

44. Das biologische Verhalten von Fettsäuren mit Dreifachbindung:

III. Der Abbau der Taririnsäure

von **Karl Bernhard, Kushal Yekundi** und **Ekkehard Kaempff**

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel

(3. II. 68)

Summary. Octadec-6-ynoic acid (tariric acid) fed to rats as triglyceride is incorporated both into depot fat and liver lipids. As a metabolite the so far undescribed dec-4-ene-6-yndioic acid, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$, was isolated from the urine.

Die Zahl der gegenwärtig bekannten natürlichen Acetylenverbindungen beträgt über 400, darunter befinden sich zahlreiche in natürlichen Ölen vorkommende länger-kettige oder von Mikroorganismen gebildete kurzkettige Acetylenfettsäuren [1]. Die Entstehung dieser Acetylenfettsäuren kann man sich durch Dehydrierung und β -Oxydation der häufig vorkommenden Monoen- oder Polyenfettsäuren vorstellen. Kürzlich zeigten BU'LOCK & SMITH [2] eine Umwandlung von $[10\text{-}^{14}\text{C}]$ -Ölsäure durch *Tricholoma grammopodium* in $[10\text{-}^{14}\text{C}]$ -Octadec-9-en-12-insäure und $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Dec-2-en-4,6,8-triin-1-ol.

Die Stearolsäure oder 9-Octadecinsäure wird, wie wir früher zeigten [3], bei der Ratte sowohl in die Depotlipide als auch in diejenigen der Leber eingebaut. Im Harn wird ein Intermediärprodukt, 5-Decindisäure, ausgeschieden, entstanden durch ω -Oxydation und von beiden Carboxylgruppen ausgehende, je zweimalige β -Oxydation. Um festzustellen, wie sich eine Verschiebung der Dreifachbindung auf den Abbau auswirkt, untersuchten wir das Verhalten der Taririnsäure oder 6-Octadecinsäure $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ bei der Ratte. Auch diese Verbindung, die im Samenöl von *Picramnia*-Arten bis zu 95% der Gesamtfettsäuren vorkommt [4], wird im Depotfett gespeichert, dessen Fettsäuren (vgl. Tabelle 1) im Mittel davon 4,5% aufweisen, auch ist sie in den Neutralfetten der Leber (0,7%) und in deren Phosphatiden (0,72%) nachweisbar (Tabelle 2). Der Harn enthielt in einer Ausbeute von etwa

Tabelle 1. Zusammensetzung der Fettsäuren aus den Depotfetten von Ratten nach Gaben von Taririnsäure als Triglycerid (% Methyl ester)

Versuch	Tier Nr.	Säuren						
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:1
I	1	1,3	24,7	7,1	3,3	38,6	16,3	5,4
	2	1,9	26,9	7,0	3,9	36,4	16,8	3,7
	3	1,5	28,8	8,0	3,2	33,0	17,0	5,7
	4	1,4	28,0	8,1	3,4	36,3	13,6	6,0
	5	1,6	27,3	7,3	3,4	35,6	15,7	6,4
	\bar{x}		1,5	27,1	7,5	3,4	36,0	15,9
Kontrollen	\bar{x}	1,3	27,8	4,8	4,6	38,6	19,5	0

2 Mol-% 4-Decen-6-in-disäure $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$. Ausser einmaliger bzw. von der neugebildeten COOH -Gruppe aus dreimaliger β -Oxydation erfolgt Dehydrierung in α -Stellung bezogen auf die Acetylenbindung. Man hätte erwartet, die Doppelbindung müsste in α - β -Stellung zur Carboxylgruppe bzw. in γ -Stellung zur Dreifachbindung auftreten, indem die β -Oxydation wohl noch zur α - β -ungesättigten Säure, aber nicht mehr weiter führt.

