Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, IV Zur β-Oxydation der Mono- und Polyenfettsäuren Chemische Synthesen von Intermediärprodukten

Von

Wilhelm Stoffel, Horst Caesar und Reiner Ditzer

182 Bd. 339 (1964)

# Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, $IV^1$ Zur $\beta$ -Oxydation der Mono- und Polyenfettsäuren Chemische Synthesen von Intermediärprodukten\*

Von

## Wilhelm Stoffel, Horst Caesar und Reiner Ditzer

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln (Der Schriftleitung zugegangen am 8. Mai 1964)

In der vorhergehenden Arbeit¹ wurden die an  $\Delta^3 cis$ -Enoyl-CoA-Verbindungen in Mitochondrien ablaufenden enzymatischen Reaktionen beschrieben. An einer  $\Delta^3 cis$ - $\Delta^2 trans$ -Enoyl-CoA-Isomerase erfolgt die Isomerisierung der  $\Delta^3 cis$ - zur  $\Delta^2 trans$ -Enoyl-CoA-Verbindung. Diese wird durch die  $\Delta^2$ -Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase) zum L(+)-Antipoden der  $\beta$ -Hydroxy-acyl-CoA-Verbindung hydratisiert.

Diese Reaktionen in Verbindung mit denen des Oxydationscyclus der gesättigten Fettsäuren machen den Weg verständlich, auf dem die große Gruppe der Monoen- und Polyenfettsäuren in den Mitochondrien abgebaut wird.

Die beschriebenen Ergebnisse konnten erhalten werden, nachdem uns die Synthesen der erforderlichen Substrate gelungen waren. Es mußten übersichtliche Synthesemethoden, die zu wohldefinierten Produkten führen, entwickelt werden. Dabei wurden im Hinblick auf die all-cis-Konfiguration der olefinischen Bindungen sowie den Polyallylrhythmus Synthesewege eingeschlagen, die eine Stellungs- und cis-trans-Isomerisierung ausschlossen.

Von besonderer Bedeutung für unsere enzymatischen Untersuchungen waren die Synthesen von cis- $\beta$ - $\gamma$ -ungesättigten Säuren. So wurde die Dodecen-(3c)-säure, das  $\beta$ - $\gamma$ -ungesättigte Intermediärprodukt bei der Ölsäure oxydation, die Dodeca-dien-(3c.6c)-säure, ein Zwischenprodukt beim Abbau der Polyensäuren des Linolsäuretyps und die Hexen-(3c)-säure, ein Zwischenprodukt bei der  $\beta$ -Oxydation der Polyensäuren des Linolensäuretyps, synthetisiert.

Wegen der stereospezifischen Anordnung der olefinischen Bindungen war allein der Weg über die entsprechenden Acetylenverbindungen erfolgversprechend.

\* Verwendete Abkürzung: CoA = Coenzym A.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> III. Mitteil.: W. Stoffel, R. Ditzer u. H. Caesar, diese Z. 339, 167 [1964], vorstehend

Synthesen von Alkin-(3)-säuren sind wenig erfolgreich von Newman2 durch Carboxylierung des Grignard-Komplexes von substitutierten Propargylbromiden oder über eine Nitrilsynthese mit diesen Bromiden versucht worden. Wegen der leichten Allenbildung sowie Isomerisierung bei diesen Reaktionen führte keiner der Versuche zu einem einheitlichen Produkt.

Im Vergleich zur olefinischen Bindung wird die Acetylenbindung ungleich schwerer durch Oxydationsmittel angegriffen3. Es eröffnete sich daher der Weg, die den gewünschten Alken-(3c)-säuren entsprechenden Alkinalkohole in übersichtlicher Reaktionsfolge zu synthetisieren, diese dann durch Chromsäureoxydation in die Alkinsäure und abschließend durch stereospezifische Halbhydrierung der Acetylenbindung mit Lindlar-Katalysator4 in das gewünschte Olefin überzuführen.

Analog der Synthese von Alkin-(2)-alkoholen<sup>5</sup> wurde der Tetrahydropyranyläther des Butin-(1)-ols-(4) (II) in flüssigem Ammoniak alkyliert. Nach Säurehydrolyse erhielt man das Alkin-(3)-ol-(1). Chromsäureoxydation des Alkohols führt unter den im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen zu einer Ausbeute von 60-80% Alkin-(3)säure. Nach dieser, im Schema 1 wiedergegebenen Methode wurden die Dodecen-(3c)-säure (V) und die Hexen-(3c)-säure synthetisiert.

$$\begin{array}{c} \operatorname{CH}_3 \cdot [\operatorname{CH}_2]_6 \cdot \overset{\circ}{\operatorname{CH}}_3 \cdot J + \operatorname{LiC:C} \cdot [\operatorname{CH}_2]_2 \cdot O - \\ & I & \operatorname{II-Li} \\ \\ \hline \\ \operatorname{II-Li} \\ \\ \hline \\ \operatorname{CH}_3 \cdot [\operatorname{CH}_2]_6 \cdot \overset{\circ}{\operatorname{CH}}_2 \cdot \operatorname{C:C} \cdot [\operatorname{CH}_2]_2 \cdot O - \\ & \operatorname{III} \\ \\ \hline \\ 1) & \overset{1)}{\operatorname{H}^{\oplus}} \\ \hline \\ 2) & \operatorname{CrO}_s \end{array} \xrightarrow{\operatorname{CH}_3 \cdot [\operatorname{CH}_2]_6 \cdot \overset{\circ}{\operatorname{CH}}_2 \cdot \operatorname{CH}_2 \cdot \operatorname{CiC} \cdot \operatorname{CH}_2 \cdot \operatorname{CO}_2 \operatorname{H}} \\ & IV \\ \hline \\ \\ \overline{\operatorname{H}_s/\operatorname{Pd}} \xrightarrow{\operatorname{CH}_3 \cdot [\operatorname{CH}_2]_6 \cdot \overset{\circ}{\operatorname{CH}}_2 \cdot \operatorname{CH}_2 \cdot \operatorname{CH}_2 \cdot \operatorname{CO}_2 \operatorname{H}} \\ & V \\ \end{array}$$

Schema 1. Syntheseweg für Alken-(3c)-säuren am Beispiel der [5-14C]Dodecen-(3c)-saure (V).

