

## 77. Beiträge zum biologischen Abbau der Ölsäure

von Karl Bernhard und Urs Gloor<sup>1)</sup>.

(26. I. 52.)

Von allen natürlich vorkommenden Fettsäuren dürfte die Ölsäure die grösste Verbreitung aufweisen. Über ihr Schicksal im tierischen Organismus sind wir indessen nur unvollständig unterrichtet. *Lehninger*<sup>2)</sup> bewies kürzlich ihre Oxydation zu Kohlensäure und Acetessigsäure durch Bebrütung mit Mitochondrien aus Rattenleber.

Man war jedenfalls früher geneigt, in den ungesättigten Bindungen der Fettsäuren bevorzugte Angriffspunkte auch der biologischen Oxydation zu sehen. Nach *Erber*<sup>3)</sup> soll menschliches Chylusfett zu  $\frac{1}{5}$  aus Oxysäuren bestehen, und *Artom*<sup>4)</sup> will in den Gesamtfettsäuren aus den Lipiden der Thoracicus-Lymphe des Hundes nach Fettresorption 2—17% Oxysäuren nachgewiesen haben. Aus Ölsäure müsste 9,10-Dioxystearinsäure entstehen, welche bei der Oxydation in vitro Diketostearinsäure und schliesslich Azelainsäure gibt. Letztere vermögen Mensch und Hund in einem wesentlichen Ausmass abzubauen, sie wird aber teilweise auch im Harn ausgeschieden<sup>5)</sup>, welcher normalerweise keine höheren Dicarbonsäuren aufweist. Würden solche Verbindungen im Stoffwechsel entstehen, so müssten sie zu einer Verdünnung angebotener, D-markierter Dicarbonsäuren führen, die mit niedrigerem Isotopengehalt im Harne aufträten. Mit Fett zusammen verabreichte, signierte Sebacin-, Kork- oder Adipinsäure gelangen beim Menschen und Hund mit unverändertem Isotopengehalt zur Ausscheidung<sup>6)</sup>. Der Bildung höherer Dicarbonsäuren durch  $\omega$ -Oxydation aus natürlichen Fetten kommt somit keine quantitative Bedeutung zu. Im Kuhharn aufgefundene kleine Mengen von Pimelinsäure<sup>7)</sup> stehen vielleicht in Zusammenhang mit der Rindertuberkulose, nachdem *Lederer*<sup>8)</sup> in der Aminopimelinsäure einen Bestandteil der Lipide aus Tuberkelbazillen nachwies.

Es schien uns von Interesse, das Verhalten der Ölsäure im Hinblick auf eine mögliche Oxydation ihrer Doppelbindung in vivo zu untersuchen. Wir haben dabei wie früher<sup>6)</sup> die bereits erwähnte Iso-

<sup>1)</sup> Vgl. Diss. *U. Gloor*, die demnächst erscheint.

<sup>2)</sup> *E. P. Kennedy & A. L. Lehninger*, *J. Biol. Chem.* **185**, 275 (1950).

<sup>3)</sup> *F. Erber*, *Z. physiol. Ch.* **30**, 436 (1900).

<sup>4)</sup> *C. Artom*, *Biochem. e Terap. sperim.* **23**, 249 (1936).

<sup>5)</sup> *K. Bernhard*, *Z. physiol. Ch.* **246**, 133 (1937).

<sup>6)</sup> *K. Bernhard*, *Helv.* **24**, 1412 (1941).

<sup>7)</sup> *J. H. Mueller*, *Science* **85**, 502 (1937); *J. biol. Chem.* **119**, 121 (1937); *J. Bacter.* **34**, 163 (1937/38).

<sup>8)</sup> *J. Asselineau & E. Lederer*, *Exper.* **7**, 281 (1951).

topentechnik herangezogen, also gleichzeitig eines der zu erwartenden Intermediärprodukte einer solchen Spaltung, die Azelainsäure (30–60 mg/kg/die), mit einem bekannten Deuteriumgehalt verabreicht. Aus dem Harn isolierten wir dann ihren nicht abgebauten Anteil, den wir wieder auf schweren Wasserstoff prüften. Es zeigte sich, dass bei gesunden Versuchspersonen und normaler Ernährung nur eine geringe Verdünnung der D-Konzentration wahrnehmbar ist und die wieder aufgefundene Azelainsäure 7,70 statt 7,85 bzw. 5,04 statt 5,31 Atom % D aufwies.

Wir versuchten in der Folge, die Stabilität der doppelten Bindung in Stellung 9,10 zu prüfen und verfütterten an Hunde mit einem normalen Futter gleichzeitig D-Azelainsäure und Oleylalkohol. Im Harn fanden sich keine mit letzterem in Verbindung stehende Abbauprodukte und die Azelainsäure änderte ihren D-Gehalt nicht. Dasselbe war der Fall (s. Tab. 1), wenn die Essigsäure- oder Benzoesäureester dieses Alkohols gegeben wurden, welche das Tier offenbar ohne Schwierigkeiten verseift.