Tabelle 2. Zusammensetzung der Fettsäuren aus den Phosphatiden und Neutralfetten der Leber nach Gaben von Taririnsäure als Triglycerid an Ratten

Lipid	Tier Nr.	Säuren							
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:1	20:4
Phosphatide	1	0,3	33,3	5,2	18,4	17,7	7,9	0,8	12,6
	2	0,5	27,1	2,7	20,4	18,9	9,6	0,5	14,6
	3	0,3	31,1	3,2	18,8	19,0	8,4	1,1	13,0
	4	0,5	29,4	4,0	18,8	21,8	6,8	0,5	12,6
	5	0,3	31,8	3,3	18,6	21,8	7,6	0,8	10,2
	\bar{x}	0,4	30,5	3,7	19,0	19,8	8,1	0,7	12,6
Neutralfette	1	1,6	40,6	13,4	3,1	36,1	3,2	0,6	1,4
	2	2,7	32,5	7,3	4,4	43,6	5,5	1,4	2,6
	3	1,0	31,7	8,3	2,7	50,2	4,2	0,7	1,2
	4	1,1	29,5	8,3	2,4	54,9	2,3	0,5	0,9
	5	1,7	33,4	7,4	2,9	50,9	2,7	0,3	1,7
	\bar{x}	1,6	33,5	8,9	3,1	47,0	3,6	0,7	1,6

Experimentelles. – 1. Die Taririnsäure wurde aus Petroselinensäure (6-Octadecensäure) erhalten durch Bromierung in ätherischer Lösung, gefolgt von Dehydrobromierung durch 4stdg. Erhitzen mit KOH in Isoamylalkohol auf 150°. Nach Abdestillieren des Alkohols wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und die Lösung nach Ansäuern mit Salzsäure mit Äther ausgeschüttelt. Die Säure kristallisierten wir aus Alkohol-Wasser 3:1 bei –15° und anschliessend aus Aceton-Wasser 3:1 bei –15° um. Smp. 39–40°.

Der aus einer Probe dargestellte Methyl ester erwies sich gaschromatographisch und bei der C, H-Bestimmung als rein.



2. *Tierversuche.* Die Säure wurde in das Triglycerid übergeführt (Reinheit gas-chromatographisch kontrolliert), das wir einem normalen Futter beigemischt an Ratten verfütterten. Fünf 380 g schwere Tiere erhielten in 18 Tagen insgesamt 35 g (Versuch I), weitere fünf Tiere (Gewicht ca. 410 g) im Verlaufe von 7 Tagen 22 g (Versuch II). Störungen traten nicht ein. Aus den Lebern, die keinerlei Veränderungen zeigten, extrahierten wir ihre Lipide (im Mittel 4,5% des Frischgewichts) und trennten sie in Neutralfette und Phosphatide (im Mittel 31 und 69%). Aus den durch Verseifung erhaltenen Säuren wurden die Methyl ester hergestellt. Aus den eviscerierten Tierkörpern (Carcass) gewannen wir durch direkte Verseifung die Gesamtfettsäuren. Da die Retentionszeit der Taririnsäure (und auch der Stearolsäure) bei der Gas-Chromatographie an einer Polyäthylenglykol-Bernsteinsäureester-Kolonnen sich kaum von der Retentionszeit der Linolensäure unterscheidet, brachten wir die Methyl ester zuerst auf eine Silicagel-Silbernitrat-Säule [5] zur Trennung der gesättigten Fettsäure-methyl ester von den Monoensäure- und Taririnsäureestern und schliesslich dem Polyensäure-methyl ester.

Isolierung und Identifizierung des Metaboliten 4-Decen-6-in-disäure. Aus 4,7 l Gesamtharn aus Versuch I bekamen wir durch Extraktion bei schwach saurer Reaktion mit Äther 4,5 g braunen Rückstand, den wir mit 30-proz. KOH während 3 Std. verseiften. Nach Ansäuern und Extrahieren

mit Äther führten wir die gewonnenen Säuren unter Verwendung von Bortrifluorid in die Methyl-ester über. Durch Destillation im Kugelrohr erhielten wir bei 85–95°/0,6 Torr eine Fraktion von 1,5 g, die über einer Kolonne mit Silicagel gereinigt wurde. Eine Probe des Methyl-esters wurde verseift. Nach Umkristallisieren aus Benzol schmolz die Säure bei 85–85,5°.