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> M. S. Newman u. J. H. Wotiz, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1292 [1949]. <sup>3</sup> I. M. Heilbron, E. R. H. Jones u. F. Sondheimer, J. chem. Soc. [London] 1949, 604; 1947, 1586.

<sup>4</sup> H. Lindlar, Helv. chim. Acta 25, 446 [1952].

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> J.-M. Conia, Bull. Soc. chim. France, Mém. [5] 1955, 1449.

Wir dehnten unsere enzymatischen Untersuchungen auch auf die Polyenfettsäuren aus und studierten als prototypisches Beispiel die  $\beta$ -Oxydation der Linolsäure [Octadecadien-(9c.12c)-säure], die im Verlauf ihres Abbaus Dodecadien-(3c.6c)-säure liefert. Für die Synthese dieser Verbindung beschritten wir den im Schema 2 wiedergegebenen Weg:

$$\begin{array}{c} \operatorname{CH}_3 \cdot [\operatorname{CH}_2]_3 \cdot \overset{\circ}{\operatorname{CH}}_2 \operatorname{Br} + \operatorname{NaC} : \operatorname{C} \cdot \operatorname{CH}_2 \cdot \operatorname{O} - \\ \operatorname{VI} & \operatorname{VII} \cdot \operatorname{Na} \\ \\ \xrightarrow{\text{flüss. NH}_3} & \operatorname{CH}_3 \cdot [\operatorname{CH}_2]_3 \cdot \overset{\circ}{\operatorname{CH}}_2 \cdot \operatorname{C} : \operatorname{C} \cdot \operatorname{CH}_2 \cdot \operatorname{O} - \\ \\ & \operatorname{VIII} \\ \\ \xrightarrow{1) \ \operatorname{H}^{\oplus}} & \operatorname{CH}_3 \cdot [\operatorname{CH}_2]_3 \cdot \overset{\circ}{\operatorname{C}} \operatorname{H}_2 \cdot \operatorname{C} : \operatorname{C} \cdot \operatorname{CH}_2 \operatorname{Br} \\ \\ & \operatorname{IX} \end{array}$$

$$\xrightarrow{\text{BrMgC} \colon \text{C} \cdot \text{[CH}_2 \text{]}_2 \cdot \text{OMgBr}(X)} \quad \text{CH}_3 \cdot \text{[CH}_2 \text{]}_3 \cdot \overset{*}{\text{C}}\text{H}_2 \cdot \text{[C} \colon \text{C} \cdot \text{CH}_2 \text{]}_2 \cdot \text{CH}_2 \text{OH}$$
XI

$$\begin{array}{c} \overset{\text{CrO}_3}{\longrightarrow} & \text{CH}_3 \cdot [\text{CH}_2]_3 \cdot \overset{\bullet}{\text{CH}}_2 \cdot [\text{C} : \text{C} \cdot \text{CH}_2]_2 \cdot \text{CO}_2 H \\ \\ & \text{XII} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \overset{\mathbf{H}_{3}/\mathrm{Pd}}{\longrightarrow} & \mathrm{CH}_{3} \cdot [\mathrm{CH}_{2}]_{3} \cdot \overset{\circ}{\mathrm{C}} \mathrm{H}_{2} \cdot [\mathrm{CH} \overset{\circ}{\cdot} \mathrm{CH} \cdot \mathrm{CH}_{2}]_{2} \cdot \mathrm{CO}_{2} \mathrm{H} \\ \\ & \times \mathrm{III} \end{array}$$

Schema 2. Syntheseweg für die [8-14C]Dodecadien-(3c.6c)-säure (XIII).

Die Säuren V und XIII wurden mit <sup>14</sup>C markiert. Die für die Synthese verwendeten markierten Alkylhalogenide wurden in der üblichen Weise durch Carboxylierung der Alkyljodide mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, LiAlH<sub>4</sub>-Reduktion der Säure und Bromierung des Alkohols erhalten. Die spezifischen Aktivitäten der Säuren V und XIII betrugen 1,74 × 10<sup>5</sup> Zpm/µMol.

Neben diesen Alken-(3c)-säuren wurden für enzymatische Vergleichsuntersuchungen und zum Studium der an Δ<sup>2 cis</sup>-Enoyl-CoA-Verbindungen vor sich gehenden enzymatischen Reaktionen [1-<sup>14</sup>C]- Dodecen-(2c)-säure, [1-14C]Octen-(2c)-säure und Dodecen-(2t)säure dargestellt. Die beiden cis-α.β-ungesättigten Säuren sind leicht zugänglich durch Carboxylierung der entsprechenden Alkin-Magnesiumbromid-Komplexe, also des Undecin-(1)- und des Heptin-(1)-Magnesiumbromids und anschließende partielle Hydrierung der Methylester. Dodecen-(2t)-säure wurde durch Doebner-Kondensation von Decanal und Malonsäure erhalten.