Tabelle 1.

Fütterung von Oleylalkohol usw. an Hunde bei gleichzeitigen Gaben von D-Azelainsäure (5,31 Atom % D).

Hund	Verbindung	mg/kg/die	D-Gehalt der ausgeschiedenen Azelainsäure
S	Oleylalkohol . . . . .	400	5,29
L	Oleylacetat . . . . .	100	5,24
S	Oleylbenzoat . . . . .	180	5,30
S	Ölsäure-N-butylamid . . . . .	125	5,15

Es ist anzunehmen, der Oleylalkohol werde leicht zu Ölsäure oxydiert, nachdem aus Untersuchungen von *Schönheimer & Stetten*<sup>1)</sup> bekannt ist, dass Cetylalkohol im Organismus der Ratte in Palmitinsäure und Octadecylalkohol in Stearinsäure übergehen. Oleylalkohol wurde auch nach Fütterung grösserer Mengen (600 mg/kg/die) im Harn nicht ausgeschieden.

Ein Versuch, die  $\beta$ -Oxydation durch Einführung einer Amid-Bindung zu verhindern oder zu verzögern und damit die Chancen für einen Angriff an der Doppelbindung oder der endständigen Methylgruppe zu verbessern, blieb erfolglos. Die signierte Azelainsäure erschien auch nach Gaben von Ölsäure-N-butylamid mit unverändertem D-Gehalt im Harn. Auch letzteres wird demnach gespalten und ebenso das Ölsäure-diäthylamid, obgleich dieses keinen Peptid-Wasserstoff mehr aufweist. Wir isolierten nach Fütterung dieser Verbindung jedoch mit ihr offenbar im Zusammenhang stehende kleine Mengen Bernsteinsäure aus dem Harn. Sie würden ihre Bildung einer Methyl-

<sup>1)</sup> D. Stetten jr. & R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. 133, 347 (1940).

und anschliessenden  $\beta$ -Oxydation zum Bernsteinsäure-halbamid verdanken, das bei der Aufarbeitung, d. h. bei der Salzsäurebehandlung des ätherischen Harnextraktes, gespalten werden könnte. Unser Versuchstier schied bei normaler Fütterung keine Bernsteinsäure aus, desgleichen auch nicht nach Gaben von Diäthylamin. Eine Hemmung der Succinodehydrogenase durch das verabreichte Ölsäureamid als Ursache des Auftretens der Bernsteinsäure dürfte daher kaum in Betracht zu ziehen sein<sup>1)</sup>, vielmehr ist ersichtlich, dass dieses Ölsäure-Derivat wohl  $\omega$ -oxydiert, nicht aber an der Doppelbindung gespalten wird. Es schien uns nach diesen Erfahrungen nicht angezeigt, Fütterungen mit *D*-Azelainsäure und Ölsäure-diäthylamid durchzuführen. Weitere Versuche, eine weniger leicht spaltbare Verbindung mit der COOH-Gruppe der Ölsäure herzustellen, bleiben natürlich ebenfalls auf einigermassen resorbierbare und nicht toxisch wirkende Substanzen beschränkt. Wir haben Ölsäureanilid verfüttert, aber weder diese Verbindung noch mögliche Abbauprodukte im Harn der Versuchstiere auffinden können. Die Anilid-Bindung ist gegenüber den Säureamidasen auch nicht widerstandsfähig.

Nachdem die Doppelbindung der Ölsäure sich *in vivo* einer Oxydation zur Dioxy- und Diketosäure nicht zugänglich erwies, versuchten wir festzustellen, ob dem Organismus indessen die Spaltung dieser beiden letzteren Säuren gelinge. Die 9,10-Dioxystearinsäure wurde im Butterfett aufgefunden, kann demnach ein Bestandteil der Nahrung sein und entsteht beim Peroxyd-Ranzigwerden der Fette. Diese Oxysäure ist, wie wir feststellten, nur zu 50–60% resorbierbar. Ihre gemeinsame Verfütterung mit Azelainsäure in kleinen Mengen konnte also schon aus diesem Grunde zu keiner wesentlichen Verdünnung des *D*-Gehaltes letzterer führen (vgl. Tab. 2). Sobald indessen durch besondere Massnahmen, z. B. Emulgierung mit Tween-Olivenöl, die Resorptionsverhältnisse verbessert wurden und z. B. 70% betrug, ging der *D*-Gehalt der aus dem Harn isolierten Azelainsäure zurück (vgl. Tab. 2).

