Der Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren, VIII[1]

Chemische Synthese und Stoffwechsel der [1-^{14}C]7*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure und der [1-^{14}C]7*t*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure

Von

Wilhelm Stoffel, Hans-Gerd Schiefer und **Reiner Ditzer**

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln

(Der Schriftleitung zugegangen am 15. Dezember 1965)

Herrn Prof. Dr. C. Martius zum 60. Geburtstag gewidmet

In der vorangehenden Arbeit[1] berichteten wir über Untersuchungen zum Mechanismus der stellungs- und stereospezifischen Olefinierungsreaktion an Polyenfettsäuren. Eine der dort diskutierten Möglichkeiten ist die Einführung einer Doppelbindung in Konjugation zu der der Carboxylgruppe am nächsten stehenden Doppelbindung mit anschließender enzymatischer Stellungsisomerisierung in Homoallylstellung. Ein hypothetisches 1.3-*all-cis-* oder 1.3-*cis-trans-* sollte danach in ein 1.4-*all-cis*-diolefinisches System übergehen.

Mead und Mitarbeiter[2, 3] haben in Versuchen in vivo gezeigt, daß [1-^{14}C]9*c*.12*c*-Octadecadiensäure ($\Delta^{9.12}$-C_{18}, Linolsäure) und [1-^{14}C]6*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure ($\Delta^{6.9.12}$-C_{18}, γ-Linolensäure) in 5*c*.8*c*.11*c*.14*c*-Eicosatetraensäure ($\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}, Arachidonsäure) umgewandelt werden, und postulierten folgenden Biosyntheseweg:

$$\Delta^{9.12}\text{-}C_{18} \rightarrow \Delta^{6.9.12}\text{-}C_{18} \rightarrow \Delta^{8.11.14}\text{-}C_{20} \rightarrow \Delta^{5.8.11.14}\text{-}C_{20}$$

Ein zweiter Biosyntheseweg muß nach den Versuchen in vitro von Stoffel[4, 5] angenommen werden. Der mikrosomale Enzymkomplex für die Kettenverlängerung synthetisiert aus $\Delta^{9.12}$-C_{18}-CoA $\longrightarrow$ $\Delta^{11.14}$-C_{20}-CoA, das mit gleicher Geschwindigkeit wie $\Delta^{8.11.14}$-C_{20}-CoA durch das mikrosomale Olefinierungsenzym in $\Delta^{5.8.11.14}$-C_{20}-CoA übergeführt wird.

Würde bei der Bildung der 6*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure aus der 9*c*.12*c*-Octadecadiensäure die neu einzuführende Doppelbindung zunächst zwischen den C-Atomen 7 und 8, d. h. in Konjugation zur bereits bestehenden Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 der Linolsäure ein-

[1] VII. Mitteil.: W. Stoffel u. H.-G. Schiefer, diese Z. **344**, 41 [1966], vorstehend.

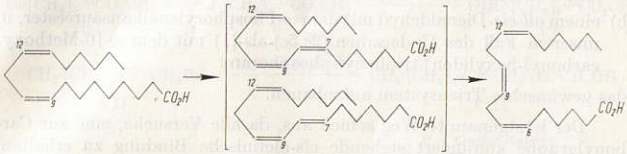
[2] G. Steinberg, W. H. Slaton, D. R. Howton u. J. F. Mead, J. biol. Chemistry **220**, 257 [1956].

[3] J. F. Mead u. D. R. Howton, J. biol. Chemistry **229**, 575 [1957].

[4] W. Stoffel, Biochem. biophysic. Res. Commun. **6**, 270 [1961].

[5] W. Stoffel u. K.-L. Ach, diese Z. **337**, 123 [1964].

geführt werden, so sollten die 7*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure oder die geometrisch isomere 7*t*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure intermediär entstehen. Anschließend könnte dann eine enzymatische 1.3—1.4-Isomerisierung zur 6*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure führen.



Ein entsprechender Mechanismus könnte auch von der 8.11.14-Eicosatriensäure abgeleitet werden. Dieser hypothetische Mechanismus konnte nun durch Versuche in vivo und in vitro ausgeschlossen werden. Im folgenden soll über die chemische Synthese und den Stoffwechsel der 7.9.12-Octadecatriensäuren in der Ratte berichtet werden.