Von entscheidender Bedeutung für unsere Untersuchungen war die Auftrennung des durch Reformatzky-Reaktion mit Decanal und Bromessigsäure-methylester erhaltenen Racemats der 3-Hydroxy-laurinsäure. Racemat-Trennungen von langkettigen aliphatischen Hydroxysäuren sind bisher nicht bekannt. Die für die Trennung kurzkettiger Hydroxysäuren angewandten Alkaloide Chinin, Cinchonin, Chinidin, Brucin und Strychnin waren nicht geeignet. Über die diastereomeren (+) oder auch (-)α-Phenyl-äthylammoniumsalze wurden nach vielfachem Umkristallisieren die optischen Antipoden der 3-Hydroxy-laurinsäure rein erhalten ( $[\alpha]_{589}^{20}$ :  $\pm 16,5^{\circ}$ , c=1 in CHCl<sub>3</sub>). Neben den identischen Drehwerten der Antipoden sind die enzymatischen Untersuchungen, die in der vorhergehenden Arbeit<sup>1</sup> beschrieben wurden (S. 178) ein weiteres Kriterium für die Reinheit der enantiomorphen Verbindungen.

Die Reinheit der Syntheseprodukte wurde durch die gaschromatographische Analyse bestimmt, die der ungesättigten Verbindungen durch Bestimmung von Wasserstoffzahl<sup>6</sup>, Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt der hydrierten Säuren sowie Cochromatographie ihrer Methylester mit Testverbindungen. Die Struktur der Endprodukte wurde ferner durch IR-, UV- und KMR-Spektroskopie sowie den oxydativen und den reduktiven Ozonid-Abbau? und die Äquivalentgewichtsbestimmung bewiesen. Die IR-Spektren der cis-olefinischen Säuren wiesen in keinem Fall auch nur Spuren der trans-Isomeren auf, während im Spektrum der Dodecen-(2t)-säure die "out of plane"-Schwingung für trans-Konfiguration bei 10,36 u mittelstark ausgeprägt war.

Die KMR-Spektren stimmen ebenfalls gut mit den angegebenen Strukturen überein (Abb. 1-3). Die sterische Anordnung der Doppelbindungen läßt sich auf diesem Wege allerdings nur für die Dodecen-(2t)säure bestätigen.

Das sehr unterschiedliche Verhalten der Methylester der geometrischen und stellungsisomeren Dodecensäuren in der gaschromatographischen Analyse soll besonders hervorgehoben werden. Aus Abb. 4 geht hervor, daß die Unterschiede der Retentionszeiten der einzelnen Methylester so groß sind, daß eine einwandfreie Identifizierung und radiogaschromatographische Trennung möglich ist.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> N. Causon-Kaas u. F. Limborg, Acta chem. scand. 1, 884 [1947]. <sup>7</sup> E. Klenku. W. Bongard, diese Z. 290, 181 [1952]; E. Klenku. H. Brokkerhoff, diese Z. 310, 153 [1955].

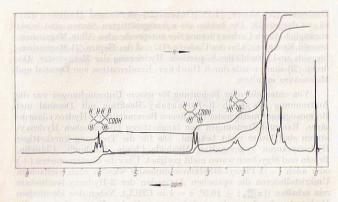


Abb. 1. KMR-Spektrum der Dodecen-(3c)-säure\*: Die beiden olefinischen Protonen sind fast identisch und erscheinen als ein verbreitertes Triplett (5,9-6,2 ppm) durch Kopplung mit den Allvlprotonen mit einer Kopplungskonstanten, die sich in dem Dublett der α-ständigen (3,3—3,5 ppm) bzw. δ-ständigen Allylprotonen (2.1-2,4 ppm) wiederfindet.

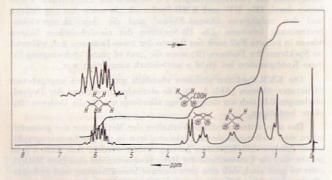


Abb. 2. KMR-Spektrum der Dodecadien-(3c.6c)-säure.

<sup>\*</sup> Wir danken Herrn Dr. W. R. Roth, Chemisches Institut der Universität Köln, für die Aufnahme der KMR-Spektren.

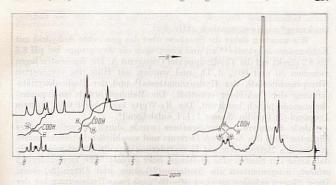


Abb. 3. KMR-Spektrum der Dodecen-(2t)-säure: Die beiden olefinischen Protonen erscheinen als ein AB-Typ-Spektrum, wobei jede der H-Linien durch Kopplung mit den beiden Allylwasserstoffatomen eine weitere Aufspaltung zu Tripletis erfährt (6,1—6,7 und 7,4—8,1 ppm). Die AB-Kopplungskonstante (J = 17 Hz) beweist das Vorliegen einer trans-Doppelbindung.

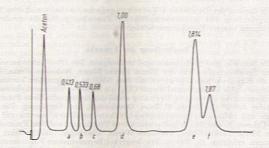


Abb. 4. Gaschromatogramm mit Angabe der relativen Retentionszeiten der Methylester der Dodecen (2c)-säure (a), Dodecen (3c)-säure (b), Dodecen (2f)-säure (c), 3.-Aectoxy-laurinsäure (e) und der 3.-Hydroxy-laurinsäure (f), bezogen auf Palmitinsäure-methylester (d). Säulentemperatur 183°; 60 ml Argondurchfluß/Min.; 200 cm Säulenlänge, Äthylenglykol/Bernsteinsäure-Polyester (15% auf Kieselgur); Barber-Colman, Modell 10;

Die Coenzym-A-Thioester der beschriebenen Säuren wurden ausschließlich auf chemischem Wege dargestellt. Die enzymatische Synthese nach Kornberg und Pricer<sup>8</sup> schied aus, da die Mikrosomenpräparationen stets durch Mitochondrienfragmente verunreinigt sind und die

<sup>8</sup> A. Kornberg u. W. E. Pricer, J. biol. Chemistry 204, 329 [1953].

darin befindlichen Enzyme der β-Oxydation auch nach der Gefrier-

trocknung9 noch enzymatisch aktiv sind.

