

SUMMARY

Treatment of steroid 20-cyanohydrins under conditions of the hypiodite reaction generates 18-cyano-20-oxo compounds by a 1,4-migration of the cyano group.

The structure proofs of the products are given and examples which show the general character of this new type of radical rearrangement are presented.

Forschungslaboratorien der
CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] CH. MEYSTRE, J. KALVODA, G. ANNER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **46**, 2844 (1963).
- [2] CH. MEYSTRE, K. HEUSLER, J. KALVODA, P. WIELAND, G. ANNER & A. WETTSTEIN, *Experientia* **17**, 475 (1961).
- [3] K. HEUSLER & J. KALVODA, *Angew. Chem.* **76**, 518 (1964) und *Int. Edit.* **3**, 525 (1964).
- [4] D. HAUSER, K. HEUSLER, J. KALVODA, K. SCHAFFNER & O. JEGGER, *Helv.* **47**, 1961 (1964).
- [5] A. L. NUSSBAUM & CH. ROBINSON, *Tetrahedron* **17**, 35 (1962).
- [6] M. AKHTAR, in: W. A. NOYES, JR., G. S. HAMMOND & J. N. PITTS, JR., *Advances in Photochemistry II*, S. 263, Interscience Publishers 1964.
- [7] K. HEUSLER & J. KALVODA, *Helv.* **46**, 2020 (1963).
- [8] CH. MEYSTRE, K. HEUSLER, J. KALVODA, P. WIELAND, G. ANNER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **45**, 1317 (1962).
- [9] CH. WALLING, in: *Free Radicals in Solution*, J. Wiley & Sons, Inc., London 1957, z. B. S. 50, Tabelle 2.3.
- [10] E. MÜLLER & H. HUBER, *Chem. Ber.* **96**, 671, 2319 (1963).
- [11] K. YOSHIDA & S. TSUTSUMI, *Tetrahedron Letters* **28**, 2417 (1965).
- [12] A. ERCOLI & P. DE RUGGIERO, *Gazz. chim. ital.* **84**, 312 (1954).
- [13] G. CAINELLI, M. L. MIHAILOVIC, D. ARIGONI & O. JEGGER, *Helv.* **42**, 1124 (1959).
- [14] H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI & D. H. WILLIAMS, in: *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectroscopy*, Bd. II, Holden Day, Inc. 1964, S. 26.

48. Das biologische Verhalten von Fettsäuren mit Dreifachbindung

I. Speicherung und Abbau von Stearolsäure bei der Ratte¹⁾

von H. Wagner, G. Ritzel und K. Bernhard

(8. X. 65)

Über das Verhalten der Dreifachbindung im tierischen Organismus ist wenig bekannt. Wir haben vor mehr als zehn Jahren Acetylenfettsäuren an Hunde verabreicht [1]. Erneute Untersuchungen mit Hilfe moderner analytischer Verfahren erweisen sich als wünschenswert.

Stearolsäure kommt in der Natur vor [2] und vermag nach BLOCH *et al.* [3] bei anaeroben Hefen in gleicher Weise wie Hydroxystearinsäure die zum Wachstum notwendige Ölsäure zu ersetzen. Stearolsäure wird auch in die Hefelipide eingebaut.

¹⁾ Vorgetragen an der 2. Tagung der Föderation Europäischer Biochemischer Gesellschaften in Wien, 21.–24. April 1965.

Wir prüften Aufnahme und Verteilung der Stearolsäure im Rattenorganismus. Junge Versuchstiere erhielten mit einem normalen Futter kleinere Mengen Stearolsäure-triglycerid, das gut resorbiert wurde. Nach fünf Wochen bestanden die Fettsäuren aus den Gesamtlipiden der Leber, wie aus Tab. 1 hervorgeht, zu 1-2% aus Stearolsäure; 12-20% (vgl. Tab. 2) waren indessen an Stelle der Ölsäure, vielleicht der Linolsäure, in den Depotfetten vorhanden. Die Kontrolltiere wiesen im Mittel 41% Ölsäure bzw. 54% C₁₈-Säuren auf. Nach Stearolsäurefütterung betrugen diese Werte 32 bzw. 57%. Die übrigen Komponenten zeigten gegenüber den Kontrollen praktisch keine Veränderungen.