Synthese der 7.9.12-Octadecatriensäuren

Die Totalsynthese von natürlich vorkommenden Polyenfettsäuren ist erst in den letzten Jahren durch die Methode von Osbond und Wickens[6, 7] in befriedigender Ausbeute möglich geworden. Diese Methode führt in Abwandlung der Synthese der α-Linolensäure von Nigam und Weedon[8] direkt die ω-Acetylensäure ein und umgeht dadurch die Hydrolyse eines ω-Acetylen-Acetals mit anschließender Oxydation des dabei freigesetzten Aldehyds. Ein anderer Weg[9], der sich besonders für die Synthese carboxyl-^{14}C-markierter Polyenfettsäuren bewährt hat, ist die Einführung einer Nitrilgruppe in ein endständiges Polyenchlorid mit anschließender saurer Verseifung des Nitrils; die Nitrilsynthese in Dimethylsulfoxyd[10] und die Verseifung verlaufen in fast quantitativen Ausbeuten. Alle diese Methoden führen zu Polyensystemen mit *cis*-olefinischen Doppelbindungen, die durch eine einzelne Methylengruppe isoliert sind, also Polyallylstruktur besitzen.

Die Synthese der 7.9.12-Octadecatriensäure erfordert den Aufbau eines Triensystems mit einer isolierten und zwei konjugierten olefinischen Bindungen. Für die Bildung der konjugierten Doppelbindung bot sich die Wittig-Reaktion an, auf deren Bedeutung für die chemische

---

[6] J. M. Osbond u. J. C. Wickens, Chem. and Ind. **1959**, 1288.

[7] J. M. Osbond, P. G. Philpott u. J. C. Wickens, J. chem. Soc. [London] **1961**, 2779.

[8] S. S. Nigam u. B. C. L. Weedon, Chem. and Ind. **1955**, 1555; J. chem. Soc. [London] **1956**, 4049.

[9] W. Stoffel, Liebigs Ann. Chem. **673**, 26 [1964].

[10] R. A. Smiley u. C. Arnold, J. org. Chemistry **25**, 257 [1960].

Synthese von ungesättigten Fettsäuren Bergelson und Schemjakin[11] hingewiesen haben. Mit Hilfe der Wittig-Reaktion sollte es möglich sein, durch Kupplung von

a) einem *all-cis*-Dien-Phosphorylen mit einem ω-Aldehydester, in unserem Fall der Verbindung XII mit dem Aldehyd VI, oder

b) einem *all-cis*-Dienaldehyd mit dem ω-Phosphorylenalkansäureester, in unserem Fall des Undecadien-(2*c*.5*c*)-als-(1) mit dem ω-[6-Methoxycarbonyl-hexyliden]-triphenyl-phosphoran,

das gewünschte Triensystem aufzubauen.

Der letztgenannte Weg schied aus, da alle Versuche, eine zur Carbonylgruppe konjugiert stehende cis-olefinische Bindung zu erhalten, fehlschlugen. Zwar konnte durch Kupplung von 1-Brom-octin-(2) mit Propiolaldehyddiäthylacetal Undecadiin-(2.5)-al-(1)-diäthylacetal in befriedigender Ausbeute und durch katalytische Halbhydrierung mit Lindlar-Katalysator das entsprechende Undecadien-(2*c*.5*c*)-al-(1)-diäthylacetal in gaschromatographisch reiner Form erhalten werden, doch führte die durch Säure katalysierte Acetalspaltung unter verschiedenen Bedingungen (HCl/Dioxan; Eisessig; Dowex 50, $H^{\oplus}$-Form; Oxalsäure/Wasser) im Falle des Diinacetals zur Polymerisation, während das Dienacetal vollständig hydrolysiert, aber gleichzeitig zum Undecadien-(2*t*.5*c*)-al-(1) isomerisiert wurde. Die geometrische Isomerisierung von Nonadien-(2*c*.6*c*)-al-(1)-diäthylacetal zum 2-*trans*-Isomeren bei der Hydrolyse mit 2N H_2SO_4 wurde von Sondheimer[12] beschrieben.

Wir wählten daher den im Schema wiedergegebenen Syntheseweg. In der letzten Stufe wird dabei XII mit VI kondensiert. Der Aldehydester ist in der Carboxylgruppe ^{14}C-markiert.

