

66. Über die Biosynthese von γ -Dodecanolacton in reifenden Früchten: Aroma-Komponenten der Erdbeere (*Fragaria ananassa*) und des Pfirsichs (*Prunus persica*)

von Michael Schöttler und Wilhelm Boland*

Institut für Organische Chemie und Biochemie, Gerhard-Domagk-Str. 1, D-53121 Bonn

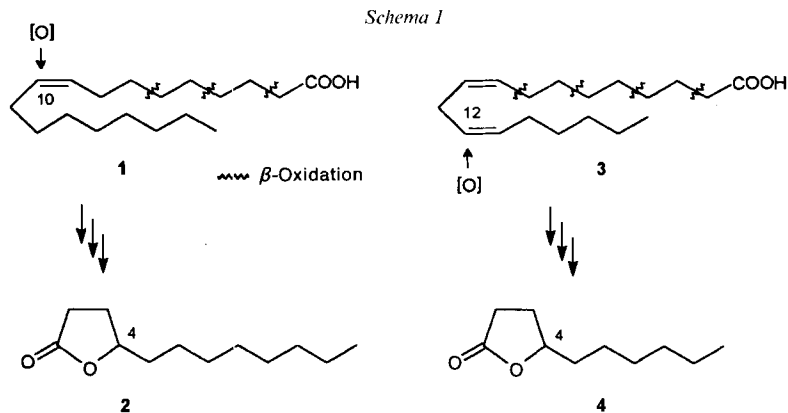
(7.XI.94)

On the Biosynthesis of γ -Dodecanolactone in Ripening Fruits: Flavor Constituents from Strawberries (*Fragaria ananassa*) and Peaches (*Prunus persica*)

Administration of deuterium-labelled 9,10-epoxy[8,8-²H₂]heptadecanoic acid **8a/b** and 9,10-dihydroxy-[8,8-²H₂]methylheptadecanoate **9** as lower analogues of oleic acid **1** to ripening fruits of strawberries (*Fragaria ananassa*) and peaches (*Prunus persica*) results in the emission of labelled γ -undecanolactone (**5**) as the lower analog of γ -dodecanolactone (**2**). The transformation proceeds with loss of a single D-atom from C(8) of the precursors. Early precursors, like the C₁₇-epoxy-acids **8a/b** yield (4*R*)- γ -undecanolactone (**5**) of high enantiomeric purity, while later intermediates results in (4*R*)- γ -undecanolactone (**5**) of low purity. The data support a biosynthetic sequence involving the consecutive action of an epoxide hydrolase and β -oxidation to generate the correct chain length of the lactone precursor. The final steps proceed *via* cyclization of the 3,4-dihydroxyundecanoic acid **13** to the 3-hydroxy- γ -undecanolactone **14**. Elimination of H₂O and reduction of the intermediate γ -undec-2-enolactone **15** terminate the biosynthesis of **5**. The sequence is representative for the biosynthesis of naturally occurring γ -dodecanolactone (**2**).

Einführung. – γ - und δ -Lactone sind häufige Duft-Komponenten reifender Früchte. Sie prägen wesentlich das Aroma von Aprikose (*Prunus armenica*), Pfirsich (*Prunus persica*), Nektarine (*Prunus persica* var. *nucipersica*), Mirabelle (*Prunus domestica* ssp. *syrica*) oder der Erdbeere (*Fragaria ananassa*) [1]. Auch der Duft des Jasmins (z. B. *Jasminum grandiflorum*) und einiger Orchideen (etwa *Dendrobium unicum*) erhält seine Note unter anderem von chiralen γ - und δ -Lactonen [2] [3]. Insekten nutzen eine Mischung von γ - und δ -Lactonen, bevorzugt das γ -Dodecanolacton (**2**), zusammen mit terminalen Alkenen als 'Biosolvens' zur Bildung ihres Wehrsekrets [4]. Ungeachtet dieser weiten Verbreitung von Lactonen ist ihre Biosynthese aber nur unvollständig bekannt. Neuere Arbeiten an Hefen (*Sporobolomyces odorus*) [5] [6] und anderen Mikroorganismen wie z. B. *Cladosporium suaveolens* [7] [8] und *Candida lipolytica* [9] diskutieren unterschiedliche Routen. An dem filamentösen Pilz *C. suaveolens* wurde zum Beispiel gezeigt, dass dieser Organismus die Linolsäure (**3**) *via* Ricinolsäure zu (*R*)- γ -Decanolacton (**4**) abbaut, während Zellen der Hefe *S. odorus* eine extern zugeführte C₁₀-Vorstufe (*trans*-3,4-Epoxydecansäure) zu **4** umsetzen können [5] [6] (*Schema 1*).

Als typische *O*-Funktionalisierungen von Fettsäuren gelten: *i*) Hydratisierung von (C=C)-Bindungen (z. B. bei Hefen Linolsäure (**3**)→Ricinolsäure), *ii*) Einführung und Reduktion von Hydroperoxiden (z. B. Linolsäure (**3**)→(13*S*)-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure; LOX-Route) und schliesslich *iii*) die direkte Hydroxylierung von nichtaktivierten CH₂-Gruppe (Ölsäure→Ricinolsäure [10]). Ausgehend von den pflanzentypischen



