

ZUR BIOSYNTHESE DES DEHYDROMATRICARIAESTERS

RUTH JENTE und EBERHARD RICHTER

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin, D 1000 Berlin 12, W. Germany

(Received 6 April 1976)

Key Word Index—*Grindelia robusta; Coreopsis lanceolata; Anacyclus pyrethrum; Compositae; biosynthesis; polyacetylenes; dehydromatricaria ester; loss of tritium.*

Abstract—Biosynthetic experiments with the two polyacetylenic C₁₈ compounds and with a polyacetylenic C₁₆ compound do not support the hypothesis that the biosynthesis of the C₁₀ polyacetylene dehydromatricaria ester involves a Baeyer–Villiger type of oxidation of a C₁₈ precursor. Feeding experiments with [9-¹⁴C]crepenynate combined with [9,10-³H]oleic acid confirm the assumption that in higher plants crepenynate is a real intermediate in the biosynthetic conversion of oleic acid into polyacetylenes. The incorporation rates of crepenynate into various polyacetylenes are higher than those of oleic acid, as was expected. Biosynthetic studies with the doubly labelled precursors [10-¹⁴C,9,10-³H]oleate and [9-¹⁴C,10-³H]crepenynate to form the above C₁₀ polyacetylene show an unexpected loss of tritium, which cannot yet be explained.

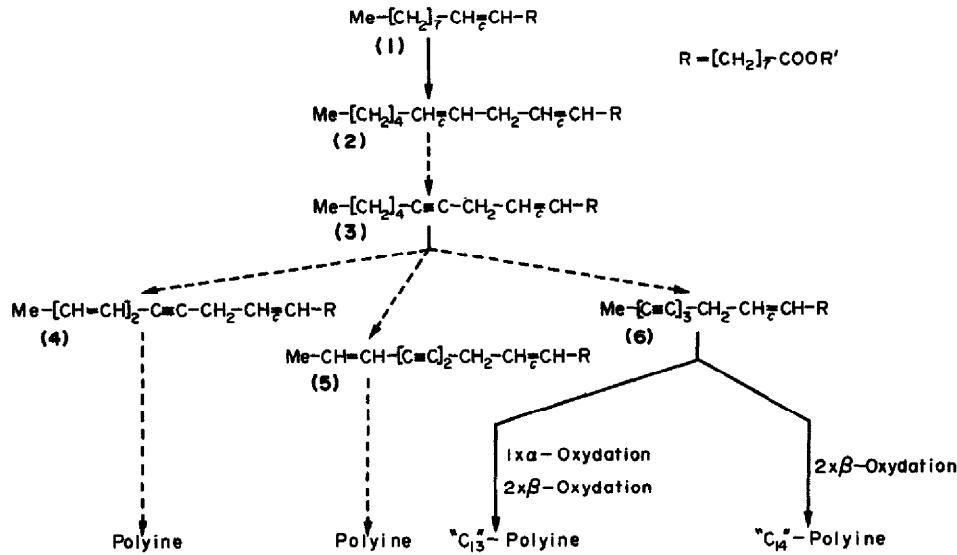
EINLEITUNG

Sowohl bei Mikroorganismen als auch bei höheren Pflanzen ist Ölsäure (1) eine Vorstufe für die Biosynthese der Polyine [1–6]. An einigen Beispielen wurde die Umwandlung von Linolsäure (2) [5–7] und Crepissäure (3) [5, 6, 8] in Polyine gezeigt. Weiterhin ist geklärt, daß der C₁₈-Ester (6) eine Vorstufe für eine Vielfalt von natürlichen Polyinen mit 3 endständigen, konjugierten Dreifachbindungen darstellt. Nach dem allgemeinen Biosyntheseschema für Polyine (Schema 1) treten zunächst kettenverkürzende Schritte ein (α - und β -Oxydation), wonach dann durch einen oxydativen Angriff auf die reaktionsfähige Methylengruppe unter Allylumlagerung ein konjugiertes System gebildet wird, das durch weitere Reaktionen zu den isolierten Polyinen umgewandelt wird [1, 4, 6, 9, 10].

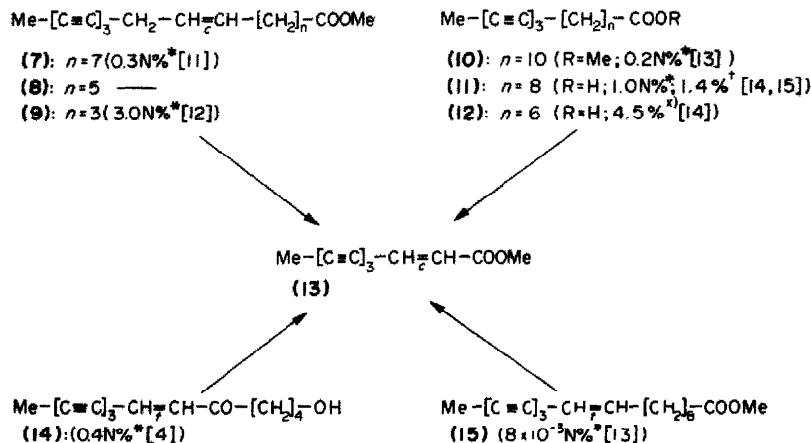
Die Bildung des Dehydromatricariaesters (13) läßt sich nicht eindeutig in diesen Biosyntheseverlauf einordnen, wie aus Schema 2 ersichtlich ist.

