

## 216. Der Stoffwechsel von Verbindungen mit Dreifachbindung. VII. Verteilung und Abbau der 9-Octadecinsäure bei Ratten, ein Beitrag zur $\alpha$ -Oxydation der C-Kette

von Klaus Reichlmeier<sup>1)</sup>, Peter Graf<sup>2)</sup>, Ekkehard Kaempf<sup>3)</sup> und Karl Bernhard

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel

(12.V.77)

---

### Distribution and Metabolism of Octadec-9-ynoic acid in Rats

#### Summary

Octadec-9-ynoic acid (stearolic acid) fed to rats leads to the metabolic excretion of six dicarboxylic acids with retained triple bond. The main metabolic steps are  $\omega$ -,  $\beta$ -, and presumably  $\alpha$ -oxidation. Feeding of  $^{14}\text{C}$ -stearolic acid proves that the  $\alpha$ -oxidative step involves the methyl end of the original acid. It could further be shown that this acid is incorporated partially in the body lipids. To a substantial degree it is totally oxidized and expired as  $^{14}\text{C}-\text{CO}_2$ .

---

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass nach Verfütterung von Alkensäuren an Ratten Metabolite mit erhaltener Dreifachbindung gebildet werden [1]. Es erscheinen im Harn Alkindicarbonsäuren, jedoch im allgemeinen nur in wenigen Molprozenten in Bezug auf die verabreichte Substanz. Nach Gaben von 9-Octadecinsäure wird 5-Decindisäure ausgeschieden [2].

Da weitere Metabolite vermutet werden konnten, haben wir Ablagerung und Stoffwechsel dieser Verbindung durch Synthese und Applikation von [ $^{14}\text{C}$ ]-9-Octadecinsäure auch in quantitativer Weise untersucht. Da nach den bisherigen Ergebnissen eine partielle enzymatische Hydrierung der Dreifachbindung, die zur Bildung von Ölsäure aus 9-Octadecinsäure führen müsste, nicht unmöglich schien, haben wir die Verteilung der Radioaktivität vor allem auch in den Leberlipiden untersucht.

Verabreichung von 250 mg [ $^{14}\text{C}$ ]-9-Octadecinsäure-methylester (Dosis 1,0 g/kg) mit der Schlundsonde ergab für die Aktivität nach acht Stunden das aus *Tabelle 1* ersichtliche Verteilungsmuster.

1) Medizinische Grundlagenforschung *Sandoz AG*, 4002 Basel.

2) University of Connecticut, Health Center, Department of Physiology, Farmington, Conn. 06032, USA.

3) *Max Planck*-Institut für Physiologische und Klinische Forschung, *W. G. Kerckhoff*-Institut, D-6350 Bad Nauheim.

Tabelle 1. *Aktivitätsverteilung 8 Std. nach Applikation von [<sup>14</sup>C]-9-Octadecinsäure-methylester an zwei Ratten in % der verabreichten Dosis*

	Tier 1 % Aktivität	Tier 2 % Aktivität
Atmungs-CO <sub>2</sub>	10,5	6,5
Harn	9,6	7,3
Faeces	4,3	6,6
Leber	3,8	2,8
Nieren	0,19	0,12
Blut	0,23	0,24
Depotfett	0,16	0,21
Carcass	10,3	9,6
Gastrointestinaltrakt	58,1	62,5
Total	97,18	95,87

Beim Achtstundenversuch lagen über 60% der Aktivität in den Leberfettsäuren als 9-Octadecinsäure vor. Ein relativ grosser Anteil wird indessen in der Leber abgebaut und über den Acetatpool zur *de-novo*-Synthese kürzerkettiger Fettsäuren verwendet, was aus der deutlichen Aktivität der Myristin-, Palmitin- und Palmitoleinsäure hervorgeht, wie durch kombinierte gas-chromatographische und radiochemische Untersuchung festgestellt wurde.

Die sehr geringe Aktivität der Ölsäure lässt eine Biohydrierung als unwahrscheinlich erscheinen. Als eine Möglichkeit zur Aufhebung der Dreifachbindung kommt eine enzymatische Acetylen-Allen-Isomerisierung in Frage [3].