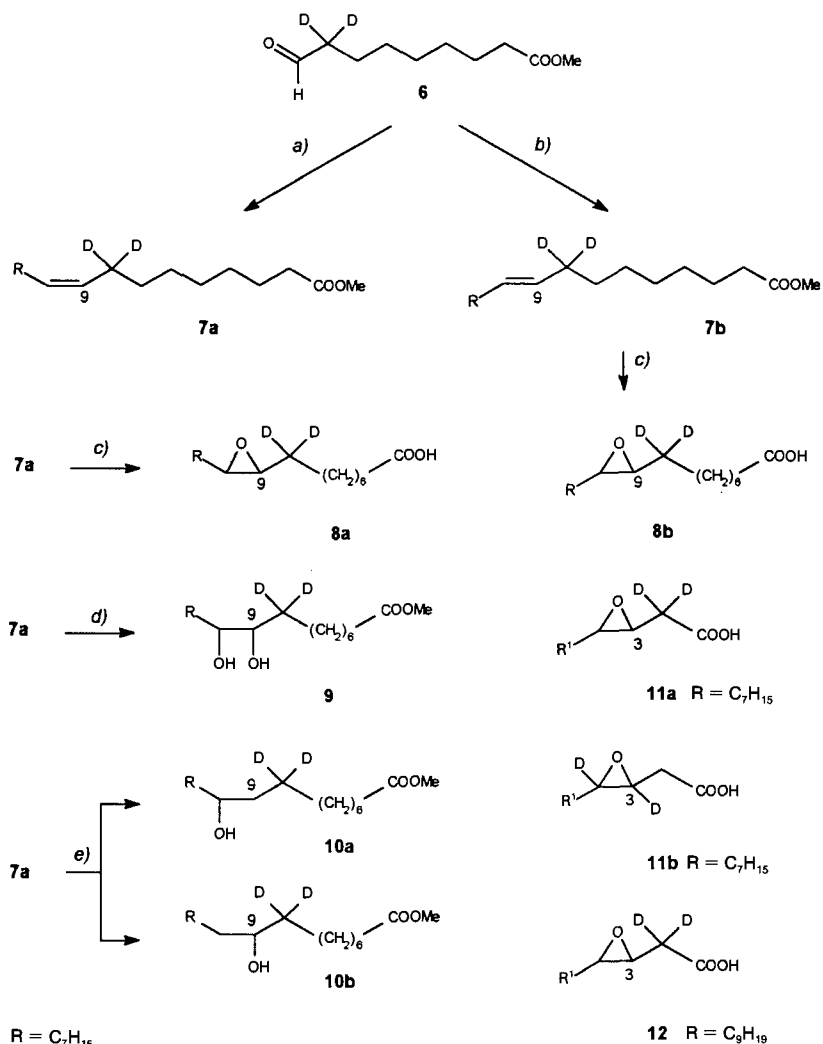
schen C_{18} -Fettsäuren sind die direkte Insertion von Sauerstoff in nichtaktivierte Positionen (zum Beispiel *via* Ricinolsäure) und die Lipid-Peroxydation (*via* 13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-diensäure) für die Aromagenese der besonders häufigen γ - und δ -Decanolactone mechanistisch plausibel und zum Teil bereits nachgewiesen [7].

Für die Biosynthese des γ -Dodecanolactons (**2**) scheidet der zumeist postulierte LOX-Weg aus, da Lipoxygenasen nur bis-olefinisch flankierte CH_2 -Gruppen attackieren. Aber auch bei der Biogenese des δ -Decanolactons ist die Beteiligung einer Lipoxygenase keinesfalls gesichert, da die Konfiguration des natürlichen (*5R*)- δ -Decanolactons nicht mit der Konfiguration der als Intermediat zu erwartenden (*13S*)-Hydroperoxyoctadeca-9,11-diensäure übereinstimmt [5]. Anstelle von Hydratisierung, O-Insertion oder Lipid-Peroxydierung ist aber grundsätzlich auch eine enzymatische Epoxidierung der isolierten (C=C)-Bindungen von Ölsäure (**1**) oder Linolsäure (**3**) denkbar, denn durch nachfolgende Reduktion einer der beiden (C–O)-Bindungen der Oxirane liesse sich zumindest formal die Bildung der jeweils erforderlichen Monohydroxyfettsäure rationalisieren. Dieser Weg wurde bisher nicht ernsthaft diskutiert, da eine direkte enzymatische Reduktion von Epoxiden zu Monohydroxy-Verbindungen unbekannt ist.

Im Rahmen dieser Studie wird nun erstmals gezeigt, dass in reifenden Früchten tatsächlich die bislang unberücksichtigten Epoxide der C_{18} -Fettsäuren als Vorstufen für die Lacton-Biosynthese dienen können. Durch Verwendung isotopenmarkierter Vorstufen und Kontrolle der Enantiomerenzusammensetzung ihrer jeweiligen Metaboliten (*Tab.*) wird die Beteiligung von Epoxygenasen und Epoxid-Hydrolasen an der Aromagenese von γ -Dodecanolacton in reifenden Früchten sehr wahrscheinlich gemacht.

2. Synthese von deuterierten Stoffwechselfonden. – Entsprechend *Schema 1* erfordert die Biosynthese des γ -Dodecanolactons (**2**) eine an C(10) O-funktionalisierte Stearinsäure. Um die Metaboliten dieser und anderer Vorstufen ohne Überlagerung durch Naturprodukte analysieren zu können, wurden anstelle der natürlichen C_{18} -Fettsäuren ihre niederen C_{17} -Analoge synthetisiert. Da die Lage der (C=C)-Bindung analog zur Ölsäure in allen Fällen als C(9)=C(10) beibehalten ist, sollten diese Vorstufen anstelle des natürlichen γ -Dodecanolactons (**2**) stets das γ -Undecanolacton (**5**) liefern. Zur sicheren Identifizierung der Metaboliten wurden alle Vorstufen zusätzlich mit Deuterium mar-

Schema 2



a) $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}=\text{PPh}_3$, b) Cf. [12]. c) 3-Chloroperbenzoesäure; 3N NaOH/MeOH. d) OsO_4 . e) $\text{BH}_3\text{-SMe}_2$; H_2O , 3M NaOH, CH_2Cl_2 , EtOH, H_2O_2 .

kiert. Nach *Schema 2* gelingt dies besonders einfach an dem zentralen Baustein **6** [11] durch einen selektiven Isotopenaustausch der aciden α -Protonen unter Verwendung von *Hünig*-Base. Aufgrund ihrer höheren Acidität werden nur die Protonen neben der Aldehyd-Gruppe ausgetauscht. Eine *Wittig*-Reaktion von **6** mit Octylden(triphenyl)phosphoran liefert den (*Z*)- C_{17} -Ester **7a**. Aus **7a** können durch Funktionalisierung der ($\text{C}=\text{C}$)-Bindung die deuterierte (*Z*)-9,10-Epoxyheptadecansäure (**8a**), der 9,10-Dihydroxyheptadecansäure-methylester (**9**) sowie durch Hydroborierung ein Gemisch von 9- und 10-Hydroxyheptadecansäure-methylester (**10a/10b**) erhalten werden.