Zur Auffindung möglicher Metabolite wurden jungen und ausgewachsenen Ratten analoge Diäten mit 5% Stearolsäure-triglycerid gefüttert. Der Urin wurde mit Äther ausgezogen, und der Extrakt liess im Gas-Chromatogramm zwei Komponenten erkennen. Die eine (Metabolit I) konnte rein erhalten werden. Bei ihrer Hydrierung wurden pro 1 Mol Säure 2,1 Mol Wasserstoff aufgenommen unter Bildung von Sebacinsäure. Als alleiniges Oxydationsprodukt entstand Glutarsäure. Der Schmelzpunkt betrug 109-110° in Übereinstimmung mit Angaben von CRAM & ALLINGER [4] für die 5-Decindisäure: HOOC-(CH₂)₅-C≡C-(CH₂)₈-COOH. Die Ausbeute an reiner Dicarbonsäure betrug rund 6,7%, berechnet auf die aufgenommene Stearolsäure.

Tabelle 1. Zusammensetzung der Gesamt-Fettsäuren aus den Leberlipiden nach Gaben von Stearolsäure-triglycerid (% Methyl ester)

Tier Nr.	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:1	20:4	X
1	0,4	29,4	2,8	23,3	16,0	8,9	1,1	13,4	4,8
2	0,5	30,3	2,8	22,0	15,3	9,7	2,2	12,8	4,4
3	0,4	31,0	3,4	15,2	19,6	11,4	3,1	12,7	3,2
4	0,5	29,9	3,1	18,9	17,5	10,3	1,6	13,3	5,0
5	0,3	38,2	2,1	12,9	20,0	12,7	1,1	9,7	3,1
6	0,4	28,6	3,1	18,7	17,7	10,9	1,9	14,5	4,4
Mittel	0,4	31,2	2,9	18,5	17,7	10,7	1,8	12,7	4,2
S	±0,06	± 3,51	±0,5	± 3,94	± 1,88	± 1,34	±0,76	± 1,62	-

X: nicht identifizierte Anteile

Tabelle 2. Zusammensetzung der Gesamt-Fettsäuren aus den Depotfetten (% Methyl ester) nach Gaben von Stearolsäure-triglycerid (Tiere 1-6) und nach normaler Fütterung (Kontrollen 7-9)

Tier Nr.	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:1
1	1,8	32,4	8,1	3,7	35,6	5,3	31,1
2	2,4	32,2	7,8	3,9	31,6	6,5	15,7
3	2,5	32,5	9,1	2,9	33,5	5,8	13,6
4	2,0	32,0	8,7	3,9	34,5	5,6	13,3
5	3,2	32,5	9,0	4,6	30,8	7,8	12,1
6	2,6	31,6	7,2	3,4	26,9	8,8	19,9
Mittel	2,4	32,1	8,4	3,7	32,2	6,6	14,6
S	±0,49	± 0,44	±0,9	±0,57	± 3,13	±1,39	±2,85
7	3,2	35,0	8,9	3,4	41,8	7,9	0
8	2,9	34,4	8,9	4,4	41,5	7,9	0
9	2,8	35,5	7,7	4,5	40,7	8,8	0
Mittel	3,0	35,0	8,5	4,1	41,3	8,2	
S	±0,21	± 0,55	±0,69	±0,61	± 0,57	±0,52	

Experimentelles. – Die Stearolsäure wurde wie früher mitgeteilt [5] erhalten und durch Hochvakuumdestillation über eine mit Stahlfedern [6] gefüllte 80 cm hohe Kolonne gereinigt. Die Säure war gas-chromatographisch rein. Ihr Triglycerid entstand durch Umesterung des Methyl-esters mit Triacetin.