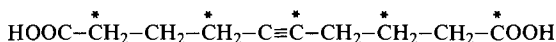
In einem Versuch über 168 Stunden verteilte sich die applizierte Aktivität nach einmaliger Verabreichung zu 33% auf das Expirationskohlendioxid, zu 26% auf den Harn und zu 42% auf die Faeces. Daraus ist zu schliessen, dass die eingebaute Aktivität wieder völlig abgebaut und ausgeschieden worden ist. Die Hauptmenge an <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in der Atemluft sowie der Harnaktivität wurde innerhalb der ersten 30 Stunden beobachtet, mit einem Maximum zwischen sechs und zehn Stunden.

Harnaktivität und gas-chromatographische Analysendaten ergaben deutliche Hinweise auf das Vorhandensein mehrerer Metabolite neben der bereits bekannten 5-Decidinsäure. Im Langzeitversuch verfütterte inaktive 9-Octadecinsäure (150 g) sowie deren Methylester (14 g) erbrachten die für die Aufklärung der Metabolite erforderliche Menge Material. Der präparativ-gaschromatographisch aufgetrennte Harnextrakt liess sechs Metabolite erkennen (Tabelle 2). Deren Menge war nach Gaben des Methylesters erheblich grösser als nach Verabreichung der freien Säure.

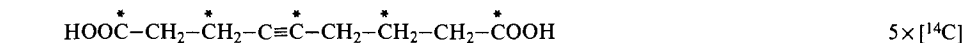
Für die Metabolite II, IV und VI mit gerader C-Zahl (Tabelle 2) kommen  $\omega$ - und  $\beta$ -Oxydation als Abbauege in Frage. Die Entstehung der ungeradzahigen Metabolite I, III und V können wir uns nur durch die Annahme eines zusätzlichen  $\alpha$ -oxydativen Abbaus erklären. Die durch die Biogenese aus [1-<sup>14</sup>C]-Acetat bedingte alternierende Markierung der C-Kette in der 9-Octadecinsäure erlaubt, diesbezügliche Rückschlüsse zu ziehen.

Die spezifische Aktivität der 4-Nonindisäure, des kürzestkettigen Metabolits mit ungerader C-Zahl, wird mit derjenigen der 5-Decindisäure verglichen, die fünf markierte C-Atome enthält. Findet die zur Bildung der 4-Nonindisäure notwendige  $\alpha$ -Oxydation am unmarkierten Methylende statt, so erhalten wir eine Säure mit fünf markierten C-Atomen und damit erhöhter spezifischer Aktivität gegenüber der 5-Decindisäure. Unter der Annahme, dass der  $\alpha$ -oxydative Schritt aber am markierten Carboxylende eintritt, müsste eine 4-Nonindisäure mit nur vier  $^{14}\text{C}$ -Atomen, und damit erniedrigter spezifischer Aktivität, entstehen. Die gleichen Überlegungen gelten für die beiden anderen ungeradzahligigen Metabolite.

5-Decindisäure    5  $^{14}\text{C}$ -markierte Atome



4-Nonindisäure



oder



Tabelle 2. Metabolite der 9-Octadecinsäure und ihres Methylesters

Metabolit	Ausbeute in mol-%	
	9-Octadecinsäure	Methylester
I 4-Nonindisäure	0,24	0,85
II 5-Decindisäure	10,8	31,6
III 5-Decindisäure	Spuren	Spuren
IV 5-Dodecindisäure	0,24	0,57
V 5-Tridecindisäure	0,08	0,19
VI 5-Tetradecindisäure	0,05	0,13

Tabelle 3. Relative spezifische Aktivität der  $^{14}\text{C}$ -Metabolite der [ $^{14}\text{C}$ ]-9-Octadecinsäure im Vergleich zur 5-Decindisäure

Metabolit <sup>a)</sup>	Spezifische Aktivität (cpm/mol in %)		
	gefunden	berechnet	
geradzahlig			
II 5-Decindisäure <sup>b)</sup>	100	100	
IV 5-Dodecindisäure	119	120	
ungeradzahlig		bei vermuteter $\alpha$ -Oxydation am Methylende                      Carboxylende	
I 4-Nonindisäure	104	100	80
V 5-Tridecindisäure	137	140	120

a) Die Aktivität der gereinigten Metabolite wurde durch Liquid-Scintillation-Counting bestimmt und die spezifische Aktivität (cpm/mol Disäure) berechnet. Die Aktivitäten der Metabolite III und VI konnten infolge zu geringer Menge nicht bestimmt werden.

b) Standard, spezifische Aktivität (cpm/mol) = 100% gesetzt.