Zum (*E*)-Ester **7b** gelangt man durch eine Cr^{II} vermittelte reduktive Olefinierung von **6** mit 1-Acetoxy-1-bromooctan [12]. Dabei ist ein teilweiser Verlust der Isotopenmarkierung nicht zu vermeiden. Die kürzerkettigen (*E*)-3,4-Epoxy[2,2-²H₂]undecansäure (**11a**), (*E*)-3,4-Epoxy[3,4-²H₂]undecansäure (**11b**) und (*E*)-3,4-Epoxy[2,2-²H₂]tridecansäure (**12**) erhält man aus den entsprechenden ungesättigten Vorstufen [6] [13] durch Epoxidierung mit 3-Chloroperbenzoesäure.

3. Einbau-Experimente an reifenden Früchten. – Die z. T. unlöslichen Fettsäure-Vorstufen **7a/b** bis **12** werden durch Ultraschallbehandlung (*ca.* 1 mg ml⁻¹ H₂O) in stabile Emulsionen bzw. Suspensionen übergeführt. Für alle Inkubationen wurden reife Erdbeeren der Sorte *Elsanta* (Ursprungsland: Niederlande) und Pfirsiche (Sorte: *Jaunes*, Varietät: *Merry*, Frankreich) aus derselben Charge eingesetzt. 2–3 Früchten wurde etwa 1 ml der Fettsäure-Emulsion bzw. -suspension gleichmässig verteilt unter die Epidermis gespritzt. Anschliessend wurden die entstehenden Aroma-Komponenten in einem geschlossenen System [14] [15] über 24 h an einem Kohle-Filter (1,5 mg) angereichert. Nach Desorption der Duftstoffe mit CH₂Cl₂ (2 × 15 µl) können die Extrakte mittels GLC/MS direkt analysiert werden. Die Enantiomerenzusammensetzung der jeweils emittierten Lactone wurde durch GLC an Kapillarsäulen mit Oktakis(2,6-di-*O*-pentyl-3-*O*-butyryl)- γ -cyclodextrin (*Lipodex E*[®]) als chiraler stationärer Phase bestimmt [16]. Bei den Inkubationsexperimenten wurden die *O*-funktionalisierten Fettsäuren oder Ester **8a/b** bis **11a/b** (*Schema 2*) erwartungsgemäss zum γ -Undecanolacton (**5**) metabolisiert. *Fig. 1* illustriert, dass **5**, wie erwartet, frei von Überlagerung durch andere Naturstoffe analysiert werden kann. Bei einzelnen Experimenten wird das artifizielle γ -Undecanolacton (**5**) sogar als Hauptprodukt an die Gas-Phase abgegeben. Anstelle der freien Säuren können auch in allen Fällen ihre Methylester erfolgreich eingesetzt werden; offensichtlich sind endogene pflanzliche Esterasen vorhanden und hinreichend aktiv. Wie schon bei früheren Arbeiten

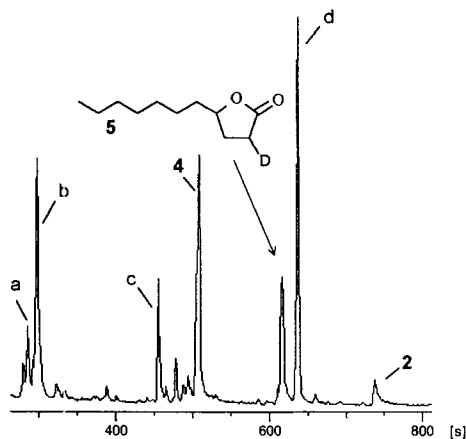


Fig. 1. GC-Profil der Aroma-Komponenten der Erdbeere (*Fragaria ananassa*). Vorstufe: Epoxysäure **8a**. Das Duftspektrum ist repräsentativ für alle übrigen Inkubationsexperimente an der Erdbeere. Trennbedingungen: Kapillarsäule SE 30 (10 m × 0,32 mm) von 80° (2 min isotherm) mit 10°/min bis 130° und mit 5°/min bis 180°. Probenmenge: 1 µl. Detektion: Ion Tap ITD 800. Identifizierung der Aroma-Komponenten: a: Ethyl-octanoat, b: Octyl-acetat, c: Hexyl-hexanoat, γ -Decanolacton (**4**), [2-²H]- γ -Undecanolacton ([2-²H]-**5**), d: Nerolidol, γ -Dodecanolacton (**2**).

an anderen Organismen [6] [7], wird aber auch bei der reifenden Erdbeere keine Funktionalisierung und damit Einbau von freier, deuterierter (9*Z*)- bzw. (9*E*)-Heptadec-9-ensäure bzw. ihren Estern **7a/b** in das γ -Undecanolacton (**5**) gefunden.

Gemäss ihrem Molekül-Ion und dem Hauptfragment bei m/z 86 werden die funktionalisierten C_{17} -Fettsäuren **8a/b** und **9** unter Verlust eines D-Atoms von C(8) der Vorstufe zu $[2\text{-}^2\text{H}]\text{-}\gamma\text{-Undecanolacton}$ ($[2\text{-}^2\text{H}]\text{-5}$) metabolisiert (Fig. 2, A). Dieser Isotopenverlust ist nicht auf die Abbausequenz (β -Oxidation) zurückzuführen, da die *trans*-3,4-Epoxy-[2,2- $^2\text{H}_2$]undecansäure (**11a**), die ohne Kettenverkürzung in **5** übergeführt werden kann, ebenfalls nur unter Verlust eines D-Atoms von C(2) der Vorstufe zu $[2\text{-}^2\text{H}]\text{-}\gamma\text{-Undecanolacton}$ ($[2\text{-}^2\text{H}]\text{-5}$) cyclisiert. Dagegen bleiben die beiden D-Atome an C(3) und C(4) der *trans*-3,4-Epoxy[3,4- $^2\text{H}_2$]undecansäure (**11b**) in **5** erhalten (Hauptfragment bei m/z 87) [13].