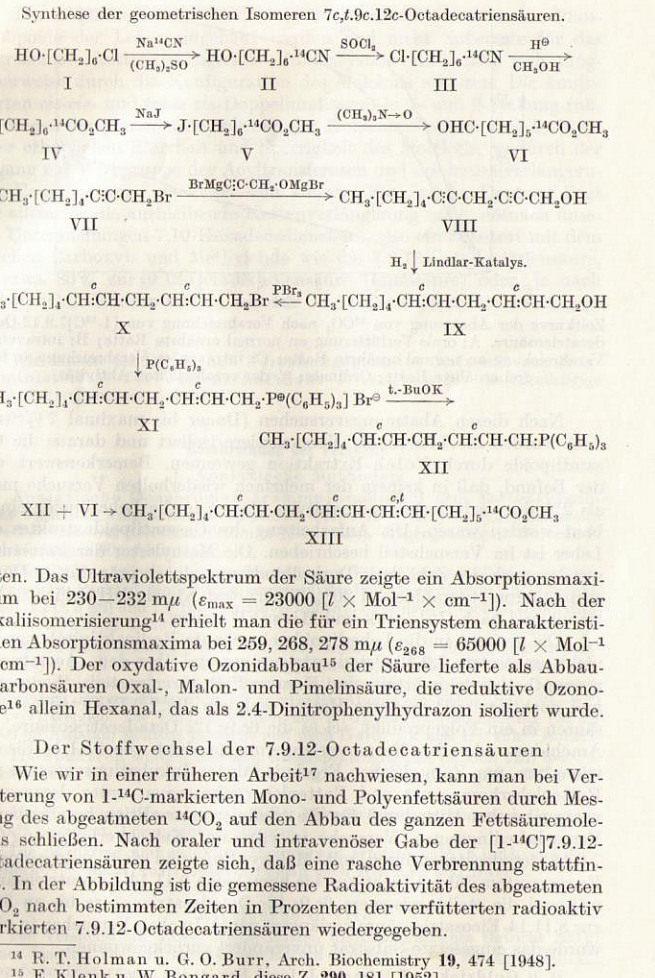
Die Wittig-Reaktion liefert stets ein Gemisch der *cis*- und *trans*-Isomeren. Auch unter den von Schemjakin[11] angegebenen Reaktionsbedingungen treten *cis*- und *trans*-Isomere als Produkte in unterschiedlichen Verhältnissen auf. Die Bildung der beiden isomeren 7.9.12-Octadecatriensäuren war besonders günstig, da beide Verbindungen auf ihre Funktion als Vorstufen für die 6*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure untersucht werden sollten.

Die Methylester der isomeren Säuren kann man präparativ dünnschichtchromatographisch auf 20% Silbernitrat-Kieselgel-H-Schichten[13] im Lösungsmittelsystem Heptan/Essigester 7:3 (v/v) oder Äther/Petroläther (Sdp. 30—60°) 1:3 (v/v) trennen; im System Äther/Petroläther hatte die *trans*-Säure einen R_F-Wert von 0,56, die *cis*-Säure von 0,46.

Die Ester wurden auf folgende Weise charakterisiert: Vollständige katalytische Hydrierung ergab analysenreine Stearinsäure. Das ermittelte Äquivalentgewicht der Säure entsprach dem theoretisch berech-

[11] L. D. Bergelson u. M. M. Schemjakin, Angew. Chem. **76**, 113 [1964].
[12] F. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. **74**, 4042 [1952].
[13] C. B. Barrett, M. S. J. Dallas u. F. B. Padley, J. Amer. Oil Chem. Soc. **40**, 580 [1963].

Synthese der geometrischen Isomeren 7*c*,*t*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäuren.

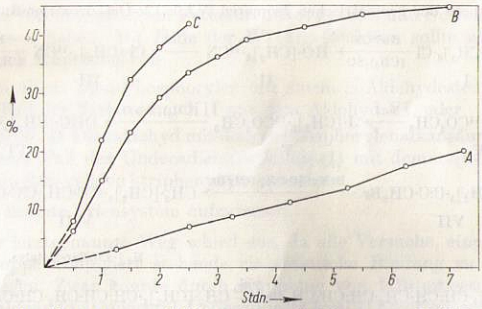


neten. Das Ultraviolettspektrum der Säure zeigte ein Absorptionsmaximum bei 230—232 mμ (ε_{max} = 23000 [l × Mol^{-1} × cm^{-1}]). Nach der Alkaliisomerisierung[14] erhielt man die für ein Triensystem charakteristischen Absorptionsmaxima bei 259, 268, 278 mμ (ε_{268} = 65000 [l × Mol^{-1} × cm^{-1}]). Der oxydative Ozonidabbau[15] der Säure lieferte als Abbaudicarbonsäuren Oxal-, Malon- und Pimelinsäure, die reduktive Ozonolyse[16] allein Hexanal, das als 2.4-Dinitrophenylhydrazon isoliert wurde.