Die an den beiden Hydroxylgruppen mit Ameisensäure veresterte Dioxystearinsäure bewirkte eine noch ausgeprägtere Verdünnung der *D*-Azelainsäure. Es besteht deshalb kein Zweifel, dass zur Resorption gelangende Oxysäure zu Azelainsäure abgebaut wird.

Schliesslich haben wir die 9,10-Diketostearinsäure, welche mit Olivenöl emulgiert vom Hunde zu etwa 75% resorbiert wurde, verfüttert. Auch für diese Verbindung konnte eine Spaltung zu Azelainsäure beobachtet werden. Die Deuterio-Azelainsäure büsste dabei 35 bzw. 36% ihres Isotopengehaltes durch Verdünnung mit aus der Ketosäure stammenden, nicht signierten Molekeln ein.

<sup>1)</sup> K. Bernhard & H. Lincke, *Helv.* **29**, 1457 (1946).

Unsere Versuche beweisen eindeutig, dass in vivo eine Oxydation an der Doppelbindung der Ölsäure im Sinne der Bildung merklicher Mengen von Dioxy- bzw. Diketosäuren nicht stattfindet. Verabreicht man indessen diese letzteren Verbindungen, so werden sie gespalten und teilweise in Azelainsäure übergeführt, was sich auf Grund der Isotopenverdünnung gleichzeitig verfütterter, deuterierter Azelainsäure zeigen liess. Es ist nicht anzunehmen, es handle sich dabei um eine im Darm durch bakterielle Tätigkeit bedingte Reaktion. Die bei einem der Selbstversuche beobachtete geringe Isotopen-Verdünnung (sie liegt ausserhalb der Fehlergrenze der D-Bestimmungsmethode) könnte durch Azelainsäure-Bildung aus in dem Nahrungsfett enthaltener Dioxystearinsäure bedingt sein.

**Tabelle 2.**

Fütterung von Dioxystearinsäure und Diketostearinsäure an Hunde bei gleichzeitigen Gaben von D-Azelainsäure (5,31 Atom % D).

Hund	Verbindung	mg/kg/die	ausgeschiedene Azelainsäure	
			Atom % D	Verdünnung in %
S	Dioxystearinsäure . . . . .	120	5,07	4,5
S	Dioxystearinsäure in Eiweisseemulsion	250	5,04	5
B	Dioxystearinsäure in Olivenölemulsion	250	4,84	9
B	Dioxystearinsäure in Olivenöl/Tweenemulsion . . . . .	350	4,73	11
A	Formoxystearinsäure . . . . .	450	4,24	20
S	Diketostearinsäure in Olivenöl . . .	250	3,43	35
A	Diketostearinsäure in Olivenöl . . .	250	3,39	36

Eine von der COOH-Gruppe aus beginnende Oxydation der Ölsäure würde die Lage der Doppelbindung zweifellos verändern. Nach unseren heutigen Vorstellungen wird die  $\beta$ -Oxydation durch die Bildung einer  $\alpha$ - $\beta$ -ständigen ungesättigten Bindung eingeleitet. Inwiefern letztere eine bereits vorhandene Doppelbindung beeinflusst, ist nicht bekannt. Vielleicht wird überhaupt nicht die Ölsäure, sondern die Stearinsäure abgebaut. Hydrierung bzw. Dehydrierung dieser beiden  $C_{18}$ -Säuren sind dem Organismus vertraute Vorgänge<sup>1)</sup>. Sie gelten auch für die Palmitinsäure bzw. Palmitoleinsäure<sup>2)</sup>. Möglicherweise erfolgt die Ölsäurebildung vor allem im Hinblick auf die Flüssighaltung der Lipidbestände, ein Effekt, welcher, wie Weitzel<sup>3)</sup> kürzlich zeigte, für Fette der Bürzel-Drüse der Gans durch Synthese verzweigter, nicht aber ungesättigter Fettsäuren erzielt wird.

<sup>1)</sup> R. Schoenheimer & Rittenberg, J. Biol. Chem. **113**, 505 (1936).

<sup>2)</sup> Stetten & R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. **133**, 329 (1940).

<sup>3)</sup> G. Weitzel, Z. physiol. Ch. **288**, 251 (1951).

### Experimentelles.

Die verwendeten Hunde, zwei männliche, A. und B., im Alter von 7—8 Monaten, und zwei weibliche ca. 1 ½ Jahre alte Tiere, L. und S., wurden in Stoffwechsellkäfigen gehalten, welche eine weitgehend quantitative Sammlung der Ausscheidungen erlaubten. Der einheitlichen Nahrung aus gekochtem Reis und wenig magerem Pferdefleisch haben wir die zu prüfende Verbindung stets analysenrein in bekannten Mengen möglichst homogen beigemischt und damit auf Grund früherer Erfahrungen an der Applikation kleiner täglicher Dosen während 10—14 Tagen festgehalten. Störungen traten nicht ein, das angebotene Futter wurde immer völlig verzehrt. An jeden Versuch schloss sich eine dreitägige Nachperiode an, während welcher der Harn weiterhin gesammelt und mit der Hauptmenge vereinigt wurde.