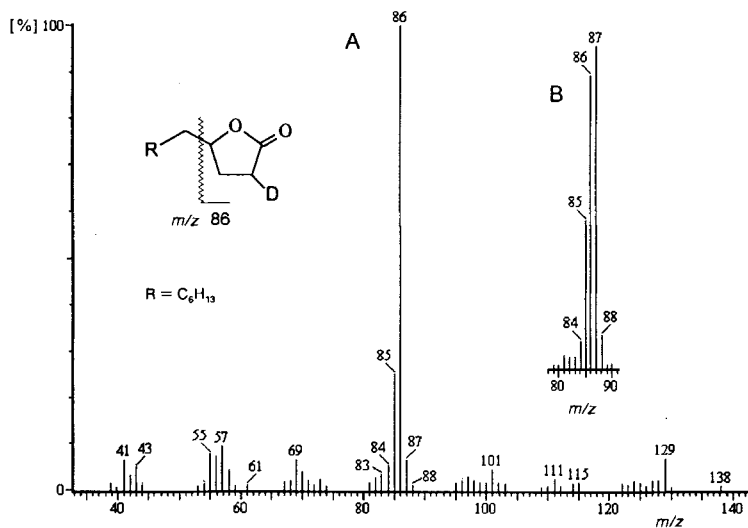


Fig. 2. Massenspektrum (70 eV) des $[2\text{-}^2\text{H}_2]\text{-}\gamma\text{-Undecanolactons}$ ($[2\text{-}^2\text{H}]\text{-5}$) aus dem Aroma der Erdbeere. A) $[2\text{-}^2\text{H}]\text{-5}$ nach Injektion von **8a/b**, **9** oder **11a** im Massenbereich von 135–140 Da. Das Molekül-Ion bei m/z 185 ist nur sehr schwach ausgeprägt. B) Ausschnitt aus dem Massenspektrum von **5** erhalten nach Applikation des Gemisches der 9- und 10-Hydroxyester **10a** und **10b**. Bedingungen: Fisons MD 800, Trennbedingungen: Kapillarsäule DB-1 (15 m \times 0,25 mm) von 50° (2 min isotherm) mit 15°/min bis 280°. Probenmenge: 1 μ l. Scanbereich: 35–250 Da/s.

Wird das Gemisch von 9- und 10-Hydroxyheptadecansäure-methylester (**10a/10b**) injiziert, ist der Markierungsgrad des entstehenden γ -Undecanolactons (**5**) uneinheitlich. Molekül-Ion und Hauptfragment zeigen vollständigen Erhalt (m/z 87, 100% rel. Int.), teilweisen (m/z 86, 90% rel. Int.) und vollständigen Verlust (m/z 85, 50% rel. Int.) der D-Markierung (vgl. Fig. 2, B). Ein δ -Tridecalacton, das aus dem im Gemisch vorhandenen 9-Hydroxyheptadecansäure-methylester (**10b**) nach nur zwei β -Oxidationscyclen entstehen könnte, wird nicht gefunden.

Alle vorgenannten Befunde lassen sich durch Injektion der Vorstufen **8a/8b** bis **12** in reife Mirabellen, Nektarinen und Pfirsiche reproduzieren. Dabei wird auch hier in allen Fällen der Verlust eines D-Atoms von C(8) bzw. C(2) der Vorstufen **8a/b**, **9a**, **11a** und **12** beobachtet.

Weitere Information zur Abfolge der Reaktionsschritte auf dem Wege von **8a** zu **5** erhält man durch Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung (%) von **5** durch GLC an *Lipodex E*[®] [16]. Im Aroma der Erdbeere ist (4*R*)- γ -Dodecanolacton **2** als Nebenprodukt (ca. 6%) und (4*R*)- γ -Decanolacton (**4**) als Hauptprodukt (ca. 94%) enthalten; beide $\geq 98\%$ (4*R*) (vgl. *Fig. 1* und *Tab.*). (4*R*)- γ -Decanolacton des Pfirsicharomas ist nur mässig rein ((4*R*)/(4*S*) 82:18). Ein vergleichbarer Befund liegt auch für die Mirabelle vor. Bei Mirabelle und Pfirsich ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen der Enantiomerenzusammensetzung des neu gebildeten (4*R*)- γ -Undecanolactons (**5**; aus *trans*-3,4-Epoxyundecansäure (**11b**)) und der optischen Reinheit des genuinen γ -Decanolactons (**4**; vgl. auch *Tab.*). Aufgrund der hohen Einbauraten aller *O*-funktionalisierten Fettsäure-Vorstufen bei Erdbeere oder Pfirsich kann im Aroma dieser Früchte auch die Enantiomerenzusammensetzung des (4*R*)- γ -Undecanolactons **5** nach Injektion der langkettigen Fettsäure-Vorstufen **8a/b** bis **10a** sicher bestimmt werden (*Tab.*). Dem-

Tabelle. Enantiomerenzusammensetzung der γ -Undecanolactone (**5**) im Duft von Erdbeere und Pfirsich nach Applikation der Vorstufen **8a/b** bis **12**. Angegeben sind die relativen Peak-Flächen [%] von (*R*)- und (*S*)-**5** ((4*R*)-**5** + (4*S*)-**5** = 100%). Aufgrund der sehr niedrigen Konzentration an natürlichem γ -Dodecanolacton (**2**) im Pfirsich-Aroma ist keine exakte Angabe der Enantiomerenzusammensetzung möglich ($\geq 98\%$ e.e.).

Vorstufe	Erdbeere γ -Undecanolacton (5)		Pfirsich γ -Undecanolacton (5)	
	(<i>R</i>) [%] [5]	(<i>S</i>) [%]	(<i>R</i>) [%]	(<i>S</i>) [%]
a)	98 ^{b)}	2 ^{b)}	82 ^{b)}	18 ^{b)}
a)	> 99 ^{c)}	< 1 ^{c)}	–	–
8a	71	29	79	21
8b	90	10	69	31
9	67	33	57	43
10a	62	38	58	42
11a	66	34	80	20
11b	63	37	74	26
12	47	53	34	66

^{a)} Unbehandelte Frucht. ^{b)} Natürliches γ -Decanolacton (**4**). ^{c)} Natürliches γ -Dodecanolacton (**2**).