Fütterungsversuche. Männliche weisse Ratten mit einem Anfangsgewicht von 87–125 g erhielten mit einem Futter, dessen Trockensubstanz aus 25% Eiweiss, 70% Kohlehydraten und 1% Fett bestand, während 35 Tagen insgesamt 20,3 g Stearolsäure-triglycerid und wurden dann aufgearbeitet. Gleichzeitige Kontrollen bekamen eine letzterem entsprechende Menge Schweine-schmalz. Weitere fünf Ratten im Alter von 10 Wochen mit einem Anfangsgewicht von 160–170 g erhielten in gleicher Weise je 11,2 g Stearolsäure-triglycerid während 21 Tagen, wobei Harn und Faeces quantitativ gesammelt wurden. Letztere enthielten die in der Tabelle 3 angeführten Fett-säuremengen, deren Analyse erkennen lässt, dass Stearolsäure nur zu 5,6% darin vorhanden war. Die Resorption ihres Triglycerides betrug daher mindestens 95%.

Tabelle 3. *Analyse der Faeces-Fettsäuren*

Faeces von 7 Versuchstagen	Gesamtfettsäuren total mg	Fettsäuren								
		in % des Trocken- gewichtes	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:1	X
5 Stearolsäure-Tiere	120,8	4,4	2,8	18,8	3,7	7,8	23,7	8,6	5,6	29,0
3 Kontrollen	131,0	5,4	1,6	26,1	1,7	30,7	12,0	4,4	0	23,6

X = nicht identifizierte Anteile

Isolierung und Analyse der Leberlipide und des Depotfettes. Die Autopsie liess normal aussehende, etwas vergrösserte Lebern erkennen, charakterisiert durch hyperplastische Parenchymzellen mit zugunsten des Plasmas veränderter Kern-Plasma-Relation. Das Trockengewicht betrug im Mittel 27,4% des Frischgewichtes, bei den Kontrollen 28,3%, der Eiweissgehalt bezogen auf das Trockengewicht 81,4 bzw. 73,7%. Aus den Lebern gewannen wir durch Verseifung mit Lauge die Gesamtfettsäuren. Wir haben sie mit BF_3 und Methanol verestert. Aus den Fettgeweben extrahierten wir die Lipide nach COLLINS [7] und erhielten die Methyl-ester durch Umesterung mit Methanol und Kaliumcarbonat.

Bei Verwendung von Bernsteinsäure-äthylenglykol-polyester als stationäre Phase zur gas-chromatographischen Analyse haben Stearol- und Linolensäure-methyl-ester dieselbe Retentionszeit. Daher war eine Trennung der Methyl-ester-Gemische durch Chromatographie an einer Silbernitrat-haltigen Silicagelkolonne nötig, wobei eine erste Fraktion mit den gesättigten und den Monoen-Säuren die Stearolsäure, eine zweite Fraktion die Komponenten mit zwei und mehr Doppelbindungen enthielt [8].

Aufarbeitung der Harn. Die jeweiligen von einigen Versuchstagen vereinigten Harn der fünf Versuchstiere wurden angesäuert und erschöpfend mit Äther extrahiert. Tabelle 4 gibt Auskunft über die erhaltenen Extraktmengen. 500 mg des braunen, nicht kristallisierten Extraktes veresterten wir mit 1 ml 10-proz. methanolischer Salzsäure, 1 ml Dimethoxypropan und 5 ml abs. Methanol [9] durch Erwärmen unter Rückfluss während fünf Minuten. Nach Abdampfen des überflüssigen Reagens wurde der Ester gas-chromatographisch geprüft. Es liessen sich stets zwei Hauptkomponenten erkennen, die mengenmässig aber nicht festzulegen waren, weil ein Teil des Analysenmaterials auf der Kolonne verblieb oder zersetzt wurde.

Tabelle 4. *Harnextrakte aus den Urinmengen von 5 Tieren*

Versuchstage	1–3	4–5	6–8	9–11	12–19	20–21
Stearolsäure-triglycerid total g	4,5	4,5	11,9	11,6	21,3	2,9
Harn-Extrakt mg Trockengewicht	548	750	388	576	2337	778

Die vereinigten Methylester (9,39 g) destillierten wir im Kugelrohr und erhielten bei 35–105°/0,07–0,1 Torr 0,074 g Fraktion I, bei 105–107°/0,1 Torr 5,22 g Fraktion II und einen Rückstand von 3,38 g.