**Harnaufarbeitung.** Handelte es sich lediglich um die Isolierung der Azelainsäure, so engten wir die täglichen, alkalisch gemachten Harnmengen nach Filtration über Hyflo-Supercell im Vakuum auf ein kleines Volumen ein und extrahierten diese vereinigten, mit Salzsäure angesäuerten Konzentrate (500—1000 cm<sup>3</sup>) in einem rasch rührenden *Kutscher-Steudel*-Apparat 10 Std. mit Äther. Die Rückstände der ätherischen Auszüge wurden aus heissem Wasser, unter Verwendung von etwas Kohle, umkristallisiert, was zu roher Azelainsäure führte, deren völlige Reinigung ein 6—7maliges Umkristallisieren aus Wasser erforderte. Die Smp. der analysenreinen Säuren wurden auf dem *Kofler*-Block ermittelt, die Deuteriumbestimmungen wie in früheren Arbeiten durchgeführt.

War die Entstehung unbekannter, schwer ätherlöslicher Verbindungen zu vermuten, so schüttelten wir den filtrierte Tagesharn bei kongosaurer Reaktion sechsmal mit 500 cm<sup>3</sup> Äther während je 4—6 Std. auf einer Schüttelmaschine. Dabei auftretende Emulsionen zerstörten wir durch Zentrifugieren. Den extrahierten, alkalischen Harn brachten wir im Vakuum auf ein kleines Volumen und schüttelten das wieder angesäuerte Konzentrat von ca. 1000 cm<sup>3</sup> sechsmal mit je 500 cm<sup>3</sup> Äther und anschliessend sechsmal mit je 500 cm<sup>3</sup> Essigester. Die weitere Aufarbeitung der so gewonnenen Extrakte richtete sich nach den zu erwartenden Substanzen.

In einigen Fällen hielten wir uns an die Angaben von *Weitzel*<sup>1)</sup>.

**Aufarbeitung der Faeces.** Sie wurden im Turmix mit verdünnter Salzsäure kurz homogenisiert und nach Trocknung im Vakuum bei 35—40° in einer Mühle pulverisiert. In diesem Zustand erfolgte ihre Extraktion mit Äther im Soxhlet. Den Rückstand der ätherischen Extrakte kristallisierten wir aus geeigneten Lösungsmitteln unter Verwendung von Tierkohle um oder nahmen Reinigungen durch Hochvakuumdestillationen im Kugelrohr vor.

**Verabreichung von D-Azelainsäure an Versuchspersonen.** Azelainsäure erhielten wir durch Oxydation mit KMnO<sub>4</sub> von Ricinolsäure, welche wir aus Ricinusöl gewannen. Zur Deuterierung wurden 50 g Azelainsäure mit 60 g 50-proz. D<sub>2</sub>O und 60 g KOH während 54 Std. in einem Schüttelautoklaven auf 140° erwärmt. Smp. der aus Wasser umkristallisierten Säure 106—107°. Mischsmp. 106—107°. D-Gehalt: 5,31 Atom % (Mittel aus 6 Bestimmungen).

C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> (188,22) Ber. C 57,45. H 8,51% Gef. C 57,49 H 8,48%

Zur Kontrolle der Stabilität der vorgenommenen Signierung kochten wir eine Probe von 1 g deuterierter Säure als Na-Salz mit 50 cm<sup>3</sup> Wasser 24 Std. am Rückfluss und bestimmten anschliessend den D-Gehalt. Er betrug im Mittel 5,27 Atom % D. Diese Verdünnung liegt innerhalb der Fehlergrenze der Messmethode. 1 g gewöhnliche Azelainsäure als Na-Salz während 24 Std. in 5-proz. schwerem Wasser erhitzt, zeigte keinen messbaren D-Gehalt.

*Versuch 1:* U.G., 25 Jahre alt, nahm während 5 Tagen insgesamt 5 g als Na-Salz mit gewöhnlicher Nahrung (pro kg/die 13 mg). Aus der Harnmenge von 5,2 l erhielten wir rohe bzw. analysenreine D-Azelainsäure im Ausmass von 60 bzw. 44% zurück.

*Versuch 2:* Versuchsperson K.B., 44 Jahre alt, erhielt während 3 Tagen total 3 g D-Azelainsäure (pro kg/die 17 mg). Harnmenge 2,7 l. Ausbeute an D-Azelainsäure 38 bzw. 18%.