Man erkennt, daß die Verbindungen (7), (9)–(12) und (14), also unterschiedliche Verbindungstypen, relativ gut in (13) eingebaut werden, doch das nahezu negative Ergebnis mit dem Triin-en-ester (15) zeigt, daß nicht jede Triin-Verbindung eine gute Vorstufe ist.

Die Verfütterung von [16-³H]-(11) an *Chrysanthemum serotinum* ergab, daß wenigstens 6% des in dem Pflanzenmaterial vorhandenen Esters (13) in 38 Stdn. aus dem markierten (11) gebildet worden sind, was auf einen relativ regen Stoffwechsel von (13) schließen läßt [15]. Das Auffinden eines Triglycerids mit der Gruppierung (16) [16] führte zu der Annahme, daß (13) eventuell durch eine Art Baeyer–Villiger-Oxydation direkt aus einer geeigneten C₁₈-kettigen Vorstufe entstehen könnte [2].

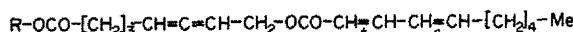


Schema 1. Biosynthese der Polyine.

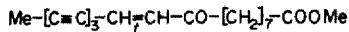


Schema 2. Einbau von Polyinvorstufen in den cis-Dehydromatricariaester (13). Die Prozentangaben bedeuten den relativen Einbau der betreffenden, in der endständigen Methylgruppe radioaktiv-markierten Vorstufe in (13). Die einzelnen Fütterungen sind zu verschiedenen Zeiten durchgeführt worden. * Fütterung an *Artemisia vulgaris* L., † Fütterung an *Chrysanthemum serotinum* L.

Das würde bedeuten, daß, ausgehend von der allgemeinen Vorstufe (7), der oxydative Angriff bereits vor der Kettenverkürzung einsetzt und der Keto-ester (17) eine besonders gute Vorstufe für (13) darstellen sollte.



(16)



(17)

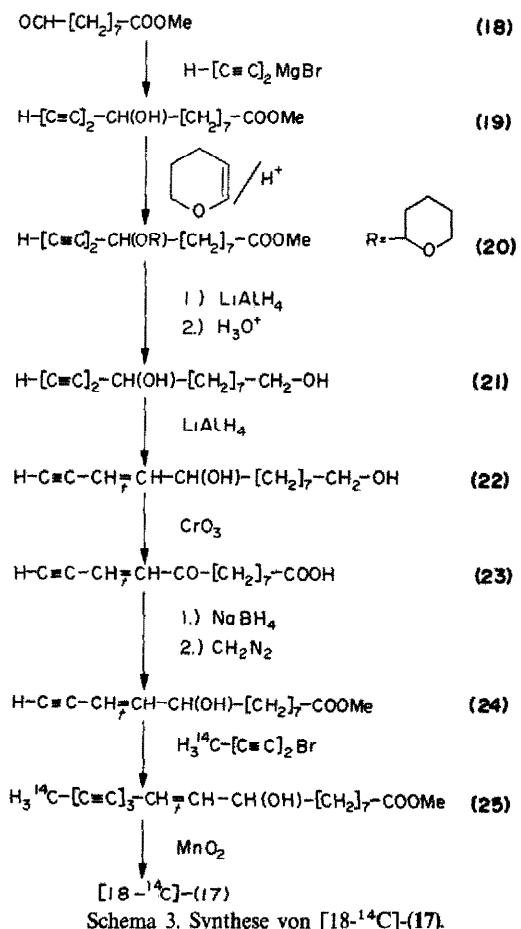
Aus diesem Grunde wurde der Ester (17) radioaktiv aufgebaut und auf Einbau in (13) überprüft. Als Vergleich wäre dann bei einer Fütterung mit (7) und (8) zu erwarten, daß (7) von der Pflanze über (17) in (13) schneller umgewandelt wird als (8). Darum wurden außerdem (7) und (8), mit ^3H bzw. ^{14}C markiert, gleichzeitig an Pflanzen versüßert und auf Einbau in Polyine untersucht.

Angeregt durch das bei diesen Versuchen gefundene anomale Einbauverhalten von $[9,10\text{-}^3\text{H}_2]\text{-}(7)$ in (13) wurde auf das Problem früherer Befunde, daß gerade das sich im regen Stoffwechsel befindliche (13) bei Fütterungsversuchen mit $[9,10\text{-}^3\text{H}_2]\text{-Ölsäure}$ praktisch keinen Einbau zeigte [17], erneut eingegangen. Um einerseits den Einbau von $[9,10\text{-}^3\text{H}_2]\text{-Ölsäure}$ in (13) zu überprüfen und gleichzeitig die Annahme zu erhärten, daß (3) stets ein Intermediärprodukt bei der Umwandlung der Ölsäure in eine Anzahl verschiedener Polyine ist, wurde $[9,10\text{-}^3\text{H}_2]\text{-}(1)$ gleichzeitig mit $[9,14\text{C}]\text{-}(3)$ an mehrere Pflanzen verfüttert und auf Einbau in C_{10^-} , C_{13^-} und C_{14^-} -Polyine untersucht.

Das auch hierbei erstaunliche Einbauergebnis der ^3H -markierten Vorstufe in (13) veranlaßte die Durchführung zusätzlicher Fütterungen mit sowohl doppelt-markierter Ölsäure als auch doppelt-markierter Crepisäure.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der markierte Keto-ester (17) läßt sich nach dem im Schema 3 gezeigten Wege erhalten. Da (19) nicht direkt in (22) überführt werden konnte, mußte der Umweg über (20) beschritten werden.