Der Stoffwechsel der 7.9.12-Octadecatriensäuren

Wie wir in einer früheren Arbeit[17] nachwiesen, kann man bei Verfütterung von 1-^{14}C-markierten Mono- und Polyenfettsäuren durch Messung des abgeatmeten $^{14}CO_2$ auf den Abbau des ganzen Fettsäuremoleküls schließen. Nach oraler und intravenöser Gabe der [1-^{14}C]7.9.12-Octadecatriensäuren zeigte sich, daß eine rasche Verbrennung stattfindet. In der Abbildung ist die gemessene Radioaktivität des abgeatmeten $^{14}CO_2$ nach bestimmten Zeiten in Prozenten der verfütterten radioaktiv markierten 7.9.12-Octadecatriensäuren wiedergegeben.

[14] R. T. Holman u. G. O. Burr, Arch. Biochemistry **19**, 474 [1948].
[15] E. Klenk u. W. Bongard, diese Z. **290**, 181 [1952].
[16] E. Klenk u. G. Kremer, diese Z. **320**, 111 [1960].
[17] W. Stoffel u. H.-G. Schiefer, diese Z. **341**, 84 [1965].



Zeitkurve der Abatmung von $^{14}CO_2$ nach Verabreichung von [1-^{14}C]7.9.12-Octadecatriensäure. A: orale Verfütterung an normal ernährte Ratte; B: intravenöse Verabreichung an normal ernährte Ratte; C: intravenöse Verabreichung an fettfrei ernährte Ratte; Ordinate: % der verabreichten Aktivität.

Nach diesen Abatmungsversuchen (Dauer bis maximal 7½ Stunden) wurden die Lebern der Versuchstiere isoliert und daraus die Gesamtlipoide durch Folch-Extraktion gewonnen. Bemerkenswert war der Befund, daß in keinem der mehrfach wiederholten Versuche mehr als 2% der verfütterten radioaktiven Säuren in die Leberlipoide eingebaut worden waren. Die Aufarbeitung des Gesamtlipoidextraktes der Leber ist im Versuchsteil beschrieben. Die Methylester der Fettsäuren wurden nach der Zahl ihrer Doppelbindungen durch präparative Dünnschichtchromatographie auf 20% Silbernitrat-Kieselgel-H-Schichten getrennt und nach Goldrick und Hirsch[18] isoliert.

Die geringe, in die Leberlipoide eingebaute Radioaktivität war auf nicht umgesetzte 7.9.12-Octadecatriensäure und über den „Acetatpool" neusynthetisierte gesättigte und Monoen-Fettsäuren verteilt. Weder normal noch fettfrei[19] ernährte Ratten wandeln die 7.9.12-Octadecatriensäuren in ein Folgeprodukt, sei es die 6*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure, die Arachidon- oder das Kettenverlängerungsprodukt, die 9.11.14-Eicosatriensäure, um. Zum gleichen Ergebnis führten Inkubationsversuche mit Rattenleberhomogenat und Rattenlebermikrosomen unter den in der vorangehenden Mitteilung[1] für die Olefinierungsreaktion beschriebenen Versuchsbedingungen. Versuche in vitro zur Kettenverlängerung der 7.9.12-Octadecatriensäuren mit Malonyl-CoA und dem mikrosomalen Enzymsystem führen nicht zur bis-homologen 9.11.14-Eicosatriensäure, während die stellungsisomere 6*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure bis zu 80% zur 8.11.14-Eicosatriensäure verlängert wird[5]. In allen Versuchen in vitro wurde das eingesetzte Substrat unverändert zurückgewonnen.

[18] B. Goldrick u. J. Hirsch, J. Lipid Res. **4**, 482 [1963].

[19] G. O. Burr u. M. M. Burr, J. biol. Chemistry **82**, 345 [1929]; ebenda **86**, 587 [1930].