<sup>1)</sup> G. Weitzel, Z. physiol. Ch. **287**, 254 (1951).

Fütterung von Oleylalkohol. Ölsäurebutylester (Sdp. 0,7 mm Hg 180–185°) erwärmen wir in Butanol mit Natrium bis zum Aufhören der Wasserstoffentwicklung. Der entstandene Alkohol wurde durch Wasserzugabe abgeschieden, mit Kochsalzlösung ausgewaschen und im Hochvakuum destilliert. Sdp. 0,02 mm Hg 140–142°. Farblose Flüssigkeit. JZ 93,3 (ber. 94,5). Spektrum<sup>1)</sup>: Maximum bei 2320 Å, molare Extinktion  $\log \epsilon = 2,67$ . Ferner haben wir Oleylalkohol aus einem, aus Norwegen erhältlichen Produkt „Cet-alol D“ durch dreimaliges Fraktionieren über eine heizbare „Widmer-Kolonne“ im Hochvakuum analysenrein gewonnen.

$C_{18}H_{36}O$  (268,4) Gef. C 80,45 H 13,48% Ber. C 80,59 H 13,52%

*Versuch 3:* Hund L. erhielt während 10 Tagen 80 g Oleylalkohol oder pro kg/die ca. 400 mg. Die Harnmenge von 12 l lieferte 4,35 g Ätherextrakt, d.h. braunes, auch bei längerem Stehen nicht krist. Öl. Wir veresterten es mit Äthanol und destillierten die in Petroläther löslichen Ester im Vakuum. Die einzelnen Fraktionen lieferten auch nach Verseifung keine kristallinen Anteile. Unveränderter Öllalkohol lag nicht vor.

*Versuch 4:* Dasselbe Tier bekam im gleichen Zeitraum 100 g Oleylalkohol oder 500 mg pro kg/die. Die vereinigten Extrakte aus der Harnmenge von 10 Tagen (14,7 l) ergaben 4,7 g braunes Öl, dessen Aufarbeitung analog den Angaben von Versuch 3 nicht zu identifizierbaren Verbindungen führte.

*Versuch 5:* Dem Hund S. gaben wir täglich 4,0 g Oleylalkohol und 0,6 g D-Azelainsäure, total 40 g Alkohol bzw. 6,0 g D-Azelainsäure. Harnmenge 12,3 l. Ausbeute an roher Azelainsäure 30%, an reiner 25% der applizierten Menge. D-Gehalt siehe Tab. 1.

Fütterung von Oleylacetat. Oleylalkohol wurde in absolutem Pyridin mit Acetylchlorid versetzt und das Reaktionsprodukt nach bekannten Methoden aufgearbeitet. Ausbeute 50%. Sdp. 0,4 mm Hg 166–168°, farblose Flüssigkeit.

$C_{20}H_{38}O_2$  Ber. C 77,35 H 12,33% JZ 81,9  
(326,46) Gef. „ 77,16 „ 12,26% „ 79,2

Spektrum der analysenreinen Verbindung:

Maximum bei 2360 Å, molare Extinktion  $\log \epsilon = 2,6$   
Inflexion bei 2700 Å, molare Extinktion  $\log \epsilon = 1,24$

*Versuch 6:* Dem Hund L. verfütterten wir 16 g Oleylacetat (80 mg pro kg/die) und 5 g Deuterio-Azelainsäure (26 mg kg/die) während 10 Tagen. Harnmenge 18 l. Ausbeute an wiedergewonnener D-Azelainsäure 49 bzw. 30%.

Fütterung von Oleylbenzoat. In eine Lösung von Oleylalkohol in absolutem Pyridin wurde reines Benzoylchlorid eingetragen und das Reaktionsgemisch nach den üblichen Methoden aufgearbeitet. Sdp. des Esters 0,01 mm Hg 205–208°, farb- und geruchlos Flüssigkeit. Ausbeute 55%.

$C_{25}H_{40}O_2$  Gef. C 80,67 H 10,81% JZ 65  
(373) Ber. „ 80,60 „ 10,82% „ 68

Spektrum: 1. Maximum 2380 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 4,09$   
2. Maximum 2730 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,92$   
3. Maximum 2800 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,82$   
1. Minimum 2600 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,82$   
2. Minimum 2770 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,79$

*Versuch 7:* Hund S. nahm während 10 Tagen total 16 g Benzoat und 5 g D-Azelainsäure (45 mg/kg/die) auf. Die Rückgewinnung letzterer gelang zu 40 bzw. 32%. Daneben erhielten wir 700 mg analysenreine Benzoesäure, also lediglich 20% der aus dem verfütterten Benzoat theoretisch möglichen Menge. Hippursäure trat nicht auf.