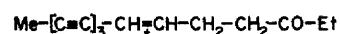
Schema 3. Synthese von $[18-14\text{C}]\text{-}(17)$.

Die Fütterungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Bei den Versuchen mit den markierten Verbindungen (7) und (8) sind neben den Einbauraten in das Polyin (13) auch die in die Polyine (26)–(28), welche ebenfalls in diesen Pflanzen vorkommen, bestimmt worden. Die Ergebnisse können derart gedeutet werden, daß die drei letzteren Polyine eine weitaus langsamere Bildungsgeschwindigkeit haben als (13).

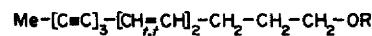
Tabelle 1. Einbau von $[18^{-14}\text{C}]$ -(17), $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(7) und $[16^{-14}\text{C}]$ -(8) in Polyine

Versuchs-Nr.	Fütterungspflanze	Verfütterte Verbindungen	Isoliertes Polypin (Menge)	Gesamtakt. des Polypins		Einbau d. verfütterten Verbindungen	
				[dpm ^3H]	[dpm ^{14}C]	^3H -mark. [%]	^{14}C -mark. [%]
I	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	$[18^{-14}\text{C}]$ -(17)*	(13) (82 μMol)	—	$2,52 \times 10^5$	—	0,9
II	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	$[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(7)† und $[16^{-14}\text{C}]$ -(8)‡	(13) (651 μMol) (26) (530 μMol) (27a) (21 μMol) (13) (174 μMol) (28) (724 μMol)	$6,71 \times 10^4$ $4,2 \times 10^3$ $1,9 \times 10^3$ $7,57 \times 10^4$ $1,68 \times 10^4$	$2,64 \times 10^5$ $3,3 \times 10^3$ $0,9 \times 10^3$ $7,73 \times 10^5$ $2,20 \times 10^4$	0,26§ $8,1 \times 10^{-3}$ $3,7 \times 10^{-3}$ 0,29§	$2,4 \times 10^{-2}$ $6,5 \times 10^{-3}$ 5,56 $6,5 \times 10^{-2}$ § 0,16
III	<i>Chrysanthemum serotinum</i> L.	$[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(7)† und $[16^{-14}\text{C}]$ -(8)‡	(13) (174 μMol) (28) (724 μMol)	$7,57 \times 10^4$ $1,68 \times 10^4$	$7,73 \times 10^5$ $2,20 \times 10^4$	—	—

* Verfüttert. Akt.: $2,91 \times 10^7$ dpm; † $5,17 \times 10^7$ dpm; ‡ $1,39 \times 10^7$ dpm. §Bei der Berechnung des Einbaus der ^3H -markierten Verbindung wurde berücksichtigt, daß der radioaktive Wasserstoff, der dem Wasserstoff am C-9 der Ölsäure entspricht, bei der Biosynthese durch Oxydation verloren geht. ||Dieser Wert konnte nach dem Isomerisieren zu *trans*-(13) bestätigt werden.

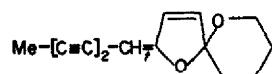


(26)



(27a) R = H

(27b) R = Ac



(28)

Der Einbau von $[18^{-14}\text{C}]$ -(17) in (13) bei *Artemisia vulgaris* ist gut, doch der Einbau von $[16^{-14}\text{C}]$ -(8) ist keinesfalls schlechter. Dagegen ist der Einbau von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(7) in (13) niedriger als der von $[18^{-14}\text{C}]$ -(17). Offensichtlich kommt noch eine weitere Besonderheit bei der Biosynthese des Dehydromatricariaesters (13) hinzu. In Abbildung 1 ist der prozentuale Einbau der ^{14}C -markierten Verbindung (8) in die isolierten Polyine jeweils gleich "1" gesetzt und der Einbau der tritiummarkierten Verbindung (7) in das betreffende Polypin in Relation dazu aufgetragen. Bei allen geprüften Polyinen (13), (26)–(28) ist der Einbau von (8) besser als der von (7), was im Einklang mit früheren Befunden und dem allgemeinen Biosyntheseschema steht [9]. Auffallend ist jedoch, daß (13) einen besonders geringen Einbau der ^3H -markierten Vorstufe (7) im Vergleich zu dem der ^{14}C -markierten Vorstufe (8) zeigt.

Nach der Vorstellung, daß bei der biologischen Überführung von (7) in (13) keine stufenweise verlaufende Kettenverkürzung eine Rolle spielt, sondern eine C₈-Einheit abgespalten wird, sollte die C₁₈-Verbindung eher einen größeren Einbau zeigen als die C₁₆-Verbin-

* Ölsäure und Ölsäure-methylester weisen bei Einbauversuchen in Polyine keine wesentlichen Unterschiede auf [15]. Ein zur Überprüfung der Tritiumpositionen durchgeföhrter Kaliumpermanganat-Abbau von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1) zeigte, daß mehr als 95% der radioaktiven Wasserstoffatome an der cis-Doppelbindung lokalisiert sind, da die isolierte Azelainsäure nur 2% der spezif. Aktivität von (1) aufweist [17].