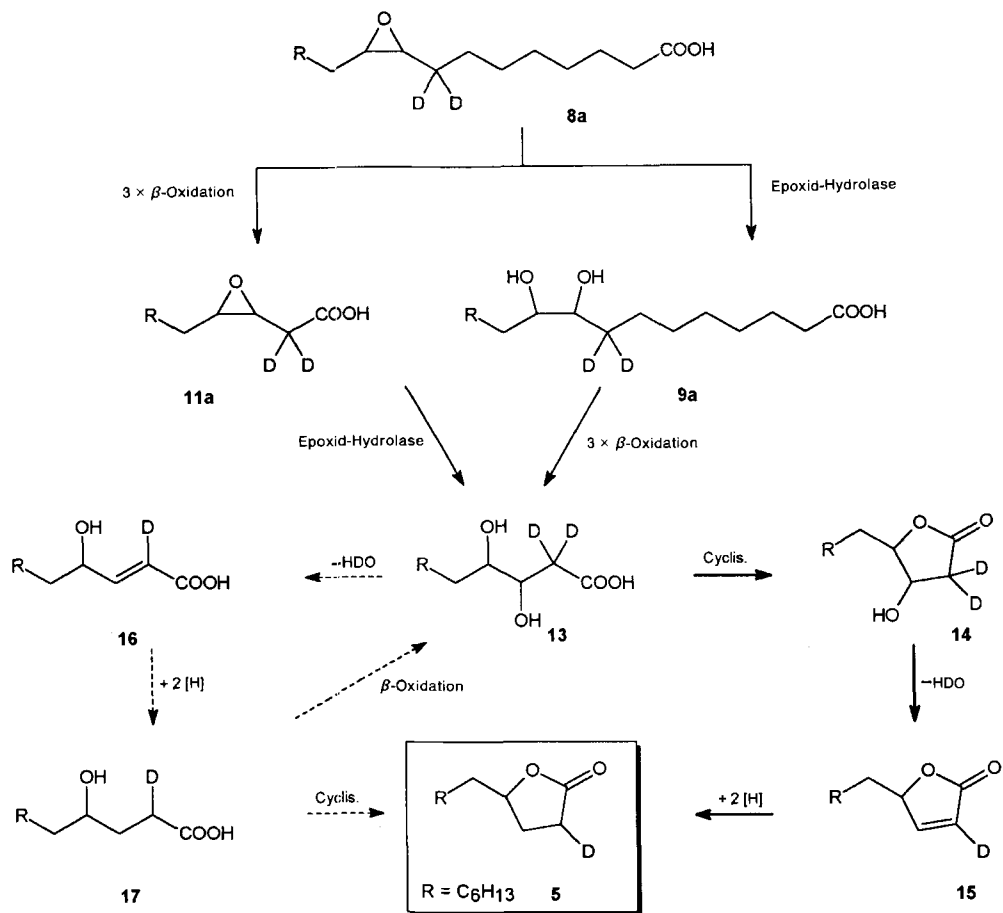
nach zeigt sich für Erdbeere und Pfirsich ein besonders hoher Anteil des (4*R*)-**5**, wenn die isomeren Epoxyheptadecansäuren **8a/b** als Vorstufen eingesetzt werden. Dabei entsteht in der Erdbeere aus der *trans*-Epoxyssäure **8b** ein (4*R*)- γ -Undecanolacton höherer Reinheit als aus der *cis*-Epoxyssäure **8a**. Im Pfirsich ist die *cis*-Epoxyssäure **8a** das bessere Substrat. In beiden Früchten wird auch der Dihydroxysäure-methylester **9** als Vorstufe angenommen. Die optische Reinheit des entstehenden Metaboliten (4*R*)-**5** ist jedoch stets niedriger als nach Injektion der Epoxide; er entspricht der Enantiomerenzusammensetzung des Metaboliten des 10-Hydroxyheptadecansäure-methylesters **10a**. Vom Gewebe des Pfirsichs werden die Epoxyfettsäuren **8a/b** sowie **11a/b** unabhängig von ihrer Kettenlänge zu (4*R*)-**5** hoher optischer Reinheit umgesetzt. Wird die Kettenlänge der Vorstufe, wie bei **12**, über das Mass der natürlichen C₁₂-Vorstufe verlängert, macht sich dies bei Erdbeere und Pfirsich übereinstimmend durch einen deutlichen Verlust an optischer Reinheit des entstehenden γ -Tridecanolactons erkennbar (*Tab.*).

4. Biosynthese von γ -Dodecanolacton (2) in reifenden Früchten. – Der erfolgreiche Einbau von *O*-funktionalisierten Derivaten der Heptadecansäure **8a/b** und ihrer Ester **9** und **10a/b** als niedere Analoga der stoffwechselüblichen C_{18} -Vorstufen belegt, dass für die Bildung von **2** zumindest in reifenden Erdbeeren, Nektarinen, Mirabellen und Pfirsichen die Ölsäure (**1**) als Quelle vermutet werden kann. Die zur Oxidation von Ölsäure zu *cis*-9,10-Epoxyoctadecansäure erforderlichen Enzyme sind im Pflanzenreich vermutlich ubiquitär [17]. Nach der *Tabelle* wird im Pfirsich die *cis*-9,10-Epoxyheptadecansäure (**8a**) in **5** hoher optischer Reinheit ((*4R*) 79%) übergeführt; dieser Wert liegt nur unwesentlich unter dem des natürlichen (*4R*)- γ -Decanolactons ((*4R*) 82%). Demnach könnten bereits die pflanzlichen Epoxid-Hydrolasen [18] sehr weitgehend die Enantiomerenzusammensetzung der Folgeprodukte bestimmen, da schon der C_{17} -Dihydroxyester **9** zu **5** mit deutlich ungünstigerer Enantiomerenverteilung ((*4R*) 57%) umgesetzt wird.