Die spezifische Aktivität der 5-Decindisäure wurde gleich 100 gesetzt, daraus wurden die spezifischen Aktivitäten der anderen Metabolite berechnet.

Die Ergebnisse (s. *Tabelle 3*), im Vergleich mit den experimentell bestimmten Werten, sprechen für die Abspaltung eines  $C_1$ -Bruchstückes vom Methylen der 9-Octadecinsäure her. Dieser Befund wird unterstützt durch die Resultate verschiedener Autoren [4], [5], die eine  $(\omega - 1)$ -Hydroxylierung langkettiger Fettsäuren [4] sowie eine anschliessende Oxydation zur  $(\omega - 1)$ -Ketoverbindung [5] beobachtet haben. Eine  $\alpha$ -Oxydation vom Methylen her unter Abspaltung einer  $C_1$ -Einheit ist aber bisher noch nicht beschrieben worden.

### Experimenteller Teil [6]

**Synthesen.** - *9-Octadecinsäure*: Aus Ölsäure dargestellt durch Bromierung und anschliessende Dehydrobromierung [7]. Smp. 47-47,5° (Lit. [7]: Smp. 47-47,5°).

*$^{14}C$ -9-Octadecinsäure*: Aus  $Ba^{14}CO_3$  wurde 1- $^{14}C$ -Essigsäure [8] synthetisiert. 1- $^{14}C$ -Natriumacetat, zur Nährlösung beigefügt, diente dem Schimmelpilz *Phycomyces blakesleeana* zur Biosynthese  $^{14}C$ -markierter Fettsäuren [9], die nach Extraktion und Verseifung einen Gehalt von 32% Ölsäure aufwiesen. Kristallisation aus Aceton bei -30° zur Abtrennung gesättigter Fettsäuren sowie anschliessende *Craig*-Verteilung der Methylester der vorwiegend ungesättigte Fettsäuren enthaltenden Mutterlauge (120 Stufen, Unterphase Acetonitril, Oberphase Hexan) [10] ergab  $^{14}C$ -Ölsäure-methylester von 89% Reinheit. Dieser wurde in  $^{14}C$ -9-Octadecinsäure überführt [7]. Verteilungschromatographie ihres Methylesters auf einer Säule aus Chromosorb G, 60-80 mesh, im System Hexan (stationäre Phase) - Acetonitril-Methanol (mobile Phase) [11] führte zu gas-chromatographisch reinem  $^{14}C$ -9-Octadecinsäure-methylester.

**Stoffwechselversuche**: Die Stoffwechselversuche erfolgten mit *Whistar*-Ratten eines über 40 Jahre alten Inzuchtstammes. Die Fütterungsversuche sowie die Aufarbeitung der Harnen wurden wie früher beschrieben [1] durchgeführt. Bei der Verabreichung radioaktiv markierter Substanz befanden sich die Tiere in Stoffwechsellkäfigen, die die Messung des Expirationskohlendioxids sowie das Sammeln von Urin und Faeces erlaubten. Die  $^{14}C$ -Messungen erfolgten in einem *Packard-TriCarb*-Modell 3320. Resorption sowie Einbau in Organe, Körperflüssigkeiten und Depotfett wurden kontrolliert. Präparativ-gas-chromatographische Auftrennung der Metabolite-Gemische wurden mit dem *Varian-Aerograph* Modell 712 ausgeführt. Die Struktur der Metabolite wurde durch Hydrierung, oxydative Spaltung, gas-chromatographische Analyse der Produkte sowie C, H-Analyse bestimmt.

Analytisch-gas-chromatographische Untersuchungen wurden mit einem *Perkin-Elmer*-Modell 800 ausgeführt, das gleichzeitig die Aktivitätsbestimmung einzelner Pike nach katalytischer Verbrennung erlaubte (Splitting-Verhältnis des austretenden Gasstromes 1:20).