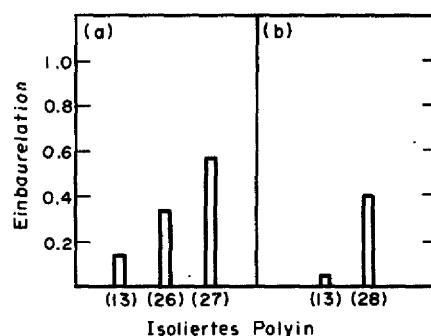


Abb. 1. Prozentualer Einbau von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(7) in Relation zum prozentualen Einbau von gleichzeitig verfüttertem $[16^{-14}\text{C}]$ -(8) in Polyine. Die Einbaurelation ergibt sich rechnerisch aus dem prozentualen Einbau der ^3H -markierten Vorstufe dividiert durch den der ^{14}C -markierten Vorstufe. (a) Fütterung an *Artemisia vulgaris* (= Versuch II) und (b) an *Chrysanthemum serotinum* (= Versuch III).

dung. Aber auch bei dem möglichen Biosyntheseweg einer stufenweise verlaufenden Kettenverkürzung um jeweils eine C₂-Einheit sollte man die Relation zwischen den Einbaugrößen von (7) und (8) innerhalb einer Pflanze und bei einer Fütterung als vergleichbar erwarten können, wenn man annimmt, daß nach einer C₂-abspaltenden Reaktion an der C₁₈-Verbindung (7) sich beide Vorstufen zu einem doppelt-markierten Intermediärprodukt mischen würden.

Unter Einbeziehung der zuvor durchgeführten Fütterungsversuche weisen diese Versuchsergebnisse deutlich auf eine Anomalie im Verlauf der Biosynthese des Esters (13) hin, was durch die Ergebnisse der folgenden Versuche bestätigt wird.

Um sowohl den Einbau von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -Ölsäure in (13) zu untersuchen als auch die Einbaurelation von (1) und (3) in verschiedene Polyintypen zu erhalten, haben wir $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1) ($R' = \text{H}$)* und $[9,14\text{C}]$ -(3) ($R' = \text{Me}$) gleichzeitig an Compositen verfüttert und die Polyine (13), (26), (27), (29)–(32) auf Einbau untersucht.

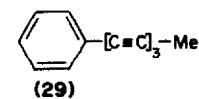
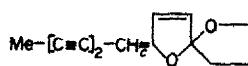


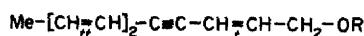
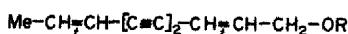
Tabelle 2. Einbau von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -Ölsäure und $[9^{-14}\text{C}]$ -Crepissäure-methylester in Polyine. Gemeinsame Verfütterung von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1) ($\text{R}' = \text{H}$; $1,1 \times 10^9 \text{ dpm}$) und $[9^{-14}\text{C}]$ -(3) ($\text{R}' = \text{Me}$; $9,6 \times 10^7 \text{ dpm}$); verfüt. Verhältnis $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 11,46$

Versuchs-Nr.	Fütterungspflanze	Isoliertes Polinin (Menge)	Gesamtakt. des Polinins		Einbau d. verfüt. Verbindungen	
			[dpm ^3H]	[dpm ^{14}C]	^3H -mark. [%]	^{14}C -mark. [%]
IV	<i>Coreopsis lanceolata</i> L.	(29) (113,4 μMol) (27a,b)* (41,2 μMol)	1218	1278	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-3}$
V	<i>Chrysanthemum flosculosum</i> L.	(30) (189,0 μMol)	8430	23400	$1,5 \times 10^{-3}$ †	$2,4 \times 10^{-2}$
VI	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	(13) (572,7 μMol) (26) (303,0 μMmol)	710	14500	$1,3 \times 10^{-4}$ †	$1,5 \times 10^{-2}$
VII	<i>Grindelia robusta</i> Nutt.	(31a,b)* (138,5 μMol) (32a,b)* (67,1 μMol)	4753	6149	$8,6 \times 10^{-4}$ †	$6,4 \times 10^{-3}$
			3134	2189	$5,7 \times 10^{-4}$ †	$2,3 \times 10^{-3}$

* Das isolierte Polinin-acetat wurde nach der Verseifung mit dem entsprechenden Polinin-alkohol gemeinsam bestimmt. † Bei der Berechnung des Einbaus von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -Ölsäure wurde berücksichtigt, daß der radioaktive Wasserstoff am C-9 bei der biosynthetischen Umwandlung durch Oxydation verloren geht.



(30)

(31a) $\text{R} = \text{H}$ (31b) $\text{R} = \text{Ac}$ (32a) $\text{R} = \text{H}$ (32b) $\text{R} = \text{Ac}$

Deutlich kommt dieser Effekt zum Ausdruck bei den weiteren Fütterungsversuchen mit den Verbindungen (1) und (3) ($\text{R}' = \text{Me}$) sowohl ^3H - als auch ^{14}C -markiert. Die dafür verwandten Verbindungen $[10^{-14}\text{C}, 9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1) sowie $[9^{-14}\text{C}, 10^{-3}\text{H}]$ -(3) sind definierte Mischungen aus $[10^{-14}\text{C}]$ -(1) und $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1) bzw. $[9^{-14}\text{C}]$ -(3) und $[10^{-3}\text{H}]$ -(3) ($\text{R}' = \text{Me}$). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 3 zusammengefaßt und in Abbildung 3 ist der jeweilige Einbau der ^3H -markierten Vorstufe in Relation zu dem der entsprechenden ^{14}C -markierten Verbindung ersichtlich.