Wir wandten daher die Synthese über das gemischte Anhydrid mit Kohlensäure-äthylester<sup>10</sup> an und übertrugen die Acylgruppe bei pH 8.5 bis 8.7 direkt auf die Thiolgruppe des Coenzyms A. Die Ausbeuten lagen zwischen 50 und 60% d. Th. und wurden mit Hilfe des verzögerten Nitroprussidtests<sup>11</sup>, des Hydroxamattests<sup>12</sup> und der Radioaktivitätsmessung der CoA-Ester ermittelt. Die Reinheit wurde radiopapierchromatographisch bestimmt. Die R<sub>F</sub>-Werte lagen bei 0,6 im System Propanol-(2)/Pyridin/Wasser 1:1:1 aufsteigend8.

Jede Coenzym-A-Ester-Synthese wurde durch Verseifung eines aliquoten Teils des Acyl-CoA-Derivats und anschließende Gaschromatographie des Methylesters auf Isomerisierung geprüft. Dabei zeigte sich, daß keine der Säuren eine Stellungs- oder geometrische Isomerisierung erfährt, ausgenommen die Dodecen-(2c)-säure und Octen-(2c)-säure. Diese Säuren erleiden zu etwa 40-60% cis-trans-Umlagerung bei der Bildung des Thioesters. Diese Isomerisierung der Alken-(2c)-säuren bei der CoA-Ester-Synthese ist ohne Zweifel einer der Gründe für die widersprechenden Aussagen über das breite Spektrum der durch 12-Enovl-CoA-Hydratase katalysierten Reaktionen 13,14. Unsere Untersuchungen über die cis-α.β-ungesättigten CoA-Ester werden fortgesetzt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung für die großzügige Unterstützung unserer Forschungsarbeiten.

#### Beschreibung der Versuche

Alle Schmelz- und Siedepunkte sind unkorrigiert. Die IR-Spektren wurden mit dem Spektrographen 125 der Firma Perkin-Elmer, Bodensee-Werke, Überlingen, die Kernresonanzspektren mit dem NMR-Spektrographen Varian A 60 aufgenommen. Als Lösungsmittel diente CCl4, als Referenz Tetramethylsilan. Für die Bestimmung der optischen Drehung stand das hochempfindliche Präzisionspolarimeter 0,005° der Firma C. Zeiss, Oberkochen, zur Verfügung. Die analytischen und radio-gaschromatographischen Analysen wurden auf dem Barber-Colman, Modell 10, die halbpräparativen Trennungen auf dem Fraktometer F 6 der Firma Perkin-Elmer, Bodensee-Werke, Überlingen, durchgeführt. Alle Trennungen erfolgten an 200-cm-Äthylenglykol/Bernsteinsäure-Polyester-Säulen (15% auf Kieselgur 0,1-0,2 mm Durchmesser) bei einer Gasdurchflußgeschwindigkeit von 60 ml Argon oder Helium/Min.

Die Radioaktivitätsmessungen sowohl der toluollöslichen als auch der wasserlöslichen Verbindungen wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb Model 314, Packard) durchgeführt. Die Radio-Papierchromatogramme wurden mit dem Radiopapierchromatographen FH 452 (Frieseke & Hoepfner) in Verbindung mit dem Methandurchflußzähler FH 407, dem Strahlungsmeßgerät FH 49

und einem Metrawatt-Schreiber ausgewertet.

<sup>9</sup> R. Ditzer, Dissertat. Univ. Köln 1964.

<sup>10</sup> T. Wieland u. L. Rueff, Angew. Chem. 65, 186 [1953].

<sup>11</sup> F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 574, 33 [1951]. M. M. Rapport u. N. Alonzo, J. biol. Chemistry 217, 103 [1955].
 S. J. Wakil u. H. R. Mahler, J. biol. Chemistry 207, 125 [1954].

<sup>14</sup> J. R. Stern u. A. Del Campillo, ebenda 218, 985 [1956].

Die Mikrohydrierungen zur Bestimmung der Wasserstoffzahl wurde nach Causon-Kaas und Limborge durchgeführt.

Coenzym A wurde von der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim, bezogen.

#### [5-14C]Dodecen-(3c)-säure (V)

[1-14C]Caprylsäure wurde analog einer Arbeitsvorschrift von Calvin und Mitarbeitern 15 durch Carboxylierung von 10 mMol Heptyljodid in 96proz. Ausbeute dargestellt, spezif. Aktivität: 1,74 μC/μMol.

[1-4C]Octanol (1): 1,38 g (9,6 mMol) [1-4C]Caprylsäure wurde in der üblichen Weise mit LiAlH, in trockenem Äther reduziert. Ausb.: 1,24 g (9,54 mMol)

entspr. 99,5% d. Th.

[1.46]Octyljodid (I): 1,24 g (9,54 mMol) [1.46]Octanol-(I) wurden in einem 10-ml-Zweihalskolben mit 0,15 g rotem Phosphor gemischt, erwärmt, 1.3 g (10 mMol) Jod zugesetzt und 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2-3 ml Wasser zugefügt und die wäßr. Phase mehrmals ausgeäthert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit Natriumthiosulfatlösung, 2π HCl und Wasser gewaschen, über CaCl2 getrocknet und eingeengt. Ausb.: 2,04 g (8.5 mMol) entspr. 89% d. Th.