Fütterung von Ölsäure-N-butylamid. Dieses Amid<sup>2)</sup> gewannen wir über Ölsäurechlorid, welches aus destillierter Ölsäure und aus mit Leinöl und Chinolin gereinigtem

<sup>1)</sup> Alle Spektren wurden in abs. Äthanol mit einem Beckman-Spektrophotometer Modell DU aufgenommen.

<sup>2)</sup> D. Suern et al., Am. Soc. 71, 2215, 3017 (1949).

Thionylchlorid gewonnen wurde. Ausbeute 62%, farblose Substanz, Smp. 30—32°, nicht ohne Zersetzung destillierbar.

$C_{22}H_{43}ON$	Gef. C 78,06	H 12,74	N 4,32%
(339)	Ber. ,, 78,27	,, 12,84	,, 4,15%

Spektrum: Maximum bei 2260 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,3$   
 Inflection bei 2260 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 1,4$

*Versuch 8:* Hund S. bekam während 10 Tagen 30 cm<sup>3</sup> Ölsäure-N-butylamid oder pro kg/die 150 mg. Aus der Harnmenge von 9,8 l resultierten 5,5 g braunes Öl, aber keine Dicarbonsäuren oder andere krist. Verbindungen.

*Versuch 9:* Derselbe Hund nahm während 10 Tagen 20 g Ölsäure-N-butylamid + 5 g D-Azelainsäure (31 mg/kg/die) auf. Aus 11,2 l Harn erhielten wir 40 bzw. 28% (rein) der verabreichten D-Azelainsäure.

Fütterung von Ölsäure-diäthylamid. Das nach *D. Swern et al.*<sup>1)</sup> hergestellte Amid reinigten wir durch Destillation unter Stickstoff im Hochvakuum. Sdp.<sub>0.005</sub> 145—147°. Ausbeute 58%, farblose Flüssigkeit.

$C_{22}H_{43}ON$	Gef. C 78,23	H 12,72	N 4,15%
(339)	Ber. ,, 78,27	,, 12,84	,, 4,15%

*Versuch 10:* Dem Hund S. gaben wir während 10 Tagen insgesamt 30 cm<sup>3</sup> (25 g) Ölsäure-diäthylamid (pro kg/die 150 mg). Die Harnmenge betrug 9,8 l, woraus wir 3,7 g auch bei längerem Stehen nicht kristallisierendes Öl bekamen. Aus dem Essigesterauszug des Harnkonzentrates ergaben sich 2,5 g braunes, nicht krist. Öl, das verestert wurde. Bei der Aufarbeitung des Estergemisches gewannen wir durch Vakuumsublimation 50 mg reine Bernsteinsäure. Smp. 179—181°, im Mischsmp. mit Bernsteinsäure keine Depression zeigend.

$C_4H_6O_4$ (118)	Gef. C 40,76	H 5,14%	Ber. C 40,68	H 5,12%
-------------------	--------------	---------	--------------	---------

*Versuch 11:* Hund A. erhielt während 5 Tagen 25 g Ölsäure-diäthylamid oder 54 g pro kg/die. Er lieferte 8,3 l Harn und daraus 180 mg reine Bernsteinsäure. Smp. 181—182°. Mischsmp. 180—181°.

Gef. C 40,72 H 5,15%

*Versuche 12 und 13:* Die analoge Aufarbeitung des Harnes einer 10tägigen Periode normaler Fütterung (13 l) liess keine Dicarbonsäuren, insbesondere keine Bernsteinsäure finden. Daran änderte sich nichts, wenn das entsprechende Tier während 10 Tagen je 1 cm<sup>3</sup> Diäthylamin als Hydrochlorid mit dem Futter bekam.

Fütterung von Ölsäureanilid.<sup>2)</sup> Frisch dest. Ölsäurechlorid trugen wir unter Kühlung in ein Gemisch von dest. Anilin und Petroläther ein. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei den Amiden. Ein Versuch zur Destillation des Rohproduktes bei 11 mm Hg nach den Angaben von *E. de'Conno*<sup>3)</sup> führte indessen nicht zu reinem Ölsäureanilid, vielmehr zu einer Isomerisierung. Wir erhielten ein Gemisch von Ölsäure- und Elaidinsäureanilid, das durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden konnte. Ölsäureanilid: farblose Kristalle vom Smp. 39—41°, Elaidinsäureanilid: Smp. 80—81°.