Fraktion II verseiften wir mit 10 ml H₂O, 5 ml Methanol und 5 g KOH während zwei Stunden unter Rückfluss. Nach Entfernung eines Teiles des Lösungsmittels im Vakuum säuerten wir mit Salzsäure an und extrahierten mit Äther. Die ausgewaschenen ätherischen Phasen hinterliessen eingedampft 4,1 g Rückstand. Nach Umkristallisieren aus 40 ml Benzol resultierten 3,45 g Kristalle vom Smp. 106–108° und aus der eingeeengten Mutterlauge 150 mg, Smp. 104–106°. Durch weiteres Umkristallisieren aus Benzol, unter Verwendung von etwas Tierkohle, erhielten wir 3,35 g gas-chromatographisch nicht einheitliche Kristalle, Smp. 109–110°. Eine weitere Reinigung bzw. Trennung gelang an einer Kolonne (50×2 cm), gefüllt mit 50 g Silicagel MERCK 0,05–0,2 mm (Füllhöhe 32 cm). Diese Säule wurde mit 150 ml Äthylenchlorid gespült und darauf Methylester des aus 1 g bei 109–110° schmelzenden Metaboliten, gelöst in Äthylenchlorid, gebracht. Durch Elution mit 960 ml Äthylenchlorid ergaben sich 1030 mg einer gas-chromatographisch reinen Fraktion (Metabolit I). Anschliessende Elution mit Äther lieferte 111 mg eines Gemisches von Metabolit I und einer weiteren, noch nicht identifizierten Verbindung (Metabolit II).

Identifizierung des Metaboliten 1. Elementaranalyse des Methylesters:

C₁₂H₁₈O₄ (226,26) Ber. C 63,70 H 8,02 O 28,29% Gef. C 63,90 H 8,03 O 28,49%

0,1 ml Methylester in 3 ml Methanol gelöst wurde an 10 mg PtO₂ hydriert und ergab gas-chromatographisch reinen Sebacinsäure-methylester. Bei der Mikrohydrierung in Eisessig mit PtO₂ bei 20° verbrauchten 6,184 mg Methylester des Metaboliten I 1,29 ml H₂ (korr.).

Zur Oxydation mit KMnO₄ und KJO₄ [10] haben wir 114 mg Methylester, 50 mg Kaliumcarbonat, 20 ml Oxydationslösung mit 30-proz. wässrigem *t*-Butanol auf 200 ml gebracht und 24 Std. geschüttelt. Nach Zugabe von Pyrosulfit bis zum Verschwinden der Jodfarbe wurde mit KOH alkalisch gemacht und zur Trockne eingeeengt. Durch mehrstündige Extraktion mit Äther nach Ansäuern mit 2N H₂SO₄ erhielten wir ein Säuregemisch, das wieder mit Methanol verestert wurde. Die gas-chromatographische Analyse ergab 71% Glutarsäure-methylester und 29% unverändertes Ausgangsmaterial.

Diskussion der Ergebnisse. – Fütterung von Stearolsäure-triglycerid in kleinen Mengen mit einem normalen Futter führte zu keinerlei Störungen. Das bei Körpertemperatur flüssige Glycerid wird in normalem Ausmasse resorbiert. Die Säure kann beträchtlich gespeichert werden, nach 4–5 Wochen zeigten die Depotlipide im Mittel Stearolsäure-Gehalte von 14,6%. Ähnlich wie eine andere körperfremde Fettsäure – die Erucasäure [11] – vermag der Tierkörper auch die Stearolsäure in die Depotlipide einzubauen. Sie tritt dabei in Konkurrenz mit der Ölsäure, welche partiell verdrängt wird. Die Gesamtfettsäuren aus den Leberlipiden enthielten nur wenig Stearolsäure, wobei noch abzuklären wäre, ob sie sich auf Neutralfette und Phosphatide verteilt. Hier ist somit gegenüber dem Verhalten der andern höher ungesättigten C₁₈-Säuren ein sehr deutlicher Unterschied vorhanden, da Linol- und Linolensäure nach entsprechender Zufuhr bekanntlich in der Leber reichlich angetroffen werden.