Butin-(1)-ol-(4) wurde nach Schlubach und Wolf16 durch Umsetzung von Natriumacetylid mit Äthylenoxyd in flüssigem Ammoniak in 50proz.

Ausbeute dargestellt. Sdp. 760 128—130°; n<sup>20</sup> = 1,4392. 2-[Butin-(3)-yloxy]-tetrahydropyran(II): 46 g (0,66 Mol) Butin-(1)ol-(4) und 55,5 g (0,66 Mol) 2.3-Dihydro-pyran wurden gemischt und 0,1 ml Phosphoroxychlorid zugegeben. Die stark exotherme Reaktion wurde in Eiswasser gedampft. Man ließ 5 Stdn. stehen und neutralisierte mit festem KOH, dekamierte nach weiteren 2 Stdn. und fraktionierte das Produkt. Es ging als farblose Flüssigkeit bei Sdp<sub>-13</sub> S6° über;  $n_D^{20}=1,4578$ . Ausb.: 77,4 g (0,503 Mol) entspr. 76% d. Th.

[5-24C]Dodecin-(3)-ol-(1): In einem gut isolierten 250-ml-Dreihalskolben, der mit Rührer, Tropftrichter und einer mit Trockeneis beschickten Kühlfalle versehen war, wurden 100 ml Ammoniak kondensiert und aus 150 mg (21,6 mMol) Lithium das Amid bereitet. Dann wurden 2,7 g (17,5 mMol) II in 5 ml trockenem Äther gelöst, langsam in die Lithiumamidlösung eingetropft und 3 Stdn. nachreagieren gelassen. 2,04 g (8,5 mMol) I in 10 ml Äther wurden über 3 Stdn. eingetropfe und über Nacht gerührt. Nach dem Verdampfen des Ammoniaks wurde der Rückstand mit Wasser versetzt und der Pyranyläther im Flüssigkeitsextraktor mit Ather 12 Stdn. extrahiert. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, 4 ml 25proz. Schweielsaure und so viel Methanol zugesetzt, daß ein einphasiges System entstand. Man erhitzte 60 Min. unter Rückfluß, destillierte die Hauptmenge des Methanols ab, setzte 10 ml gesätt. Kochsalzlösung zu und extrahierte 3mal mit Äther. Nach dem Trocknen, Neutralwaschen und Einengen der vereinigten Ätherexisakte wurde der Rückstand fraktioniert destilliert. Das Dodecin-(3)-ol-(1) siedete bei Sdp<sub>5.55</sub> 100—102°; n<sup>23</sup><sub>D</sub> = 1,4577. Ausb.: 1,36 g (7,05 mMol), entspr. 83% d. Th. bezozen auf I.

[5-4C]Dodecin-(3)-saure(IV): 0.93 g (5.0 mMol) [5-4C]Dodecin-(3)ol-(I) wurden in einem 100-ml-Zweihalskolben unter Rühren in 25 ml Assion gelöst und über 6 Stdn. eine Chromsäurelösung (0,68 g entspr. 6,8 mMol CrO, 0.59 ml konz. Schwefelsäure und 3,4 ml Wasser) unter Eiskühlung und heftigem Rühren zugetropft. Es wurden dann 3 Vol. Wasser zugegeben und die Same in Äther aufgenommen. Durch Extraktion mit 2n NH40H wurden Saure und Unversenbares getrennt. Die Säure fiel nach dem Ansäuern mit 2n H.SO, kristallim an und wurde aus Petroläther (30-60°) umkristallisiert. Farblose Blättehen Schmp. 49°. Ausb.: 0,82 g (4,1 mMol) entspr. 82% d. Th. Spezif. Aktivität 1,74 × 10<sup>5</sup> Zpm pro aMol. Aquivalent-Gew.: Gef. 192/190; Ber. 196. Der Methylester der Saure

war gaschromatographisch rein.

15 H. Schlubach u. V. Wolf, Liebigs Ann. Chem. 568, 141 [1950].

<sup>35</sup> M. Calvin, C. Heidelberger, J. C. Reid, B. M. Tolbert u. P. E. Yankwich in "Isotopic Carbon", John Wiley & Sons, New York 1949.

[5.14C] Dodecen-(3c)-säure(V): Die partielle Hydrierung erfolgte wie in der I. Mitteilung beschrieben 12. 300 mg (1,53 mMol) IV wurden in 15 ml n-Heptan der I. Mitteilung beschrieben 12. 300 mg (1,53 mMol) IV wurden in 15 ml n-Heptan bei Zimmertemperatur und 100 Torr hydriert. Nach 20 Min. war die Wasserstoff-aufnahme beendet (38 ml). Es wurde vom Katalysator abfiltriert, mit Petroläther gewaschen und die Lösung mit 2n HCl und Wasser gut gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Den Rückstand bildete ein leicht gelbliches Öl. Ausb.: 0,299 g (1,51 mMol) entspr. 99% d. Th. Der Methylester war gaschromatographisch rein. Daher wurde auf die Destillation des radioaktiven Produktes verzichtet. In einem inaktiven Vorversuch siedete die Säure bei Sdp.<sub>6,3</sub> 140—141°; n<sup>21</sup><sub>D</sub> = 1,4527. Äquivalent-Gew.: Gef. 197/195; Ber. 198.

Nach dem oxydativen Abbau wurde als einzige Dicarbonsäure Malonsäure (0,41 Mol/Mol V) gefunden; der reduktive Abbau lieferte allein Pelargonaldehyd (0,725 Mol/Mol V). Die Identifizierung erfolgte als 2.4-Dinitro-phenylhydrazon, das dünnschichtehromatographisch mit einer authent. Probe identisch war.