Der gas-chromatographisch reine *Methylester* wurde analytisch und spektroskopisch charakterisiert.



100 mg Methylester, in 5 ml Methanol gelöst und unter Verwendung von PtO_2 hydriert, ergaben Sebacinsäure-dimethylester; bei der Mikrohydrierung in Eisessig mit PtO_2 bei 24° verbrauchten 6,76 mg Methylester 2,07 ml H_2 (ber. 2,02 ml).

Das IR.-Absorptionsspektrum (Fig.1) zeigte bei 2210 cm^{-1} eine durch die C-Schwingungen der Dreifachbindung bedingte Bande, und eine weitere bei 16–17 cm^{-1} , welche den CH-Schwingungen der konjugierten Doppelbindung zuzuordnen ist.

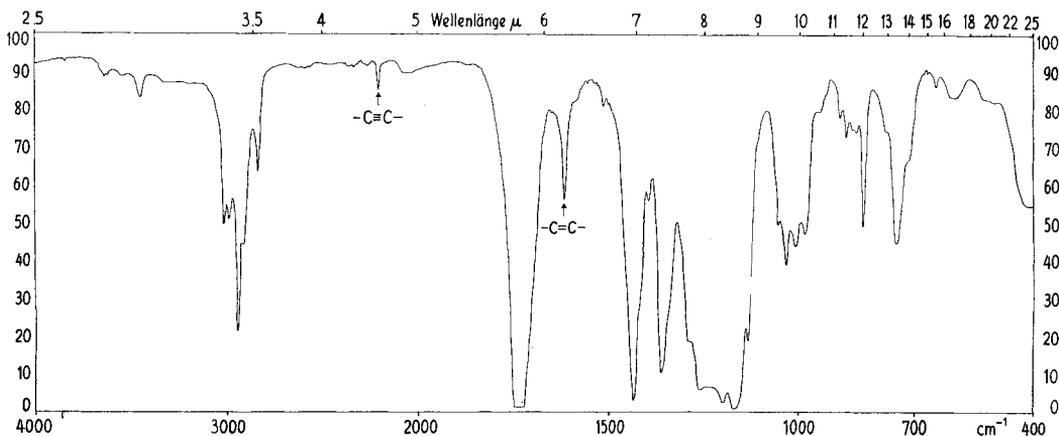


Fig. 1. IR.-Spektrum des Methylesters des Metaboliten

Das Protonen-NMR.-Spektrum (Fig.2) in Deuteriochloroform bei 100 MHz ergab folgende Signale: Im Gebiet von 2,3–2,8 ppm ein Multipllett (8 Protonen; 4 CH_2 -Gruppen); bei 3,665 und 3,688 ppm 2 Singlette (je 3 Protonen; 2 CH_3O -Gruppen); zwischen 5,3 und 5,96 ppm Signale von

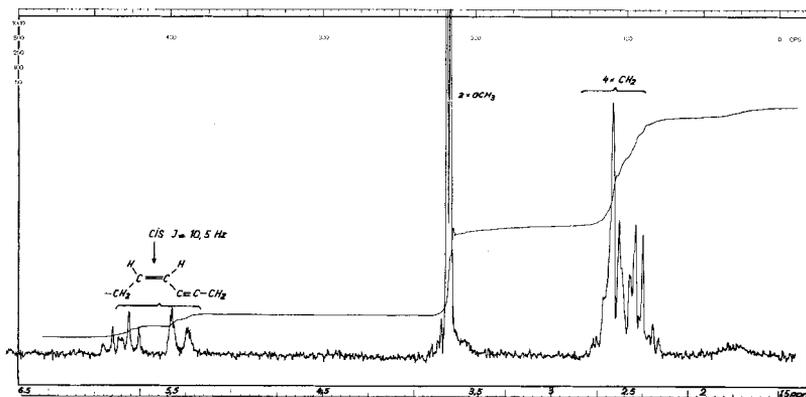


Fig. 2. NMR.-Spektrum des Methylesters des Metaboliten

2 Protonen (2 Vinylprotonen), davon ein Proton als aufgespaltenes Dublett bei 5,44 ppm mit $J = 10,5$ Hz, was einer *cis*-Stellung entspricht, während das zweite durch die benachbarte CH_2 -Gruppe und das andere Vinylproton stark aufgespalten ist.