Der Befund, daß die 7.9.12-Octadecatriensäuren nicht in die Phospholipoide der Leber eingebaut werden und nicht Substrate für das mikrosomale kettenverlängernde Enzymsystem sind, läßt sich möglicherweise durch die Konfiguration des Moleküls erklären. Die konjugierten *cis-cis-* und *trans-cis*-Doppelbindungen in 7- und 9-Stellung führen wegen der planaren Anordnung der Kohlenstoffatome 7, 8, 9, 10 zu einer erheblichen Starrheit und Sperrigkeit des Moleküls, wodurch der Zugang zur Wirkgruppe der Acyltransferasen und des kettenverlängernden Enzymsystems erschwert sein könnte. Eine solche Deutung liegt vor allem für die ausbleibende Kettenverlängerung nahe, da nach unseren Untersuchungen 7.10-Hexadecadiensäure, also ein Substrat mit dem gleichen Carboxyl- und Methylende wie die 7.9.12-Octadecatriensäure, zu etwa 80% zur 9.12-Octadecadiensäure (Linolsäure) oder, je nach Malonyl-CoA-Konzentration, bis zur 11.14-Eicosadiensäure verlängert wird.

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

Beschreibung der Versuche

1. Analytische Methoden

Analytische Gaschromatogramme wurden auf dem Barber-Colman-Gerät Modell 10 aufgenommen; stationäre Phase 15% Äthylenglykol-Bernsteinsäure-Polyester auf Kieselgur (0,15 mm Korngröße), Trägergas Argon, Durchflußgeschwindigkeit 60 ml/Min.

Die Radioaktivitäten wurden mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer der Fa. Packard, Modell 3214, gemessen. Als Phosphore dienten 2.5-Diphenyloxazol (PPO, 5 g/*l*) und 1.4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP, 0,3 g/*l*) in Toluol.

Die *cis-trans*-isomeren 7.9.12-Octadecatriensäuren und die Polyenfettsäuremethylester nach der Anzahl ihrer Doppelbindungen ließen sich dünnschichtchromatographisch auf 20% Silbernitrat-Kieselgel-H-Schichten[13] im Lösungsmittelsystem Heptan/Essigester 7:3 (v/v) oder Äther-Petroläther (Sdp. 30—60°) 1:3 (v/v) trennen. Die Banden wurden mit 2.7-Dichlorfluoresceinlösung (30 mg in 100 m*l* Äthanol) sichtbar gemacht und nach Goldrick und Hirsch[18] isoliert.

IR-Spektren wurden mit dem Gitterspektrographen (Modell 125) der Fa. Perkin-Elmer, UV-Spektren mit dem Beckman-UV-Spektrographen DK 2 aufgenommen.

Die Wasserstoffzahl wurde in der Mikrohydrierapparatur nach Causon-Kaas[20] bestimmt, Lösungsmittel Eisessig.

Die oxydative und reduktive Ozonolyse erfolgte nach Klenk und Mitarbeitern[15, 16], die Alkaliisomerisierung nach Holman und Burr[14].

2. Versuche in vivo

Die Versuchstiere waren Wistar-Ratten (durchschnittliches Gewicht 200 g) eigener Inzucht. Die fettfrei ernährten Ratten erhielten die von Burr und Burr[19] angegebene Diät.

---

[20] N. Causon-Kaas u. F. Limborg, Acta chem. scand. 1, 884 [1947].

Die radioaktiv markierten Fettsäuren wurden entweder per os mit der Schlundsonde als alkoholisch-wäßrige Suspension oder intravenös durch die Schwanzvene als Fettsäure-Albumin-Komplex verabreicht, der wie folgt dargestellt wurde: eine wäßrige Lösung von 15 μMol 7.9.12-Octadecatriensäure-Ammoniumsalz wurde bei 37° während 15 Min. mit 1 *ml* einer Albuminlösung (50 g/*l*; Rinderserumalbumin, trocken, reinst, Behring-Werke) in wäßriger Kochsalz-Lösung (9 g/*l*) geschüttelt. Oral wurden 30 mg (110 μMol Gesamtradioaktivität 13,2 $\times$ 10^6 Zpm), intravenös 4 mg (15 μMol, Gesamtradioaktivität 1,8 $\times$ 10^6 Zpm) 7.9.12-Octadecatriensäure verabreicht.

Der Verlauf der Resorption und des Abbaus der verfütterten Fettsäure wurde durch Radioaktivitätsmessung des abgeatmeten $^{14}CO_2$ nach Fredrickson und Ono[21] gemessen. Nach einer Versuchsdauer von maximal $7^1/_2$ Stdn. wurden die Tiere getötet, die Leber wurde homogenisiert und mit Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) viermal in der Siedehitze unter Stickstoff extrahiert. Nach der Umesterung des Gesamtlipoidextraktes wurden die Methylester verseift, Unverseifbares abgetrennt und die freien Fettsäuren erneut verestert.