Nach Fütterung von $[10^{-14}\text{C}, 9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1) ($\text{R}' = \text{Me}$) an *Anacyclus pyrethrum* erhält man (13), dessen ^3H -Aktivität höchstens 5% der ^{14}C -Aktivität aufweist, obgleich das Isotopenverhältnis der eingefütterten Verbindung $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 2,51$ betragen hat. Dieses Ergebnis ist nur so zu deuten, daß bei der Umwandlung in (13) zusätzlich zum Verlust der ^3H -Markierung am C-9 der Ölsäure, die dabei vollständig durch Oxydation entfernt wird,

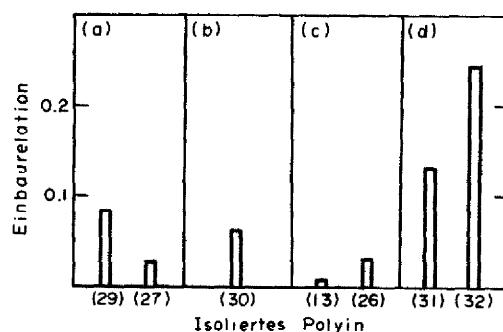


Abb. 2. Prozentualer Einbau von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -Ölsäure in Relation zum prozentualen Einbau von gleichzeitig verfüttertem $[9^{-14}\text{C}]$ -Crepissäure-methylester in Polyine. Berechnung der Einbaurelation wie bei Abb. 1 beschrieben. (a) Fütterung an *Coreopsis lanceolata* (= Versuch IV), (b) an *Chrysanthemum flosculosum* (= Versuch V), (c) an *Artemisia vulgaris* (= Versuch VI) und (d) an *Grindelia robusta* (= Versuch VII).

Die Ergebnisse dieser Fütterungsversuche sind in Tabelle 2 zusammengefaßt und in Abbildung 2 dargestellt. Die wiederum relativ kleinen Einbauraten sind, wie bereits bei den Versuchen der Tabelle 1 zum Ausdruck kam, bei den verschiedenen Polyinen innerhalb einer Fütterung und Pflanze unterschiedlich. Dieser schon wiederholt beobachtete Effekt zeigt, daß die einzelnen Polyine mit unterschiedlicher Aktivität am Stoffwechselgeschehen beteiligt sind [17]. In allen Fällen ist der Einbau der ^3H -markierten Ölsäure in die Polyine eindeutig geringer als der von $[9^{-14}\text{C}]$ -(3), was verständlich ist, da Ölsäure im Biosyntheseschema der Polyine vor der Crepissäure steht. Nach diesen Versuchen ist also die Crepissäure (3) wie im Stoffwechsel der Mikroorganismen [6] auch in dem der Pflanzen ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese der Polyine aus Ölsäure. Wieder ist der Einbau der an der cis-Doppelbindung ^3H -markierten Vorstufe in Relation zum Einbau von gleichzeitig verfütterter ^{14}C -markierter Vorstufe bei (13) auffallend gering.

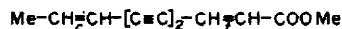
Tabelle 3. Einbau von $[10^{-14}\text{C}, 9,10^{-3}\text{H}_2]$ -Ölsäure-methylester ($[10^{-14}\text{C}, 9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1), $\text{R}' = \text{Me}$, $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 2,51$) und $[9^{-14}\text{C}, 10^{-3}\text{H}]$ -Crepissäure-methylester ($[9^{-14}\text{C}, 10^{-3}\text{H}]$ -(3), $\text{R}' = \text{Me}$, $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 2,2$) in Polyine

Versuchs-Nr.	Fütterungspflanze	Verflütt. Verbindungen (Gesamtakt. [dpm])		Isoliertes Polyin (Menge)	Gesamtakt. des Polyins		Einbau d. verflütt. Verbindungen	
		^3H -mark.	^{14}C -mark.		[dpm ^3H]	[dpm ^{14}C]	^3H -mark. [%]	^{14}C -mark. [%]
VIII	<i>Anacyclus pyrethrum</i>	$[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -(1) $\text{R}' = \text{Me}$ $(1,06 \times 10^9)$	$[10^{-14}\text{C}]$ -(1) $\text{R}' = \text{Me}$ $(4,22 \times 10^8)$	(13) (12,2 μMol)	~41	854	$\sim 7,7 \times 10^{-6}$ *	$2,0 \times 10^{-4}$
IX	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	$[10^{-3}\text{H}]$ -(3) $\text{R}' = \text{Me}$ $(1,21 \times 10^8)$	$[9^{-14}\text{C}]$ -(3) $\text{R}' = \text{Me}$ $(5,50 \times 10^7)$	(13) (116,3 μMol) (26) (170,7 μMol)	657 3070	7130 1370	$5,4 \times 10^{-4}$ $2,5 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2}$ $2,5 \times 10^{-3}$
X	<i>Chrysanthemum serotinum</i> L.	$[10^{-3}\text{H}]$ -(3) $\text{R}' = \text{Me}$ $(1,21 \cdot 10^8)$	$[9^{-14}\text{C}]$ -(3) $\text{R}' = \text{Me}$ $(5,50 \times 10^7)$	(13) (10,5 μMol) (28) (115,4 μMol)	300 8345	1838 3870	$2,5 \times 10^{-4}$ $6,9 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$ $7,0 \times 10^{-3}$
XI	<i>Grindelia robusta</i> Nutt.	$[10^{-3}\text{H}]$ -(3) $\text{R}' = \text{Me}$ $(1,21 \times 10^8)$	$[9^{-14}\text{C}]$ -(3) $\text{R}' = \text{Me}$ $(5,50 \times 10^7)$	(31a,b)† (77,7 μMol)	39600	25150	$3,27 \times 10^{-2}$	$4,57 \times 10^{-2}$