$C_{24}H_{39}ON$	Gef. C 80,37	H 11,10	N 4,21%
(358)	Ber. ,, 80,61	,, 10,99	,, 3,92%

*Versuch 14:* Dem Hund A. fütterten wir 21 g Ölsäureanilid im Verlaufe von 8 Tagen (pro kg/die 210 mg). Das Volumen des stark dunkel gefärbten Harnes betrug 17,3 l. Er enthielt kein Eiweiss. Paarungsprodukte (Glucuronsäure und Esterschwefelsäure) waren nicht nachweisbar. Die Ätherextraktion führte zu 2,0 g braunem Öl, das auch nach Reinigung über die Ester keine kristallisierten Anteile aufwies. Nach *Williams*<sup>4)</sup> entstehen aus Anilin Aminophenole, deren Isolierung wir in unserem Zusammenhang nicht versuchten.

*Versuch 15:* Der gleiche Hund nahm innerhalb von 2 Tagen 50 g Ölsäureanilid (pro kg/die 2,5 g) mit 75 cm<sup>3</sup> Olivenöl gemischt auf. Er erbrach dabei einmal, wobei etwa 15 g

<sup>1)</sup> *D. Swern et al.*, Am. Soc. **71**, 2215, 3017 (1949).

<sup>2)</sup> *B. C. Nicolet*, Am. Soc. **43**, 2122 (1921).

<sup>3)</sup> *E. de'Conno*, G. **47**, 93 (1917).

<sup>4)</sup> *R. T. Williams*, Detoxication Mechanisms, London, 1949.

Anilid verloren gingen. Das Volumen des dunkel gefärbten Harnes, welcher wie bei Versuch 14 aufgearbeitet wurde, betrug 4,6 l.

Fütterung von 9,10-Dioxystearinsäure. Die Gewinnung dieser Verbindung erfolgte aus Ölsäure durch Oxydation mit 30-proz. Wasserstoffperoxyd in 85-proz. Ameisensäure<sup>1)</sup>. Ausbeute 78%, weisse, nadelförmige Kristalle vom Smp. 92—93° (niederschmelzende Form).

$C_{18}H_{36}O_4$  (316) Gef. C 68,24 H 11,53% Ber. C 68,31 H 11,41%

Spektrum: Maximum bei 2200 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,1$

*Versuch 16:* Hund S. bekam täglich 2 g, total 10 g der Dioxysäure, gemeinsam mit 1 bzw. 5 g D-Azelainsäure (pro kg/die 60 mg). Harnmenge 6,2 l. Ausbeute an Azelainsäure 50 bzw. 40% der verfütterten Menge. Die Aufarbeitung der Faeces (Trockengewicht 52 g) führte zu 5 g roher bzw. 4 g reiner Dioxystearinsäure, d. s. 50 bzw. 40% der verfütterten Menge.

*Versuch 17:* 20 g Dioxysäure, 2,5 g D-Azelainsäure, 1 g Hühnereiweiss, 1 g N-Cholat und 5 g „Tween 20“ haben wir mit dem Vibrator einige Zeit emulgiert und von dieser Emulsion je  $\frac{1}{5}$  während 5 Tagen dem Futter beigemischt. Das Tier S. produzierte dabei 8,7 l Harn, aus dem wir die D-Azelainsäure zu 48 resp. 28% wieder gewannen. Im Kot (Trockengewicht 55 g) fanden wir 8 g Dioxysäure oder 40% der verfütterten Menge.

*Versuch 18:* 20 g Dioxysäure, 100 cm<sup>3</sup> Olivenöl und 3,2 g D-Azelainsäure wurden im Turmix bei 60° emulgiert, von diesem Gemisch wurde je  $\frac{1}{8}$  dem Normalfutter beigemischt. Harnmenge des Hundes L. von 11 Tagen 9,4 l. Zurückgewonnene Azelainsäure: roh 40, rein 27%. Die Aufarbeitung der Faeces, deren Trockengewicht 68 g betrug, führte zur Aufindung von 6 g Dioxysäure.

*Versuch 19:* 20 g Dioxystearinsäure, 2,5 g D-Azelainsäure, 5 g „Tween 20“, 50 cm<sup>3</sup> Wasser und 50 cm<sup>3</sup> Olivenöl im Vibrator 2 Std. emulgiert, stellten eine stabile Emulsion dar, welche während 5 Tagen in gleichen Portionen zur Verfütterung an Hund B. gelangte. Aus der Harnmenge von 8,7 l wurde die Azelainsäure zu 50 bzw. 20% wieder erhalten. Aus den Faeces (45 g Trockengewicht) ergaben sich 6 g unveränderte Säure.

*Versuch 20:* Hund A. bekam täglich 5 g, total 25 g Formoxystearinsäure, die als Zwischenprodukt bei der Herstellung der Dioxysäure anfiel. Sie schmilzt bei ca. 30°. Dazu erhielt er 420 mg bzw. 2,1 g D-Azelainsäure. Harnmenge 9,7 l. Die Rückgewinnung der D-Azelainsäure gelang zu 42 bzw. 20%.