3. Synthese der [1-^{14}C]7*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure und der [1-^{14}C]7*t*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure

a) [1-^{14}C]7-Oxo-heptansäure-methylester (VI)

7-Hydroxy-heptansäure-nitril (II): 27,3 g (0,20 Mol) Hexamethylenchlorhydrin (I) wurden zu 11,3 g (0,23 Mol) trockenem Natriumcyanid in 50 *ml* über Calciumhydrid getrocknetem Dimethylsulfoxyd unter Rühren und Wasserausschluß bei einer Anfangstemperatur von 90° so zugetropft, daß die Temperatur 140° nicht überstieg. Man ließ 3 Stdn. bei 130° nachreagieren, fügte nach dem Erkalten 100 *ml* Wasser zu und extrahierte mehrfach mit Äther. Ausb. 19 g (0,14 Mol) II, entspr. 70% d. Th.

7-Chlor-heptansäure-methylester (IV): II wurde in 35 *ml* Benzol gelöst; 71,5 g (44 *ml*, 0,6 Mol) Thionylchlorid wurden unter Eiskühlung zugetropft; man ließ über Nacht bei Raumtemperatur nachreagieren und erhitzte noch 2 Stdn. zum Sieden. Nach Abdampfen des Benzols und Thionylchlorids wurde das rohe 7-Chlor-heptansäure-nitril (III) mit 150 *ml* 25 gew.-proz. methanol. Salzsäure und 3,6 *ml* (0,2 Mol) Wasser 3 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Das Methanol wurde dann weitgehend abgedampft, Wasser zugefügt und der Ester in Äther aufgenommen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 und Abdampfen des Äthers ging IV bei der frakt. Destillation bei $Sdp._{12} = 110$—$111°$ über; $n_D^{17} = 1{,}4441$. Ausb. 22 g (0,123 Mol) IV, entspr. 87% d. Th.

7-Jod-heptansäure-methylester (V): 21 g (0,118 Mol) IV wurden mit 49,5 g (0,33 Mol) trockenem Natriumjodid in 150 *ml* trockenem Aceton unter Rühren 18 Stdn. zum Sieden erhitzt. Vom NaJ wurde abfiltriert, das Aceton weitgehend abgedampft, der Rückstand mit 100 *ml* Wasser versetzt und die organische Phase in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wurde mit Thiosulfat und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Die frakt. Destillation ergab 25,1 g (0,11 Mol) oder 93% d. Th. V, $Sdp._{12} = 102$—$105°$, $n_D^{27} = 1{,}5012$.

In der radioaktiven Synthese wurden an Stelle von inaktivem Natriumcyanid 2 mC ^{14}C-Natriumcyanid eingesetzt und 5,0 g (18,5 mMol) [1-^{14}C]7-Jod-heptansäure-methylester synthetisiert, spezif. Aktivität 1,52 $\times$ 10^5 Zpm/μMol.

[1-^{14}C]7-Oxo-heptansäure-methylester (VI): 5,0 g (18,5 mMol) V und 1,54 g (20,5 mMol) frisch sublimiertes Trimethylaminoxyd[22] in 12 *ml* trockenem Chloroform wurden 3 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit 2N HCl, gesätt. $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde fraktioniert destilliert; $Sdp._{0,7} = 81$—$83°$; $n_D^{16} = 1{,}4703$. Ausb. 1,28 g (8,1 mMol) VI, entspr. 44% d. Th.; spezif. Aktivität 1,52 $\times$ 10^5 Zpm/μMol.

---

[21] D. S. Fredrickson u. K. Ono, J. Lab. clin. Med. **51**, 147 [1958].

[22] V. Franzen u. S. Otto, Chem. Ber. **94**, 1360 [1961].

b) [Undecadien-(2*c*.5*c*)-yl]-triphenyl-phosphoniumbromid (XI)

Undecadien-(2*c*.5*c*)-ol-(1) (IX): 1-Brom-octin-(2) (VII) wurde, wie früher[9] beschrieben, dargestellt und mit der Di-Grignard-Verbindung des Propargylalkohols zu Undecadiin-(2.5)-ol-(1) (VIII) kondensiert. 4,9 g (29,9 mMol) frisch dest. VIII wurden mit 1,5 g Lindlar-Katalysator[23] und 0,8 *ml* Chinolin/n-Heptan 1:3 in 60 *ml* n-Heptan halbhydriert. H_2-Verbrauch: berechnet 1340 *ml*, beobachtet 1350 *ml*. Durch Destillation wurden 4,9 g (29,2 mMol) IX vom $Sdp._{0,3} = 82—83^0$, $n_D^{20} = 1{,}4650$ erhalten. Das Produkt war gaschromatographisch einheitlich und wies im IR-Spektrum keine *trans*-Bande (10,4 μ) auf.