* Bei der Berechnung des Einbaus von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -Ölsäure wurde berücksichtigt, daß der radioaktive Wasserstoff am C-9 bei der biosynthetischen Umwandlung durch Oxydation verloren geht. † Das isolierte Polyin-acetat wurde nach der Verseifung mit dem entsprechenden Polyin-alkohol gemeinsam bestimmt.

mindestens 96% der ^3H -Markierung am C-10 der Ölsäure verloren gehen. Entsprechende Ergebnisse zeigen die Fütterungsversuche mit $[9^{-14}\text{C}, 10^{-3}\text{H}]$ -(3) ($\text{R}' = \text{Me}$) an *Artemisia vulgaris* und *Chrysanthemum serotinum*. Diese Fütterungen zeigen in (13) ein Einbauverhältnis von ^3H -markierter zu ^{14}C -markierter Vorstufe von ca. 1:20 bzw. 1:10. Das Biosyntheseschema für derartige Polyine [1] führt keinen Reaktionsschritt auf, der eine Erklärung für diesen Effekt gibt, dagegen wird die Richtigkeit des Schemas bestätigt durch die Ergebnisse der gleichzeitig isolierten und untersuchten Polyine (26) und (28). Bei diesen Verbindungen wird die ^3H -markierte und die ^{14}C -markierte Vorstufe mit nahezu gleicher Ausbeute inkorporiert. Es ist daher nicht anzunehmen, daß der verminderte Tritiumeinbau in (13) durch einen großen Isotopie-Effekt in der Pflanze verursacht wird.

Das innerhalb dieser Fütterungsreihe aus *Grindelia robusta* isolierte Dihydromatricarianol (31a), vereinigt mit dem Verseifungsprodukt von (31b), weist im Vergleich zum Ergebnis von (13) nur einen geringen Tritiumverlust bei der Bildung aus $[9^{-14}\text{C}, 10^{-3}\text{H}]$ -(3) auf. Die ^3H -Aktivität ist im Vergleich zur ^{14}C -Aktivität nur um ca. 30% vermindert. Früher durchgeführte Fütterungsversuche haben gezeigt, daß der Ester (33) mit hoher Ausbeute in (32) umgewandelt wird [18].



(33)

Es kann daher angenommen werden, daß in Analogie zu (32) der Biosyntheseweg zu (31) ebenfalls über die Oxydationsstufe der Säure am C-1 des C_{10} -Gerüstes führt. Das würde bedeuten, daß im Stoffwechsel vorübergehend ein analoges System wie bei (13) auftreten könnte. Wenn also die Annahme richtig ist, daß die Ursache des ^3H -Verlustes bei (13) und (31) identisch ist und wenn man den Befund berücksichtigt, daß die im Molekül verbliebene ^3H -Radioaktivität in Relation zur ^{14}C -Radioaktivität bei den einzelnen Versuchen unterschied-

lich ist, kann gefolgt werden, daß der ^3H -Verlust auf keine definierte, für den Biosyntheseweg notwendige und unter ^3H -Verlust ablaufende Substitutionsreaktion zurückzuführen ist, sondern möglicherweise nur dann auftritt, wenn sich eine Doppelbindung α,β -ständig zur Carboxylgruppe befindet.

Auch bei den von Sir Ewart Jones kürlich berichteten unter Tritiumverlust ablaufenden Einbauversuchen mit den $[9^{-14}\text{C}, 10^{-3}\text{H}]$ -markierten Estern (1)-(3) in zwei Polyine handelt es sich in beiden Fällen um α,β -ungesättigte Säuren [6].

Zur Klärung dieses Effektes sind jedoch zweifellos weitere Versuche notwendig.

EXPERIMENTELLES

Apparate und allgemeine Arbeitstechniken. UV-Spektren: in Et_2O ; IR-Spektren: in CCl_4 oder CHCl_3 ; NMR-Spektren: in

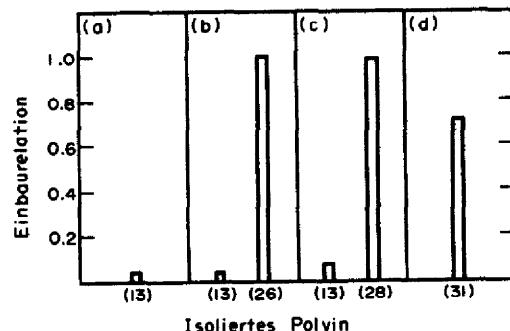


Abb. 3. Prozentualer Einbau von $[9,10^{-3}\text{H}_2]$ -Ölsäure-methylester (a) bzw. $[10^{-3}\text{H}]$ -Crepissäure-methylester (b, c, d) in Relation zum prozentualen Einbau von gleichzeitig verfüttertem $[10^{-14}\text{C}]$ -Ölsäure-methylester (a) bzw. $[9^{-14}\text{C}]$ -Crepissäure-methylester (b, c, d) in Polyine. Berechnung der Einbaurelation wie bei Abb. 1 beschrieben. (a) Fütterung an *Anacyclus pyrethrum* (= Versuch VIII), (b) an *Artemisia vulgaris* (= Versuch IX), (c) an *Chrysanthemum serotinum* (= Versuch X) und (d) an *Grindelia robusta* (= Versuch XI).

