute damit auf 93,5%. Bei Tier Nr. 2 führte die Aufarbeitung der Harn von 2 je 2 Tage dauernden Nachperiode zu 161 und 201 mg Wasserdampf-flüchtigen, braun-gelb gefärbten, schmierigen Anteilen, aus denen keine Krystalle von Benzoessäure zu erhalten waren. Beim Versuch mit Tier Nr. 3 ging bei der Aufarbeitung ein Teil des Äther-Extraktes verloren, weshalb mengenmässige Angaben nicht mehr möglich sind.

c) Versuche an Hunden.

Der 12 Jahre alte, weibliche Hund M bekam mit der Fütterung pro kg/die 87 und 93 mg Hexahydro-benzoessäure. Bei der gewählten Nahrung von 150—200 g Reis und 50 g magerem Pferdefleisch erhielt der Harn normalerweise weder Hippur- noch Benzoessäure in merklichen Mengen.

Fütterung der 36,05 Atom-% D-haltigen Präparate:

Hund M erhielt pro kg/die 95 mg schwere Hexahydro-benzoessäure dem oben genannten Futter beigemischt. Menge des Äther-Extraktes 5,381 g des Wasserdampf-flüchtigen 2,757 g und der reinen Benzoessäure 0,913 g oder 24,0% der Theorie.

D-Analyse: Einwage: 28,7 mg D-Benzoessäure + 499,4 mg gew. Benzoessäure
 Atom-% D der Säure: 33,76
 Einwage: 34,0 mg D-Benzoessäure + 597,0 mg gew. Benzoessäure
 Atom-% D der Säure: 33,28
 Mittel: $33,52 \pm 0,25$ Atom-% D

Hund A erhielt pro kg/die 69 mg schwere Hexahydro-benzoessäure. Menge des Äther-Extraktes 4,189 g, des Wasserdampf-flüchtigen 1,853 und der reinen Benzoessäure 0,447 g oder 11,7% der Theorie.

D-Analyse: Einwage: 25,6 mg D-Benzoessäure + 612,5 mg gew. Benzoessäure
 Atom-% D: $34,57 \pm 0,25$

Versuche mit den Zwillingshunden.

Die Resultate der Harnaufarbeitungen (Hauptperiode) nach Fütterung der Cyclohexan-carbonsäure sind wieder tabellarisch dargestellt.

Hund	Äther-Extrakt g	Wasserdampf-flüchtiges g	reine Benzoessäure g	Bemerkungen
A	8,528	4,262	1,484	{ Harn von 8 Tagen
AA	15,351	4,993	1,854	
B	4,595	1,955	1,266	{ Harn von 7 Tagen
BB	4,752	1,303	0,942	

Die subcutanen Injektionen der exakt neutralisierten D-Hexahydro-benzoesäure verursachten keinerlei Schädigungen. Der Harn wurde während 7 und als Nachperiode während 3 Tagen gesammelt.

Bei Tier A erhielten wir aus dem Harn der Nachperiode 8,814 g Äther-Extrakt, 3,288 g Wasserdampf-flüchtiges und 0,419 g oder 7,33% der Theorie reine Benzoesäure. Aus dem Harn der Nachperiode ergab sich präparativ keine reine Benzoesäure.

Für das Tier AA betragen diese Werte in gleicher Reihenfolge 8,647, 3,779 und 0,660 g oder 11,5% der Theorie reine Benzoesäure.

Hrn. *Karl Schmid* danken wir für geschickte experimentelle Hilfe.

Zusammenfassung.

Frühere Befunde über die Umwandlung der Hexahydro-benzoesäure zu Benzoesäure im Tierkörper erfuhren eine Erweiterung. Da der Mensch und z. B. das Kaninchen in wechselnden Mengen Benzoe- bzw. Hippursäure als normales Stoffwechselprodukt ausscheiden, ist ein vermehrtes Auftreten derselben nach Gaben von Cyclohexan-carbonsäure kein sicherer Beweis für stattfindende Dehydrierung. Mit Hilfe von Deuterium als Indikator, d. h. durch Herstellung und Verabreichung D-haltiger Hexahydro-benzoesäure konnte gezeigt werden, daß Mensch, Hund und Kaninchen zu dieser Dehydrierung befähigt sind. Die Aromatisierung des Cyclohexanringes ist im Tierkörper in vielen Fällen leicht möglich.

Die Dehydrierung der Deuterio-hexahydro-benzoesäure führt beim Hund zu einer Benzoesäure, die — abgesehen von geringen, durch aus anderen Quellen gebildete Benzoesäure bedingten Verdünnungen — das gleiche Verhältnis von H:D aufweist. In diesen Versuchen konnte somit kein Unterschied im Verhalten des leichten und des schweren Wasserstoffes den dehydrierenden Fermenten gegenüber beobachtet werden.

Die Hydrierung der Benzoesäure mit Deuterium in Eisessig führt zu einem weitgehenden Austausch des Carboxyl-Wasserstoffes der Essigsäure mit dem Deuterium. So entstandener D-haltiger Eisessig überträgt bei der Hydrierung mit Wasserstoff sein Deuterium auf die Benzoesäure.

Für diese Arbeit standen Mittel aus einer Schenkung der „*Vita-Lebensversicherungs-Aktiengesellschaft in Zürich*“ an die medizinische Fakultät zur Verfügung. Wir danken für diese Unterstützung bestens.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich.