## [1-14C]Dodecen-(2c)-saure

Undecin-(1): 1,1 Mol Natriumamid wurden in 1,5 l flüssigem Ammoniak mit 1 Mol Nonylbromid in der schon beschriebenen Weise<sup>17</sup> umgesetzt und das Reaktionsprodukt über den Silberkomplex nach Young und Mitarbeitern<sup>18</sup> gereinigt. Ausb.: 0,55 Mol, entspr. 55% d. Th. Sdp.<sub>12</sub> 88—89°, n<sup>2</sup><sub>9</sub> = 1,4282.

Athylbromid wurde die Grignard-Verbindung in 20 ml trockenem Äther bereitet und mit 3.8 g (25 mMol) Undecin-(1) umgesetzt. Die Carboxylierung wurde nach Calvin<sup>15</sup> durchgeführt, wobei ein 70proz. Überschuß an Grignard-Verbindung auf 3,0 g (15 mMol) Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> eingesetzt wurde. Nach der Aufarbeitung wurden 2,54 g (13 mMol) oder 88% d. Th. eines farblosen Öls erhalten. Nach der partiellen Hydrierung mit Lindlar-Katalysator (2,5 g, entspr. 12,8 mMol, Dodecin-(2)-säure, 0,5 g Katalysator, 40 ml Heptan und 0,05 ml Chinolin) wurde die Dodecen-(2c)-säure als fast farbloses Öl, das bei etwa 0° kristallisierte, erhalten. Ausb.: 2,40 g (12,1 mMol) entspr. 95% d. Th.; n<sup>20</sup> = 1,4540. Spezif. Aktivität: 5 × 10<sup>5</sup> Zpm/μMol. Der Methylester war gaschromatographisch rein, vollständige Hydrierung lieferte Laurinsäure (Schmp. 44°). Das IR-Spektrum wies keine trans-Bande bei 10,4 μ auf. Äquivalent-Gew.: Gef. 196/197; Ber. 198.

## Dodecen-(2t)-säure

3,64 g (35 mMol) trockene Malonsäure wurden in 5,5 ml trockenem Pyridin unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit in einem 50-ml-Rundkolben gelöst und 60 Stdn. mit 5,0 g (32 mMol) frisch dest. Caprinaldehyd bei Zimmertemperatur gerührt, dann auf siedendem Wasserbad bis zur Beendigung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung (etwa 8 Stdn.) erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Entfernung des Pyridins mit eiskalter 2n HCl ausgeschüttelt und die reine Säure nach Verteilung zwischen Äther und 2n NH<sub>4</sub>OH erhalten. Fraktionierte Hochvakuumdestillation lieferte 4 g (20 mMol), entspr. 63% d. Th. eines farblosen Öls, Sdp.<sub>0-01</sub> 108—109°; n<sup>20</sup><sub>2</sub> = 1,4625. Der Methylester war gaschromatographisch rein, der hydrierte Methylester hatte das dem Laurinsäure-methylester entsprechende Retentionsvolumen. Die Hydrierzahl betrug in der Doppelbestimmung 99 und 102% d. Th. Das IR-Spektrum zeigte die erwartete mittelstarke trans-Bande bei 10,4 µ. Äquivalent-Gew.: Gef. 194/195; Ber. 198.

# [8-14C] Dodecadien - (3c.6c) - saure (XIII)

Nach der für V gegebenen Reaktionsfolge wurde [L-14C]n-Amylbromid (VI) mit einer Gesamtausbeute von 85% d. Th. dargestellt. Die spezif, Aktivität betrug  $2\times 10^5$  Zpm/µMol.

<sup>17</sup> W. Stoffel, diese Z. 333, 71 [1963].

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> C. A. Young, R. R. Vogt u. J. A. Nieuwland, J. Amer. chem. Soc. 58, 55 [1936].

[4-14C]Octin-(2)-ol(1) wurde wie früher für [T]Octin-(2)-ol-(1) beschrieben 17, durch Kupplung von VI und 2-[Propin-(2)-yloxy]-tetrahydropyran (VII) in flüssigem Ammoniak dargestellt und in das Bromid IX über-

geführt. Die Bromierung verlief mit 71% Ausbeute. [8- $^{14}$ C]Dode cadiin-(3.6)-ol-(1) (XI): 2,0 g (80 g-Atom) Magnesiumspäne wurden in 30 m $^l$ Tetrahydrofuran mit 8,7 g (80 mMol) Äthylbromid zur Grignard-Verbindung umgesetzt. 2,8 g (40 mMol) Butin-(1)-ol-(4) in 20 ml Tetrahydrofuran wurden über 30 Min. eingetropft, 4 Stdn. nachreagieren gelassen, dann 500 mg CuCN zugefügt und nach weiteren 10 Min. 3,8 g IX, in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst, zugefügt. Nach 12stdg. Sieden unter Rückfluß wurde mit eiskalter 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zersetzt und der Alkohol durch Ätherextraktion gewonnen. XI siedete bei Sďp., 120°,  $n_{\rm D}^{20}=1,4850.$  Ausb.: 2,32 g (13,1 mMol) entspr. 66% d. Th.

[8-14C]Dodecadiin-(3.6)-säure(XII): 2,32 g (13,1 mMol) XI wurden in 30 ml Aceton gelöst und bei 00 unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1,75 g CrO<sub>3</sub> in 1,75 ml konz. Schwefelsäure und 8,2 ml Wasser über 4 Stdn. versetzt. Es wurde noch etwa 12 Stdn. bei 0º nachgerührt, das Aceton nach Zugabe von 2 Vol. Wasser im Vak. abgedampft. Die Säure wurde zwischen Äther und 2n Ammoniak verteilt. Nach Ansäuern der ammoniakalischen Lösung kristallisierte XII in gelblichen Blättchen. Ausb. nach Umkristallisieren aus Petroläther (30-60°) 1,25 g (6,5 mMol) entspr. 50% d. Th. Farblose fettige Blättchen, Schmp. 65°; p-Brom-phenacyl-

ester: Schmp. 73°.