**Verabreichung von  $^{14}C$ -9-Octadecinsäure**: In mehreren Experimenten wurde der Methylester der  $^{14}C$ -9-Octadecinsäure mit der Schlundsonde an Ratten verabreicht und die Tiere (je zwei pro Versuch) nach 2, 4, 8 sowie 168 Std. getötet. Zeitliche Abgabe und Menge des expirierten  $^{14}CO_2$  wurden bestimmt, und die Aktivität in Urin, Faeces, Blut sowie Organen und Depotfett nach Verbrennung gemessen. Die Aktivität der Dimethylester der Metabolite wurde nach präparativ-gas-chromatographischer Trennung bestimmt.

*9-Octadecinsäure*: Insgesamt 150 g 9-Octadecinsäure wurden an zehn Ratten in 40 Tagen verfüttert (Dosis 1,39 g/kg/Tag).

#### Metabolite.

I: 4-Nonindisäure, Smp. 111-112,5° (Lit. [12]: Smp. 111-112,5°).

$C_9H_{12}O_4$  (184,19) Ber. C 58,69 H 6,57%  $H_2/mol^4$ ) 2 Gef. C 58,93 H 6,56%  $H_2/mol$  1,99

II: 5-Decindisäure, Smp. 109-110,5° (Lit. [2]: Smp. 109-110°).

$C_{10}H_{14}O_4$  (198,21) Ber. C 60,59 H 7,12%  $H_2/mol^4$ ) 2 Gef. C 60,54 H 7,12%  $H_2/mol$  2,06

III: 5-Undecindisäure,  $C_{11}H_{16}O_4$  (212,24). Hydrierung ergab Undecandisäure. Oxydative Spaltung führte zu Glutarsäure und Adipinsäure. Die Produkte wurden als Methylester gas-chromatographisch nachgewiesen.

IV: 5-Dodecindisäure, Smp.  $87,5^\circ$  (Lit. [13]: Smp.  $89^\circ$ ).

$C_{12}H_{18}O_4$  (226,26) Ber. C 63,70 H 8,02%  $H_2/mol^4$ ) 2 Gef. C 63,82 H 8,12%  $H_2/mol$  2,02

V: 5-Tridecindisäure, Smp.  $77-78,5^\circ$ .

$C_{13}H_{20}O_4$  (240,29) Ber. C 64,98 H 8,39% Gef. C 65,21 H 8,40%

VI: 5-Tetradecindisäure, Smp.  $88,5-90,5^\circ$ .

$C_{14}H_{22}O_4$  (254,30)

Hydrierung ergab Tetradecandisäure, oxydative Spaltung Glutarsäure und Azelainsäure. Die Säuren wurden als Methylester gas-chromatographisch nachgewiesen.

9-Octadecinsäure-methylester: Dosis 0,8 g/kg/Tag; es traten die gleichen Metabolite auf wie bei der 9-Octadecinsäure. Der Hauptmetabolit 5-Decindisäure wurde zu 31,6 mol-% gefunden, auch die andern Metabolite waren erhöht.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. Bernhard & E. Kaempf, *Helv.* 53, 1833 (1970).
- [2] H. Wagner, G. Ritzel & K. Bernhard, *Helv.* 49, 436 (1966).
- [3] F. M. Miesowicz & K. E. Bloch, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 65, 331 (1975).
- [4] B. Preiss & K. Bloch, *J. biol. Chemistry* 239, 85 (1964).
- [5] H. Den, *Biochim. biophys. Acta* 98, 462 (1965); *I. Björkhem, ibid.* 260, 178 (1972).
- [6] K. Reichlmeier, Dissertation Basel 1972.
- [7] R. O. Butterfield & H. J. Dutton, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* 45, 635 (1968).
- [8] W. Lamprecht & H. Rehberg, *Z. physiol. Chem.* 301, 46 (1955).
- [9] K. Bernhard, L. Abisch & H. Wagner, *Helv.* 41, 850 (1958).
- [10] C. R. Scholfield, J. Nowakowska & H. J. Dutton, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* 37, 27 (1960).
- [11] O. S. Privett, R. P. Weber & E. C. Nickell, *J. Amer. Oil Chemist's Soc.* 36, 443 (1959).
- [12] E. Kaempf, Dissertation Basel 1972.
- [13] I. Marszak & J. P. Guermoni, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* 242, 141 (1956).

4) Wasserstoffaufnahme bei der katalytischen Microhydrierung.