1-Brom-undecadien-(2*c*.5*c*) (X): 4,9 g (29,2 mMol) IX wurden zusammen mit 0,1 *ml* trockenem Pyridin in 25 *ml* trockenem Äther gelöst und bei —15° langsam mit 2,9 g (10,5 mMol) Phosphortribromid (1,02 *ml*) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur weiter gerührt und das Bromid in der üblichen Weise aufgearbeitet. Durch fraktionierte Destillation wurden 4,2 g (18,2 mMol) oder 62% d. Th. X gewonnen; $Sdp._{0,25} = 80^0$, $n_D^{20} = 1{,}4870$. Im IR-Spektrum war keine *trans*-Bande erkennbar.

[Undecadien-(2*c*.5*c*)-yl]-triphenyl-phosphoniumbromid (XI): Eine Lösung von 4,2 g (18,2 mMol) X und 5,8 g (22 mMol) Triphenylphosphin in 65 *ml* trockenem Benzol wurde 10 Stdn. unter Stickstoff zum Sieden erhitzt. Nach dem Abdampfen des Benzols wurde der Rückstand mit trockenem Äther digeriert. Das weiße, feinkristalline Salz wurde rasch abgesaugt, mit trockenem Äther gewaschen und über P_2O_5 und Paraffin im Vakuumexsikkator getrocknet. Ausb. 7,8 g (15,8 mMol) oder 87% d. Th.

c) Wittig-Reaktion

[Undecadien-(2*c*.5*c*)-yliden]-triphenyl-phosphoran (XII) wurde aus XI synthetisiert, indem 3,9 g (8,0 mMol) XI in 30 *ml* trockenem, peroxydfreiem Tetrahydrofuran in Stickstoffatmosphäre und unter Eiskühlung mit 0,9 g (8,0 mMol) frisch sublimiertem Kalium-tert.-butylat versetzt und während 1 Stde. bei Raumtemperatur gerührt wurden. Dann gab man 1,27 g (8 mMol) VI zu und ließ über Nacht nachreagieren. Von ausgefallenem KBr und Triphenylphosphinoxyd wurde abgesaugt, der Rückstand mit Äther gewaschen, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand dreimal mit Petroläther (30—60°) heiß extrahiert. Der Petrolätherextrakt wurde eingeengt, Rückstand: 2,16 g braunes Öl. Der Rohester wurde mit 30 *ml* methanol. KOH-Lösung (50 g/*l*) verseift, Unverseifbares mit Petroläther extrahiert; nach dem Ansäuern der wäßr. methanol. Phase wurde die freie Säure mit Petroläther extrahiert, das Lösungsmittel im Vak. unter N_2 abgedampft. Der Rückstand wurde über eine kurze Kieselsäuresäule gereinigt. Ausb. 980 mg (3,52 mMol) 7.9.12-Octadecatriensäuren, entspr. 46% d. Th. Die spezif. Aktivität betrug $1{,}2 \times 10^5$ Zpm/μMol.

Die gaschromatographische und dünnschichtchromatographische Analyse [letztere erfolgte auf 20% Silbernitrat-Kieselgel-H-Schichten im Lösungsmittelsystem Äther/Petroläther 1:3 (v/v)] zeigte, daß die beiden Isomeren 7*c*- und 7*t*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure in gleicher Menge im Reaktionsprodukt vorlagen.

Eine mit PtO_2 vollständig hydrierte Probe war gaschromatographisch mit Stearinsäure-methylester identisch.

Eine Probe von 15,285/14,29 mg (52,3/48,9 μMol) nahm bei der quantitativen Mikrohydrierung 3,52/3,28 *ml* H_2 auf; theoret. Verbrauch: 3,47/3,38 *ml* H_2.

Der oxydative Ozonidabbau ergab allein Oxal-, Malon- und Pimelinsäure als Dicarbonsäuren; nach der reduktiven Ozonolyse wurde nur das 2.4-Dinitrophenylhydrazon des Hexanals isoliert.