Der Ester der Säure war gaschromatographisch rein.

Die partielle Hydrierung führte zu der trans-freien Dodecadien-(3c.6c)säure (XIII), deren Methylester gaschromatographisch rein war, die nach der vollständigen Hydrierung Laurinsäure ergab, nach der oxydativen Ozonolyse als einzige Dicarbonsäure Malonsäure und nach der reduktiven Ozonolyse allein Hexanal lieferte, das als Dinitrophenylhydrazon identifiziert wurde. In der quantitativen Mikrohydrierung verbrauchten 6,461 mg der Diensäure: 1,62 ml, theoret. Verbrauch 1.64 ml. Nach der Alkaliisomerisation trat das typische Dien-Spektrum mit einem Maximum bei 236 m $\mu$  auf.  $\varepsilon = 24000 [l \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}].$ 

## Hexen-(3c)-säure

Hexin-(3)-ol-(1): Die Kupplung von Äthylbromid und dem Na-Salz von II wurde nach der für Dodecin-(3)-ol-(1) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Ausbeute betrug 60% d. Th. Der Tetrahydropyranyläther wurde in der 10fachen Menge (v/v) Methanol gelöst und nach der Zugabe von 2 g p-Toluolsulfonsäure 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Die Lösung wurde mit methanolischer KOH neutralisiert, eingeengt, das Natriumtosylat abgesaugt und nach dem vollständigen Abdampfen des Lösungsmittels fraktioniert destilliert. Das Hexin-(3)-ol-(1) siedete bei Sdp.<sub>12</sub> 66°;  $n_D^{20} = 1,4535$ . Hexin-(3)-säure: Die Chromsäureoxydation wurde in der für IV beschrie-

benen Weise durchgeführt. 14 g (0,14 Mol) Hexin-3-ol-(1) lieferten 10 g (0,09 Mol) Hexin-(3)-säure, entspr. 64% d. Th. Die Säure kristallisierte aus Petroläther

(30-60°) in langen Nadeln. Schmp. 59°.

Die Halbhydrierung führte zu einem gaschromatographisch reinen Produkt. Es war frei von trans-Isomeren. Aquivalent-Gew.: Gef. 113/116; Ber. 114.

[1-14C]Octen-(2c)-säure

Carboxylierung der Grignard-Verbindung von Heptin-(1) mit 14CO, in der für [1-14C]Dodecen-(2)-säure beschriebenen Weise führte zur kristallinen [1-14C]-Octin-(2)-säure (Schmp. 5°, Sdp. 0.08 96°;  $n_D^{00} = 1,4612$ ), die mit Lindlar-Katalysator zu der gaschromatographisch reinen Octen-(2c)-säure halbhydriert wurde. Der hydrierte Methylester hatte ein dem Caprylsäure-methylester identisches Retentionsvolumen. Spezif. Aktivität:  $1{,}75 \times 10^5 \,\mathrm{Zpm}/\mu\mathrm{Mol.}$  Äquivalent-Gew.: Gef. 144/145; Ber. 146.

DL-3-Hydroxy-laurinsäure

13,0 g (0,2 Mol) durch Kupfer aktivierte Zinkspäne in 10 ml Essigester/Benzol 1:1 wurden in einem mit Rückflußkühler, Rührer und Tropftrichter versehenen Dreihalskolben unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit mit einem Gemisch von 31 g (0,2 Mol) Caprinaldehyd und 30,6 g (0,2 Mol) Bromessigsäure-methylester in 60 ml Essigester-Benzol unter Erwärmen und Rühren tropfenweise versetzt. Nachdem die Reaktion in Gang gekommen war, wurde die Heizquelle entfernt und die Reaktion durch weitere Zugabe des Aldehyd-Bromessigester-Gemisches unterhalten. Nach 2stdg. Sieden unter Rückfluß wurde das erkaltete Gemisch mit eiskalter 6n HCl versetzt und der Ester mit Ather extrahiert. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand mit 5proz. methanol. KOH 1 Stde. unter Rückfluß gekocht. Unverseifbares wurde mit Petroläther extrahiert und die alkalische Lösung angesäuert. Es wurden 28 g krist. Rohprodukt isoliert. Nach dem Umkristallisieren aus Petroläther (60—90°) wurden 22 g (0,1 Mol), Dr.3-Hydroxy-laurinsäure, entspr. 50% d. Th., als farblose Kristalle vom Schmp. 51° erhalten. Der Methylester war gaschromatographisch einheitlich. Äquivalent-Gew.: Gef. 214/213; Ber. 216.

Racematspaltung der DL-3-Hydroxy-laurinsäure:  $Racem. \alpha$ -Phenyläthylamin wurde nach Theilacker<sup>19</sup> über das rechtsdrehende weinsaure Salz in die reinen optischen Antipoden zerlegt:  $[\alpha]_{12}^{12}$ :  $\pm 40^{\circ}$ ; Sdp.<sub>12</sub> 73°. 11,6 g (96 mMol)  $(-)\alpha$ -Phenyl-äthylamin wurden in Stickstoffatmosphäre in 50 ml Aceton zugefügt und 20,8 g (96 mMol) racem. 3-Hydroxy-laurinsäure in 150 ml Aceton zugefügt und kurz zum Sieden erhitzt, filtriert und langsam auf 0° abgekühlt. Es kristallisierten 21,3 g des Salzes aus. Nach vielfachem Umkristallisieren wurde reine D(-)-3-Hydroxy-laurinsäure mit einer Drehung von  $[\alpha]_{12}^{20}$ :  $-16,5^{\circ}$  erhalten (c=1 in CHCl<sub>3</sub>). Die Umsetzung von 2,54 g (11,5 mMol) racem. 3-Hydroxy-laurinsäure mit 1,38 g (11,5 mMol)  $(+)\alpha$ -Phenyl-äthylamin in Aceton und anschließende mehrfache Kristallisation ergab das rechtsdrehende Enantiomorphe  $[\alpha]_{12}^{20}$ :  $+16,5^{\circ}$ .