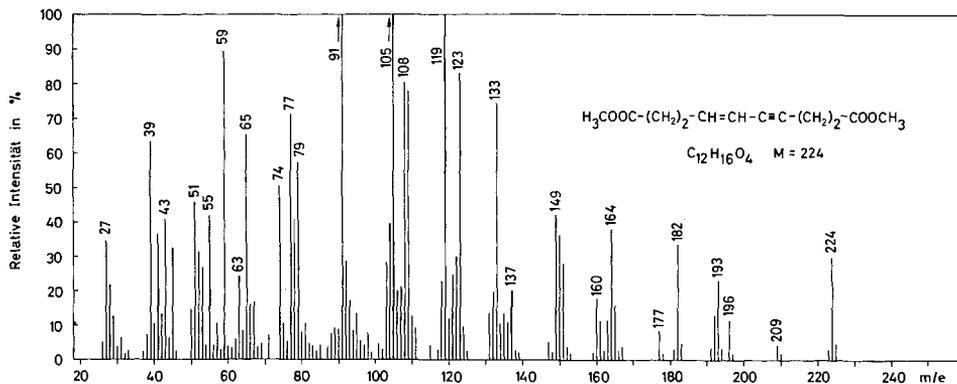


Fig. 3. Massenspektrum des Methylesters des Metaboliten

Im Massenspektrum (Apparat MS9 von AEI, Manchester) (Fig. 3) liegt die höchste Spitze bei m/e 224, was die Strukturformel $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$ bestätigt. Versuchsweise Zuordnungen: 209 = $M - \text{CH}_3$ (15); 196 = $M - \text{CO}$ (28); 193 = $M - \text{OCH}_3$ (31); 165 = $M - \text{COOCH}_3$ (59); 137 = $M - \text{CH}_2\text{COOCH}_3$ (61).

Da der Metabolit aus dem Rohextrakt durch starke Alkalibehandlung erhalten wurde, musste man überlegen, ob die Doppelbindung in Konjugation zur Dreifachbindung nicht dadurch entstanden war. Wir haben daher den Harn von Versuch II schonender aufgearbeitet. Der ätherische Extrakt (1,8 g) wurde auf eine mit 180 g Kieselgel (0,05–0,2 mm) gefüllte Säule von 47 cm Länge und 4,1 cm Durchmesser gebracht. Elution mit 550 ml Äther ergab nach dem Eindampfen 0,88 g gereinigten Extrakt. Wir lösten ihn in 300 ml Äther, versetzten mit der gleichen Menge Petroläther und liessen bei -15° 20 Std. stehen. Es kristallisierten dabei 290 mg Säure aus, die auf Grund der Analysen und der IR.- und NMR.-Spektren mit der 4-Decen-6-in-disäure aus Versuch I identisch war.

Für diese Untersuchungen standen uns Mittel der HANS BUSS-STIFTUNG zur Verfügung.

Die Spektren wurden in den Laboratorien der F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG, Basel, gemessen. Wir sind den Herren Dres. CHOPARD, ENGLERT und VETTER dafür zu Dank verpflichtet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. BOLLMANN, «Biogenetische Beziehungen der natürlichen Acetylenverbindungen» in Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe **25**, 1 (1967).
- [2] J. D. BU'LOCK & G. N. SMITH, J. chem. Soc. **1967**, 332.
- [3] H. WAGNER, G. RITZEL & K. BERNHARD, Helv. **49**, 436 (1966).
- [4] A. STEGER & J. VAN LOON, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **52**, 593 (1933).
- [5] H. WAGNER, J.-D. GOETSCHEL & P. LESCH, Helv. **46**, 2986 (1963).