Undecadien-(2*c*.5*c*)-al-(1)-diäthylacetal

Propiolaldehyd-diäthylacetal wurde nach Johnson[24] durch Bromierung von Acrolein, Acetalisierung mit Orthoameisensäureäthylester und Ent-

[23] H. Lindlar, Helv. chim. Acta **35**, 446 [1952].
[24] O. H. Johnson, J. org. Chemistry **23**, 738 [1958].

halogenierung mit Natriumamid in flüssigem Ammoniak dargestellt, Sdp.$_{46}$ = 63—64°, n_D^{23} = 1,4110.

Undecadiin-(2.5)-al-(1)-diäthylacetal: Die Grignard-Verbindung von Propargylaldehyd-diäthylacetal wurde mit Äthylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran dargestellt und mit Octinbromid zu Undecadiin-(2.5)-al-(1)-diäthylacetal analog der früher beschriebenen Darstellung von Undecadiin-(2.5)-ol-(1) kondensiert. Durch frakt. Destillation wurde das Acetal vom Sdp.$_{0,2}$ = 100—105°, n_D^{22} = 1,4597 in 60proz. Ausbeute erhalten.

Undecadien-(2*c*.5*c*)-al-(1)-diäthylacetal: 6 g (25,5 mMol) Undecadiin-2.5-al-(1)-diäthylacetal wurden in 60 *ml* Heptan und 0,1 *ml* frisch dest. Chinolin mit 2 g Lindlar-Katalysator[23] halbhydriert. H_2-Aufnahme: 1140 *ml*, theoret. Aufnahme: 1140 *ml*. Das Diäthylacetal war nach Auswaschen des Chinolins gaschromatographisch einheitlich.

Säure-Hydrolyse des Undecadien-(2*c*.5*c*)-al-(1)-diäthylacetals: 6 g (24,4 mMol) Acetal wurden mit 6 *ml* Wasser und 1 *ml* 2N HCl und so viel Dioxan versetzt, daß die Mischung bei der Siedetemperatur eine Phase bildete. Die Lösung wurde 6 Stdn. unter Rückfluß in einer Stickstoffatmosphäre erhitzt. Nach dem Verdampfen des Dioxans im Vak. wurde der Rückstand in Äther aufgenommen und mit 10proz. $KHCO_3$-Lösung und Wasser neutral gewaschen. Die frakt. Destillation ergab 1,86 g (11,2 mMol) oder 46% d. Th. eines Produktes vom Sdp.$_{1,3}$ = 100°, n_D^{17} = 1,4887. Das IR-Spektrum wies eine starke Bande bei 10,4 μ auf. Die gleiche *cis-trans*-Umlagerung erfolgte auch unter milden Spaltungsbedingungen wie mit Dowex-50, $H^{\oplus}$-Form, 10proz. Oxalsäure oder Eisessig.

Zusammenfassung

Die chemische Synthese von [1-^{14}C]7*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure und 7*t*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure und der Stoffwechsel dieser Säuren in vivo und in vitro werden beschrieben. Die konjugierte Doppelbindung wird von der tierischen Zelle nicht in Homoallylstellung isomerisiert, so daß diese beiden Isomeren als Zwischenprodukte bei der Umwandlung von Linolsäure in 6*c*.9*c*.12*c*-Octadecatriensäure ausscheiden. Die geometrisch isomeren 7.9.12-Octadecatriensäuren werden in vivo sehr schnell abgebaut. Es erfolgt weder ein Einbau in die komplexen Lipoide der Zelle noch findet Kettenverlängerung in die bis-homologe Säure statt.

Summary

The chemical synthesis of [1-^{14}C]octadeca-7*c*,9*c*,12*c*-trienoic and the isomeric octadeca-7*t*,9*c*,12*c*-trienoic acid and investigations on their metabolic transformations were described. The conjugated double bond is not isomerized into the homoallylic position by the animal cell. Therefore both geometrical isomers can be excluded as potential intermediates in the transformation of linoleic to γ-linolenic acid.

The two octadeca-7,9,12-trienoic acids are rapidly combusted. They are not incorporated into complex lipids of the cell. Furthermore no chain elongation into the bis-homologous acid could be achieved under the usual conditions of chain elongation with malonyl-CoA.

Dozent Dr. Dr. Wilhelm Stoffel, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 52.