Stearolsäure wird von der Ratte durch ω -Oxydation abgebaut. Es gelang, in der 5-Decindisäure ein Intermediärprodukt zu fassen, das seine Entstehung einer Methyloxydation und anschliessender viermaliger β -Oxydation verdankt. Damit ist ein ω -oxydativer Abbau einer unverzweigten C₁₈-Fettsäure im Tierkörper bewiesen. Nach PREISS & BLOCH [12] vermag das Überstehende aus Rattenleberhomogenat gesättigte Fettsäuren mit 12, 14, 16 und 18 C-Atomen durch ω -Oxydation abzubauen. Im Falle der Stearolsäure dürfte die Dreifachbindung bestimmend sein. In dem aufgefundenen Metaboliten ist sie noch erhalten, was für eine bemerkenswerte Stabilität

spricht. Es ist aber nicht auszuschliessen, dass sie auch angegriffen werden kann; aus der Menge der erhaltenen Decindisäure kann das Ausmass der ω -Oxydation nicht mit Sicherheit angegeben werden.

Für die vorliegende Arbeit standen Mittel der HANS-BUSS-Stiftung zur Verfügung.

SUMMARY

Stearolic acid, when fed to rats as a triglyceride, is well absorbed and incorporated into depot fats to a considerable extent.

As a metabolite decyne-dicarboxylic acid was isolated from urine. This is considered as a proof that stearolic acid can be metabolized via ω - and β -oxidation without affecting the triple bond.

Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. BERNHARD & U. GLOOR, *Helv.* **36**, 296 (1953).
- [2] C. Y. HOPKINS & M. J. CHISHOLM, *Tetrahedron Letters* **1964**, 3011–3014.
- [3] F. MEYER, R. J. LIGHT & K. BLOCH, *Biochemical Problems of Lipids* **1**, 415–421, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, London, New York 1963.
- [4] J. D. CRAM & N. L. ALLINGER, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2522 (1956).
- [5] U. GLOOR, *Diss. phil.* II, Basel 1953.
- [6] W. KUHN, P. BAERTSCHI & M. THÜRKAUF, *Chimia* **8**, 109, 145 (1954).
- [7] L. WHEELDON & F. COLLINS, *Biochem. J.* **66**, 435 (1957).
- [8] H. WAGNER, J.-D. GOETSCHEL & P. LESCH, *Helv.* **46**, 2986 (1963).
- [9] M. E. MASON, M. E. EAGER & G. R. WALLER, *Analyt. Chemistry* **36**, 587 (1964).
- [10] E. RUDLOFF, *Canad. J. Chemistry* **34**, 1413 (1956).
- [11] H. WAGNER, E. SEELIG & K. BERNHARD, *Z. physiol. Chem.* **372**, 104 (1958); K. BERNHARD, F. LINDLAR & H. WAGNER, *Z. Ernährungswissensch.* **1**, 48 (1960).
- [12] B. PREISS & K. BLOCH, *J. biol. Chemistry* **239**, 85 (1964).

49. Über die Teilchengrössenabhängigkeit der Lichtabsorption in heterogenen Systemen.

II. Experimentelle Untersuchungen an Modell-Teilchen

von B. Felder

(9. X. 65)

Einleitung. – Unter der Voraussetzung, dass die Streuung des Lichts gegenüber der Absorption vernachlässigt werden kann, wurden sowohl von uns [1] als auch bereits von GLEDHILL [2] nach verschiedenen Methoden Gleichungen entwickelt, welche das Absorptionsvermögen von Systemen kugelförmiger Teilchen in Abhängigkeit der Partikelgrösse beschreiben. Danach ist mit zunehmendem Teilchendurchmesser eine Abnahme der Absorption und gleichzeitig eine Verflachung der Spektren zu erwarten. Die hergeleiteten Beziehungen unterscheiden sich im Fall stark konzentrierter monodisperser Systeme geringfügig; bei hoher Verdünnung werden sie jedoch miteinander identisch. Ebenso lässt sich zeigen, dass die Lösung des von GLEDHILL