Berücksichtigt man den Isotopenverlust von einem D-Atom aus den Vorstufen **8a/b** bis **11a** und kombiniert dies mit den jeweils erzielten Enantiomerenreinheiten, so ergibt sich für die Bildung von **5** aus *cis*-9,10-Epoxyheptadecansäure (**8a**) die Sequenz von *Schema 3*. Durch passende Kombination der Abfolge von Epoxid-Hydrolyse und β -Oxidation entsteht schliesslich die C_{11} -Dihydroxysäure **13** als ein zentrales Zwischenprodukt. Analog zur Biosynthese von γ -Lactonen in der Hefe *Candida lipolytica* [9] dürfte sodann die offenkettige 3,4-Dihydroxyundecansäure (**13**) zum 3-Hydroxy- γ -undecanolacton (**14**) cyclisieren. Wasser-Abspaltung (–HDO) und Hydrierung des ungesättigten Zwischenprodukts **15** vervollständigt die Biosynthese von **5**. Die Reduktion des ungesättigten Lactons **15** wurde bereits unabhängig durch Injektion und Umsatz von synthetischem **15** \rightarrow **5** gesichert. Die Gesamtsequenz **13** \rightarrow **14** \rightarrow **15** \rightarrow **5** (*Schema 3*) wird vor allem durch den massiven Isotopenverlust des γ -Undecanolactons (**5**) aus dem injizierten 10-Hydroxy[8,8- 2H_2]heptadecansäure-methylester (**10a**) gestützt. Ester **10a** liefert nach drei β -Oxidationscyclen eine 4-Hydroxy[2,2- 2H_2]undecansäure (analog **17**), die sich sofort zu **5** cyclisieren kann. Dabei bleiben die D-Atome der Vorstufe vollständig erhalten (*Fig. 2*, Hauptfragment bei *m/z* 87). Im Gegensatz zum Diol **13** könnte eine 4-Hydroxy[2,2- 2H_2]undecansäure in einen weiteren β -Oxidationscyclus eintreten, wobei sich durch Dehydrierung und Wasser-Anlagerung ein unabhängiger Zugang zur einer 3,4-Dihydroxy-Vorstufe entsprechend **13** ergibt. Abhängig vom stereochemischen Verlauf der Dehydrierung und Wasser-Abspaltung können ein, bzw. zwei D-Atome verloren gehen (*m/z* 86 und *m/z* 85; vgl. *Fig. 2*, B). Da für alle anderen Vorstufen stets ein einheitlicher Isotopenverlust beobachtet wird, muss deshalb die Cyclisierung zum 3-Hydroxy- γ -lacton **14** gemäss *Schema 3* vor der Wasser-Abspaltung und Reduktion angeordnet werden (**13** \rightarrow **14** \rightarrow **15** \rightarrow **5**), damit eine mehrfache Genese von **13** und damit ein uneinheitlicher Isotopenbesatz von **5** vermieden wird. Die grundsätzlich denkbare Sequenz **13** \rightarrow **16** \rightarrow **17** \rightarrow **5** ist deshalb auszuschliessen, bzw. nicht dominant. Für die Bildung des natürlichen γ -Dodecanolactons **2** muss die Sequenz **13** \rightarrow **14** \rightarrow **15** \rightarrow **5** von *Schema 3* auf die Ölsäure (**1**) übertragen werden.

Der erfolgreiche Einbau von deuterierter 9,10-Epoxyheptadecansäure bei Pfirsichen und Erdbeeren sowie Nektarinen und Mirabellen in die artifizielle Aroma-Komponente γ -Undecanolacton (**5**) macht deutlich, dass neben den bereits etablierten Routen zur *O*-Funktionalisierung der Fettsäuren auch die Epoxidierung von (C=C)-Bindungen gezählt werden muss. Alle vorgenannten Früchte besitzen offensichtlich Epoxid-Hydrolasen, so dass die applizierten Epoxysäuren *via* Dihydroxysäuren zu γ -Undecanolacton **5**

Schema 3



metabolisiert werden können. Dabei ist die Umwandlung der racemischen Epoxyssäuren **8a/b** in (4*R*)- γ -Undecanolacton hoher optischer Reinheit (*Tab.*) besonders bemerkenswert. Gemäss der hier aufgezeigten Sequenz **8a** \rightarrow **5** können insbesondere die Fettsäuren mit isolierten (C=C)-Bindungen wie die Ölsäure (**1**) als Quelle für die olfaktorisch hochaktiven γ - und δ -Lactone genutzt werden. Weitere Epoxyssäuren, abgeleitet von Linol- und Linolensäure, sind seit langem bekannt [18] [19], und es bleibt zu prüfen, ob nicht eher diese Verbindung anstelle der toxischen Fettsäure-hydroperoxide [5] als die eigentlichen Vorstufen für die Biosynthese von γ - und δ -Lactonen anzusehen sind. Offen sind ferner die stereochemischen Aspekte der späten Prozesse, die dem Ringschluss der acyclischen 3,4-Dihydroxyssäuren **13** zum 3-Hydroxy- γ -lacton **14** folgen. Die Klärung dieser Schritte ist von besonderer Bedeutung, da sie vermutlich auf die noch offenen Detailfragen der mikrobiellen γ -Lacton-Biosynthese übertragen werden können und einen Vergleich mit dem bekannten stereochemischen Verlauf der Reduktion von ungesättigten δ -Decanolactonen ermöglichen [20].

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn) und dem Fonds der Chemischen Industrie (Frankfurt am Main) für finanzielle Unterstützung. Der BASF (Ludwigshafen) und der Bayer AG (Leverkusen) danken wir für Chemikalien und Lösungsmittel.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Vgl. auch [21]. MS: Finnigan MAT 90 GLC/MS und Fisons MD 800, kombiniert mit einem Gaschromatographen Fisons-GC 8000. GC-Interface: 250°. Scanbereich: 35–350 Dalton/s. He als Trägergas. Anal. GLC: Carlo-Erba-Gaschromatograph, Modell Vega. H₂ mit 30 cm/s als Trägergas. Trennsäulen: DB-1 (15 m × 0,25 mm) und Lipodex®E (Octakis(3-O-buteryl-2,6-di-O-pentyl)- γ -cyclodextrin), Macherey & Nagel, D-52313 Düren.

9-Oxo[8,8-²H₂]nonansäure-methylester (6). Eine Lsg. von undeutertem **6** (1,23 g, 6,6 mmol, [11]) und Et(i-Pr)₂N (0,30 g, 2,3 mmol) in CCl₄ (5 ml) wird mit ²H₂O (5 ml) überschichtet und für 12 h bei 50° gerührt. Der Isotopenaustausch wird durch ¹H-NMR kontrolliert. Nach vollständigem Austausch der aciden Protonen an C(8) (ggf. wird das ²H₂O ausgetauscht) wird aufgearbeitet. Alternativ kann in homogener Phase mit CH₃O²H gearbeitet werden. Ausbeute: 1,12 g (90%). Der deuterierte Aldehyd **6** ist ausreichend rein für weitere Umsetzungen. IR (Film): 2932, 2857, 1739s, 1437, 1364, 1251, 1196, 1174, 1128, 1056, 727. ¹H-NMR (CDCl₃, TMS): 9,77 (s, 1 H-C(9)); 3,68 (s, MeO); 2,31 (t, 2 H-C(2)); 1,71–1,40 (m, 2 H-C(3), 2 H-C(7)); 1,32 (m, 6 H). MS (70 eV): 157 (17, [M – OCH₃]⁺), 143 (35), 117 (9), 111 (53), 87 (65), 101 (9), 96(9), 83 (42), 74 (100), 69 (31), 59 (29), 55 (46), 43 (32), 41 (23). HR-MS: 157,1183 (C₉H₁₃²H₂O₂, [M – OCH₃]⁺; calc.: 157,1198).