Fütterung von 9,10-Diketostearinsäure. Nach den Angaben von King<sup>2)</sup> erhielten wir aus Dioxystearinsäure durch Oxydation mit Chromtrioxyd in Eisessig die gewünschte Verbindung in einer Ausbeute von 23%. Gelb-grüne Blättchen, Smp. 81—82°.

$C_{18}H_{32}O_4$  (312) Gef. C 69,12 H 10,35% Ber. C 69,19 H 10,32%

Spektren (vgl. Holman<sup>3)</sup>): Maximum bei 2650 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,2$

Minimum bei 2450 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 1,5$

Beginn bei 2200 Å, molare Extinction  $\log \epsilon = 2,5$

*Versuch 21:* 16 g Diketostearinsäure und 2 g D-Azelainsäure mischten wir im Turmix mit 50 cm<sup>3</sup> erwärmtem Olivenöl und verfütterten diese Emulsion während 4 Tagen an den Hund S. Durch Aufarbeitung des Harnes (7,8 l) erhielten wir 55 bzw. 35% der D-Azelainsäure zurück. Aus den Faeces (Trockengewicht 32 g) gelang die Isolierung von 4,8 g Diketostearinsäure.

*Versuch 22:* 25 g Diketostearinsäure, 3 g D-Azelainsäure, analog mit Olivenöl emulgiert, gelangten während 10 Tagen an den Hund A. zur Verfütterung. Harnmenge 16,4 l. Zurückgewonnene Azelainsäure 48 bzw. 13% (Verluste). Die Faeces (Trockengewicht 58 g) schlossen 5 g unveränderte Diketosäure ein.

Wir danken Fräulein Y. Petignat für ihre Mithilfe bei den Deuterium-Bestimmungen.

1) D. Swern et al., Am. Soc. 67, 1786 (1945).

2) G. King, Soc. 1936, 1788.

3) R. T. Holman et al., Am. Soc. 67, 1285 (1945).



## SUMMARY.

With the aid of the isotope-dilution method we were able to show that both, man and dog, cannot oxidize oleic acid on the double bond with formation of azelaic acid. Healthy subjects excreted the deuterio azelaic acid with unchanged isotope concentration which would not be the case if this dicarboxylic acid was an intermediate product. Also oleyl alcohol, even as acetic acid—or benzoic acid ester, when fed to dogs, will not be metabolized to azelaic acid, but much easier oxidized to fatty acid.

The oxidation of the double bond cannot be obtained by blocking the carboxyl group thus inhibiting  $\beta$ -oxidation. The diethylamid of oleic acid, after being fed to dogs, gives small amounts of succinic acid, which probably are formed by methyl- and following  $\beta$ -oxidation. Evidently the  $\omega$ -oxidation is easier for the cell than the oxidation of the double bond. After administration of oleic acid N-butylamid and oleic acid anilid no metabolic products could be isolated from the urine.

However, the organism is able to oxidize 9,10-dihydroxystearic acid and 9,10-diketostearic acid to azelaic acid. Different application methods are described and it is shown, that the resorption of the dihydroxy fatty acid is related to a certain degree to the emulsion and melting point of the substance given.

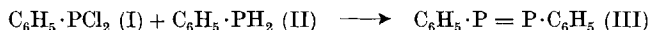
Physiol.-chemisches Institut der Universität Basel.

## 78. Über Phosphobenzol

von Th. Weil, B. Prijs und H. Erlenmeyer.

(26. I. 52.)

Im Zusammenhang mit strukturehemischen Untersuchungen interessierten wir uns für die Eigenschaften des Phosphobenzols (III), das *H. Köhler & A. Michaelis*<sup>1)</sup> 1877 auf folgendem Wege erhalten hatten:



Das Phenylphosphin (II) wurde von diesen Autoren aus Dichlorphenylphosphin (I) durch Verseifung zu phenylphosphiniger Säure und Disproportionierung der letzteren dargestellt<sup>2)</sup>, wobei aus 3 Mol Dichlorphenylphosphin höchstens 1 Mol Phenylphosphin erhalten werden kann. Es gelang nicht, Dichlorphenylphosphin direkt zu Phenylphosphin zu reduzieren<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> B. **10**, 807 (1877).

<sup>2)</sup> Vgl. *A. Michaelis*, B. **7**, 6 (1874); A. **181**, 265 (1876); *H. Köhler & A. Michaelis*, loc. cit.; *H. Lecoq*, Bl. Soc. chim. Belg. **42**, 199 (1933).

<sup>3)</sup> *A. Michaelis*, B. **7**, 6 (1874).