Die Methylester hatten einen Drehvert von [8] $_{9}^{2}$ : ±19,6 $^{6}$  (c = 1 $^{7}$ in CHCl<sub>3</sub>). Synthese der Coenzym-A-Ester: Alle Coenzym-A-Ester wurden nach folgenden für Dodecen-(3 $^{\circ}$ )-oyl-CoA gegebenen Methode synthetisiert, die sich

an die Vorschrift von Wieland und Bernhard20 anlehnt.

14 mg (70 µMol) [5-14C]Dodecen-(3c)-säure wurden in 1 ml Tetrahydrofuran gelöst und bei —15° unter Rühren mit einer äquivalenten Menge Triäthylamin und Chlorkohlensäure-äthylester 2 Stdn. bei —15° gerührt. Es wurde über eine kleine vorgekühlte Glasfritte vom Triäthylammoniumchlorid in eine gekühlte Vorlage, in der sich 20 mg Coenzym A in 1,3 ml Wasser gelöst befanden, abgesaugt und der Rückstand mit 1 ml kaltem Tetrahydrofuran nachgewaschen. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 8,5—8,7 mit NaOH konstant gehalten und bei Zimmertemperatur so lange gerührt, bis die Nitroprussid-Reaktion negativ war. Die Lösung wurde dann unter Eiskühlung mit 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 1 eingestellt, das Tetrahydrofuran im Stickstoffstrom abgeblasen. Die CoA-Verbindung fiel dabei amorph aus. Das Präzipität wurde mehrfach mit peroxydfreiem Äther gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr eluierbar war. Die wäßr. Lösung wurde lyophilisiert und der Rückstand in 5 ml Wasser gelöst.

Bestimmung der Ausbeute: 1. Verzögerter Nitroprussidtest (Absorptions-maximum nach 12 Min.):  $16 \,\mu\text{Mol}$  (62%) d. Th.; 2. Radioaktivitätsbestimmung:  $2.6 \times 10^6 \,\text{Zpm}$ ,  $15 \,\mu\text{Mol}$  (58% d. Th.) (spezif. Akt. der [5-14C]Dodecen-(3c)-säure  $1.74 \times 10^5 \,\text{Zpm}/\mu\text{Mol}$ ). Radiopapierchromatographie: System Propanol-(2)/Pyridin/Wasser 1:1:1 aufsteigend, Schleicher & Schüll 2043b<sup>7</sup>.  $R_F$ -Wert: 0,61.

Die Ausbeuten für die übrigen CoA-Ester-Synthesen lagen in wiederholten

Versuchen zwischen 50 und 60% d. Th.

#### Zusammenfassung

Die chemische Synthese der folgenden  $\beta.\gamma$ -ungesättigten und  $\alpha.\beta$ ungesättigten Säuren, die als Intermediärprodukte im Verlauf der  $\beta$ -Oxy-

W. Theilacker in Houben-Weyl, Methoden d. organ. Chemie, Bd. IV/2,
 S. 518, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1955.
 Th. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 [1951].

dation der Mono- und Polyenfettsäuren auftreten, wird beschrieben:  $[5^{-14}C]$ Dodecen-(3c)-säure,  $[8^{-14}C]$ Dodecadien-(3c.6c)-säure,  $[1^{-14}C]$ Dodecen-(2c)-säure,  $[1^{-14}C]$ Octen-(2c)-säure, Hexen-(3c)-säure, Dodecen-(2t)-säure und DL-3-Hydroxy-laurinsäure. Das Racemat konnte in die reinen optischen Antipoden zerlegt werden. Ferner wird die Synthese der Coenzym-A-Derivate der cis- $\beta$ - $\gamma$ -, der trans- $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigten und der 3-Hydroxysäuren beschrieben.

# Summary

The chemical synthesis of the following  $\beta, \gamma$ -unsaturated and  $\alpha, \beta$ -unsaturated acids, intermediates in the  $\beta$ -oxidation of mono- and polyene fatty acids, is described:  $[5^{-14}\mathrm{C}]3\text{-}cis\text{-}\text{-}\text{odecenoic}$  acid,  $[8^{-14}\mathrm{C}]3\text{-}cis\text{-}\text{-}\text{odecenoic}$  acid,  $[1^{-14}\mathrm{C}]2\text{-}cis\text{-}\text{-}\text{odecenoic}$  acid,  $[1^{-14}\mathrm{C}]2\text{-}cis\text{-}\text{-}\text{odecenoic}$  acid,  $[1^{-14}\mathrm{C}]2\text{-}cis\text{-}\text{-}\text{otenoic}$  acid, 3-cis--hexenoic acid, 2-trans--dodecenoic acid and DL-3-hydroxy-lauric acid. The racemate was resolved into its pure optical antipodes. The CoA derivatives of the  $cis\text{-}\beta, \gamma$ -, and the  $trans\text{-}\alpha, \beta$ -unsaturated and the 3-hydroxyacids were also prepared.

Doz. Dr. W. Stoffel, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Straße 52.