(9Z)-[8,8-²H₂]Heptadec-9-ensäure-methylester (7a). Eine Suspension von (Octyl)(triphenyl)phosphoniumbromid (7,13 g, 14 mmol) in THF (50 ml) wird bei 0° mit *t*-BuLi (8,35 ml einer 1,7M Lsg. in Pentan, 14 mmol) metalliert. Nach 15 min wird auf –78° abgekühlt, und eine Lsg. von **6** (1,98 g, 12,6 mmol) in THF (20 ml) wird injiziert. Nach 30 min lässt man über 45 min auf RT. kommen. Nach üblicher Aufarbeitung und Chromatographie an Kieselgel (Pentan/Et₂O 98:2 → 95:5 (v/v)) erhält man **7a** als farblose Flüssigkeit: 1,147 g (33,7%, (Z)/(E) 83:17). IR (Film): 3004, 2925, 2855, 1744, 1458, 1436, 1363, 1258, 1199, 1170, 725. ¹H-NMR (CDCl₃, TMS): 5,39–5,27 (m, 1 H-C(9), 1 H-C(10)); 3,65 (s, MeO); 2,29 (t, 2 H-C(2)); 2,03–1,95 (m, 2 H-C(11)); 1,63–1,60 (q, 2 H-C(3)); 1,42–1,26 (m, 18 H); 0,89–0,84 (t, 3 H-C(17)). MS (70 eV): 284 (3, M⁺), 252 (29), 210 (17), 209 (15), 168 (9), 167 (5), 153 (14), 139 (15), 138 (16), 125 (21), 124 (22), 111 (39), 110 (37), 98 (72), 97 (74), 87 (70), 84 (95), 83 (71), 74 (98), 69 (83), 59 (27), 56 (69), 55 (100), 43 (57), 41 (50). HR-MS: 284,2662 (C₁₈H₃₂²H₂O₂, M⁺; calc.: 284,2684).

(9E)-[8,8-²H₂]Heptadec-9-ensäure-methylester (7b). Eine Suspension von Zn-Staub (0,50 g, 7,7 mmol) und CrCl₃ (0,69 g, 6,90 mmol) in THF (10 ml) lässt man 30 min bei RT. rühren und setzt dann DMF (3,5 ml) hinzu. Nach weiteren 45 min tropft man eine Lsg. von 1-Acetoxy-1-bromooctan (1,0 g, 4,0 mmol [12]) und **6** (0,376 g, 2,0 mmol) in THF (10 ml) hinzu und belässt 30 min am Rückfluss. Man rührt weitere 12 h bei RT., verdünnt mit Pentan (20 ml) und hydrolysiert mit H₂O (20 ml). Übliche extraktive Aufarbeitung und Chromatographie an Kieselgel (Pentan/Et₂O 98:2 → 95:5 (v/v)) ergibt **7b**: 0,132 g (24,5%, (E)/(Z) 3:1). IR (Film): 2926, 2855, 1744, 1466, 1436, 1363, 1172, 968, 724. ¹H-NMR (CDCl₃, TMS): 5,42–5,29 (m, 1 H-C(9), 1 H-C(10)); 3,67 (s, MeO); 2,30 (t, 2 H-C(2)); 2,09–1,87 (m, 2 H-C(11), ca. 1 H-C(8) durch ²H-Verlust); 1,70–1,52 (m, 2 H-C(3)); 1,43–1,16 (m, 18 H); 0,88 (t, 3 H-C(17)). MS (70 eV): 284 (19, M⁺), 283 (17), 282 (25), 252 (64), 251 (67), 250 (65), 240 (9), 208 (32), 166 (18), 152 (16), 141 (16), 124 (21), 110 (38), 98 (69), 87 (73), 84 (87), 74 (100), 69 (82), 55 (95), 43 (53), 41 (37). HR-MS: 284,2671 (C₁₈H₃₂²H₂O₂, M⁺); calc.: 284,2684.

cis-9,10-Epoxy[8,8-²H₂]heptadecansäure (8a). Zu einer Lsg. von **7a** (1,35 g, 5,0 mmol) in CH₂Cl₂ (80 ml) gibt man bei 0° unter Rühren 3-Chloroperbenzoesäure (1,73 g, 10,0 mmol). Man lässt auf RT. kommen und extrahiert nach 1 h die freie 3-Chlorbenzoesäure durch Ausschütteln mit gesättigter Na₂CO₃-Lsg. und H₂O. Chromatographie an Kieselgel (Pentan/Et₂O 85:15 (v/v)) ergibt 1,17 g (82%) des Epoxy-Esters, der in 20 ml einer 0,3N NaOH-Lsg. in 90% MeOH für 3 h unter Rückfluss verseift wird. Danach verdünnt man mit H₂O (20 ml) und extrahiert restlichen Ester mit Pentan. Nach Ansäuern (pH 3) der wässr. Phase wird die freie Säure **8a** mit Pentan/Et₂O (9:1 (v/v)) extrahiert: 1,00 g (90%). Farbloser Feststoff. Schmp. 32°. IR (Film): 3600–2400 (br.), 2921, 2853, 2197, 2111, 1709, 1469, 1280, 1240, 1202, 1103, 853, 832, 720. ¹H-NMR (CDCl₃, TMS): 2,96–2,87 (m, 2 H-C(9,10)); 2,33 (t, 2 H-C(2)); 1,65 (q, 2 H-C(3)); 1,57–1,20 (m, 20 H); 0,90 (t, 3 H-C(17)). MS (70 eV): 286 (0,2 M⁺), 279 (2), 185 (3), 163 (7), 156 (100), 139 (100), 111 (78), 97 (5), 85 (10), 75 (86), 69 (20), 55 (27), 50 (48), 41 (21). HR-MS: 286,2455 (C₁₇H₃₀²H₂O₃, M⁺; calc.: 286,2477).

trans-9,10-Epoxy[8,8-²H₂]heptadecansäure (8b). Herstellung analog zu **8a** aus **7b**. ¹H-NMR (CDCl₃, TMS): 2,75–2,61 (m, 2 H-C(9/10)); 2,37 (t, 2 H-C(2)); 1,63 (q, 2 H-C(3)); 1,59–1,20 (m, 20 H); 0,88 (t, 3 H, H-C(17)). Übrige Spektren identisch mit **8a**.

9,10-Dihydroxy[8,8-²H₂]heptadecansäure-methylester (**9**). Zu einer Lsg. von K₃Fe(CN)₆ (1,976 g, 6,0 mmol) und K₂CO₃ (0,83 g, 6,0 mmol) in einem Lsgm.-Gemisch von *t*-BuOH (15 ml) und H₂O (15 ml) gibt man unter gutem Rühren **7a** (0,54 g, 2,0 mmol) und schliesslich OsO₄-Lsg. (1,5 ml einer 2,5 Gew.-% *t*-BuOH Lsg., 0, 05 mmol). Die Mischung lässt man bei RT. 24 h rühren. Zur Vernichtung von überschüssigem OsO₄ wird Na₂SO₃ bis zur Blau-Färbung zugesetzt. Anschliessend wird das Lsgm. entfernt und der Rückstand in wenig H₂O aufgenommen. Die wässr. Lsg. extrahiert man gründlich mit Et₂O. Chromatographie an Kieselgel (Et₂O/Hexan 60:40 (*v/v*)) ergibt **9** (0,268 g, 44%) als einen farblosen Feststoff. Schmp. 97%. IR (Film): 3305, 2915, 2851, 2192, 2105, 1741, 1467, 1436, 940, 723. ¹H-NMR (CDCl₃): 3,68 (*s*, MeO); 3,58 (*br. s*, H-C(9), H-C(10)); 2,30 (*t*, 3 H-C(2)); 1,49 (*br. s*, 2 OH); 1,71–1,54 (*m*, 2 H-C(11)); 1,54–1,17 (*m*, 20 H); 0,88 (*t*, 3 H-C(17)). MS (70 eV): 282 (1, [M – 2H₂O]⁺), 281 (1), 269 (1), 252 (1), 229 (1), 216 (2), 201 (4), 189 (9), 187 (5), 171 (5), 170 (5), 157 (47), 143 (20), 142 (19), 127 (38), 111 (47), 98 (36), 97 (38), 96 (35), 87 (68), 84 (52), 83 (49), 74 (72), 69 (67), 59 (38), 57 (90), 55 (100), 43 (64), 41 (50). HR-MS: 1289,1422 (C₁₀H₁₇²H₂O₃); calc.: 189,1460.

9- und 10-Hydroxy[8,8-²H₂]heptadecansäure-methylester (**10a** bzw. **10b**). Zu einer Lsg. von Borandimethylsulfid-Komplex (1,0 ml, 10 mmol) in CH₂Cl₂ (7,8 ml) tropft man bei 0° langsam **7a** (2,70 g, 10 mmol) zu. Nach vollständiger Umsetzung (2,5 h, GLC) werden bei 0° nacheinander H₂O (0,4 ml), 3M NaOH (0,6 ml), CH₂Cl₂ (3 ml), EtOH (1,0 ml) und zuletzt bei RT. H₂O₂ (1,0 ml, 30% Lsg.) zugesetzt. Nach 2 h bei 55° wird die wässr. Phase mit K₂CO₃ gesättigt. Extraktive Aufarbeitung mit Et₂O und Chromatographie an Kieselgel ergibt **10a** und **10b** als eine farblose, viskose Flüssigkeit. Ausbeute: 2,6 g (91%). IR (Film): 3332, 2919, 2852, 2181, 2100, 1742, 1468, 1439, 1133, 882, 723. ¹H-NMR (CDCl₃, TMS): 3,63 (*s*, MeO); 3,58 (*m*, 2 H-C(9/10)); 2,32 (*t*, 2 H-C(2)); 1,68–1,52 (*m*, 2 H-C(3)); 1,50–1,10 (*m*, 20 H); 0,84 (*t*, 3 H-C(17)). MS (70 eV): 284 (3, [M – H₂O]⁺), 253 (13), 252 (22), 210 (15), 203 (8), 171 (50), 168 (12), 157 (18), 153 (12), 143 (14), 139 (12), 125 (19), 124 (19), 111 (38), 97 (63), 87 (88), 84 (72), 83 (58), 74 (92), 69 (88), 55 (100), 43 (52), 41 (48). HR-MS: 302,2777 (C₁₈H₃₄²H₂O₃, M⁺); calc.: 302,2790.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. A. Maga, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1976**, *10*, 1.
- [2] E. Demole, E. Lederer, D. Mercier, *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 675.
- [3] R. Kaiser, in 'The Scent of Orchids', Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [4] K. Dettner, G. Schwinger, *J. Chem. Ecol.* **1982**, *8*, 1411.
- [5] W. Albrecht, M. Schwarz, J. Heidlas, R. Tressl, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1954.
- [6] R. Tressl, W. Albrecht, *Z. Naturforsch., C* **1990**, *45*, 207.
- [7] R. Cardillo, G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, V. Nepoti, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4979.
- [8] C. Fuganti, R. Cardillo, G. Fronza, P. Grasselli, A. Mele, D. Pizzi, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5237.
- [9] I. L. Gatfield, H. Sommer, in 'Recent Developments in Flavour and Fragrance Chemistry', VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993, S. 291.
- [10] L. J. Morris, *Biochem. J.* **1970**, *118*, 681.
- [11] E. H. Pryde, D. E. Anders, H. M. Teeter, J. C. Cowan, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 618.
- [12] M. Knecht, W. Boland, *Synlett* **1993**, *11*, 837.
- [13] C. Frössl, Dissertation, Universität Karlsruhe, 1992.
- [14] W. Boland, P. Ney, L. Jaenicke, G. Gassmann, in 'Analysis of Volatiles', Ed. P. Schreier, Walter De Gruyter, Berlin-New York, 1984, S. 371.
- [15] J. Donath, W. Boland, *Phytochemistry* **1995**, im Druck.
- [16] W. A. König, B. Gehrke, D. Icheln, P. Evers, J. Dönneke, W. C. Wang, *J. High. Res. Chromatogr.* **1992**, *15*, 367.
- [17] R. C. Badami, K. B. Patil, *Prog. Lipid Res.* **1981**, *19*, 119.
- [18] J. Meijer, J. W. DePierre, *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *64*, 207.
- [19] R. C. Badami, K. B. Patil, *Prog. Lipid Res.* **1981**, *19*, 119.
- [20] G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, M. Barbeni, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6375.
- [21] A. Gäbler, W. Boland, U. Preiss, H. Simon, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1773.