Tabelle 4. Experimentelle Angaben zu den Fütterungen

Versuchs-Nr.	Fütterungspflanze	Pflanzenmaterial Aufgearbeiteter Anteil	Menge [g]	Emulsion [ml]	Inkubat.-Zeit [hr]
I	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Wurzeln	350	400	38
II	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Wurzeln	700	300	39
III	<i>Chrysanthemum serotinum</i> L.	Wurzeln	565	300	39
IV	<i>Coreopsis lanceolata</i> L.	Sproß	254	20	49
V	<i>Chrysanthemum flosculosum</i> L.	Sproß	27	10	46
VI	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Wurzeln	514	200	27
VII	<i>Grindelia robusta</i> Nutt.	Sproß	100	20	30
VIII	<i>Anacyclus pyrethrifolius</i> DC.	Wurzeln	90	100	48
IX	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	Wurzeln	540	400	25
X	<i>Chrysanthemum serotinum</i> L.	Wurzeln	300	30	24
XI	<i>Grindelia robusta</i> Nutt.	Sproß	100	60	25

CCl_4 oder CDCl_3 , Varian HA 100 bzw. XL 100 mit TMS als innerem Standard. Massenspektren: AEI MS 9 bzw. Varian MAT 711 (Direkteinlaß, 70 eV). Radioaktivitätsbestimmungen: in Toluol unter Zusatz von Dimethyl-POPOP und PPO (Merck), Beckman-Flüssigkeitsszintillationspektrometer. Bestimmung der Zählausbeuten, markiertes Toluol als innerer Standard. Säulenchromatographien (SC): an Al_2O_3 (schwach sauer, Akt.-St. II oder III) oder Si gel "M", Korngröße 0,2–0,3 mm (Gebrüder Herrmann), als Elutionsmittel Et_2O -Petroläther 30–60° (= $\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$); Dünnenschichtchromatographien (DC) an Si gel PF 254 (E. Merck) mit $\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$ als Laufmittel. Destillationen: im Kugelrohr, angegebene Siedepunkte beziehen sich auf die Temp. des Luftbades. Schmelzpunkte: Mettler FP1-Heiztischmikroskop.

Synthese von trans-[18- ^{14}C]Octadecen-(10)-triin-(12,14,16)-on-(9)-säure-(1)-methylester ([18- ^{14}C]-[17]). Zu einer Lösung aus 17,9 g Aldehyd (18) [19] in 20 ml absol. THF wurde innerhalb 1 hr bei 20° eine Diacetylen-mono-magnesiumbromid-Lösg. (bereitet aus 60 ml einer 1,6 N Diacetylen-Lösg. [20] in absol. THF und 54 ml einer 1,85 N Äthylmagnesiumbromid-Lösg. in absol. Et_2O bei 0°) unter Rühren zugetropft. Nach weiteren 30 min versetzte man mit verd. H_2SO_4 , nahm das Rohprodukt in Et_2O auf und chromatographierte (19) an Si gel (Et_2O -PE 1:5). Ausb.: 24% (19) (bez. auf (18)). 4 g (19) wurden mit 2 g Dihydropyran in Gegenwart von 1 ml äther. 1-proz. Phosphoroxychlorid-Lösg. zu (20) umgesetzt (Ausb. 83%), welches nach SC an Si gel (Et_2O -PE 1:20) mit 7 mMol LiAlH_4 in absol. Et_2O zum 9-[Tetrahydropyranyl-(2)]-äther von (21) reduziert wurde. Anschließend erwärme man das Reaktionsprodukt in 50 ml MeOH unter Zusatz von 1,5 ml konz. H_2SO_4 und 3 ml H_2O auf 50° und erhielt nach SC an Si gel (Et_2O -PE 70:30) in 92-proz. Ausb. (21). 2,7 g (21) in 150 ml absol. THF kochte man mit 1 g LiAlH_4 40 min unter Rückfluß und chromatographierte das Reaktionsprodukt an Si gel (Et_2O -PE 70:30). Nach Kugelrohrdestillation ($K_{p_{0,1}}$ 135°) wurde (22) in 52-proz. Ausb. erhalten. UV:

$\lambda_{\max} = 222 \text{ nm}$; IR: 3610, 3430 (–OH); 3300 (H–C=); 950 (trans–CH=CH–) cm^{-1} ; NMR (τ): 3,77 (dd, J 16 + 5 Hz, –CH₂CH(OH)–); 4,37 (ddd, J 16 + 2,5 + 1 Hz, =C–CH=); 5,88 (m, –CH(OH)–); 6,40 (t, J 6 Hz, –CH₂–OH); 7,13 (d, J 2,5 Hz, H–C≡); 7,78 (s, 2x–OH); 8,66 (m, –(CH₂)₇–); MS (m/e): 210 M⁺; 81 [M – (CH₂)₇–CH₂OH]⁺. 1,2 g (22) löste man in einem Gemisch aus 24 ml Me_2CO und 6 ml H_2O und tropfte unter Eiskühlung und Rühren innerhalb von 4 min eine Chromschwefelsäure-Lösg. (hergestellt aus 1,44 g CrO_3 , 6 ml 12 N H_2SO_4 und 6 ml H_2O) hinzu. Nach weiteren 4 min wurde das Reaktionsprodukt zunächst in Et_2O aufgenommen, (23) über das Natriumsalz (NaHCO_3 -Auszug) und durch Kristallisation aus PE gereinigt. Schmp. 57°, Ausb. 37%. UV: $\lambda_{\max} = 255 \text{ nm}$ ($\epsilon = 11700$); IR: 3320, 2120 (H–C=C–); 1715 (br.) (–COOH, >C=O); 1600, 970 (trans–CH=CH–) cm^{-1} ; NMR (τ): 3,49 (s, trans–CH=CH–); 6,75 (br. H–C=C–); 7,54 (t, J 7 Hz, –CO–CH₂–); 7,71 (t, J 7 Hz, –CH₂–COOH); 8,3–8,8 (m, –(CH₂)₅–). 400 mg (23) wurden in 3 ml MeOH mit NaBH_4 reduziert und anschließend das gewonnene Rohprodukt in MeOH mit CH_2N_2 verestert. SC an Si gel (Et_2O -PE 1:5) ergab (24) (Ausb.: 72%). 120 mg (24) löste man in einem Gemisch aus 0,75 ml MeOH und 0,75 ml THF und gab nacheinander 2,5 mg $\text{Cu}_2\text{Cl}_{2\cdot}$, 25 mg $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 0,2 ml DMF und 0,3 ml 50-proz. Äthylamin-Lösg. hinzu. Unter Eiskühlung und in einer N_2 -Atmosphäre wurden innerhalb 1 hr 72 mg 1-Brom-[5- ^{14}C]pentadiin-(1,3) (hergestellt aus [5- ^{14}C]Pentadiin-(1,3) [21] in Et_2O und kalter Natriumhypobromit-Lösg. [22]) in 1,5 ml eines Gemisches MeOH-THF (1:1) unter Röhren zugetropft. Nach 1-stünd. Röhren bei 20° nahm man in Et_2O auf und chromatographierte (25) an Si gel (Et_2O -PE 1:2), Schmp. 77,5°, Ausb.: 29%, 43 mg (25) in 5 ml Et_2O wurden mit aktivem Braunstein bei 20° bis zur Vollständigkeit der Reaktion gerührt. Ausb.: 98% [18- ^{14}C]-[17], Schmp. 84,5°. UV: $\lambda_{\max} = 349$; 324,5; 304; 286; 259,5; 249,5 nm ($\epsilon = 16900$; 21200; 14400; 8100; 50000; 40500), IR: 2210 (–C=CJ₃–); 1750 (–COOME); 1680 (>C=O); 1580, 950 (trans–CH=CH–) cm^{-1} . NMR (τ): 3,37 (s, trans–CH=CH–); 6,35 (s, –OMe); 7,48 (t, J 7 Hz, –CO–CH₂–); 7,7 (t, J 7 Hz, –CH₂–COOR); 7,99 (s, $H_3\text{C}-\text{C}\equiv$); 8,5 (m, –(CH₂)₅–). MS (m/e): 298 M⁺; 267 [M – OMe]⁺; 156 $\text{Me}-(\text{C}\equiv\text{C})_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{OH})=\text{CH}_2$ ⁺ (McLaff.); 142 [$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOME}$]⁺ (McLaff.); 141 [M – (CH₂)₇–]

* Synthese und Fütterungsversuch von [18- ^{14}C]-[17] wurden durchgeführt von Hans Hummel, Diplomarbeit, Techn. Universität Berlin 1967.

$\text{COOMe}]^+$; 111 [$\text{M} - (\text{Me}-[\text{C}\equiv\text{C}]_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{OH})=\text{CH}_2-\text{OMe})]^+$.

Fütterungsversuche. Es wurden folgende Substanzen verfüttert: [$^{18-14}\text{C}$]-**(17)**, spezif. Akt. $1,4 \cdot 10^9$ dpm/mMol; [$9,10^{-3}\text{H}_2$]-**(7)**, spezif. Akt. $2,2 \cdot 10^9$ dpm/mMol*; [$^{16-14}\text{C}$]-**(8)** [**9**], spezif. Akt. $7,4 \cdot 10^8$ dpm/mMol; [$9,10^{-3}\text{H}_2$]-**(1)** ($\text{R}' = \text{H}$) [**4**], spezif. Akt. $2,16 \cdot 10^{11}$ dpm/mMol; [$9,10^{-3}\text{H}_2$]-**(1)** ($\text{R}' = \text{Me}$) [**4**], spezif. Akt. $7,55 \cdot 10^{11}$ dpm/mMol; [$^{10-14}\text{C}$]-**(1)** ($\text{R}' = \text{Me}$), spezif. Akt. $6,7 \cdot 10^9$ dpm/mMol; [10^{-3}H]-**(3)** ($\text{R}' = \text{Me}$) [**23**], spezif. Akt. $1,144 \cdot 10^{10}$ dpm/mMol; [$^{19-14}\text{C}$]-**(3)** ($\text{R}' = \text{Me}$) [**23**], spezif. Akt. $4,4 \times 10^{10}$ dpm/mMol. Die betreffenden Fütterungssubstanzen wurden in Leitungswasser unter Zusatz von Saccharose-monostearat (1 mg pro 100 ml) mit dem "Ultra Turrax" (Fa. Janke u. Kunkel) emulgiert und in diese Emulsionen entweder intakte Pflanzen (bei anschließender Aufarbeitung der Wurzel) oder Sproßteile (bei Aufarbeitung des Sprosses) unter normalen Raumbedingungen eingestellt. In der Regel waren die Emulsionen nach 12 hr aufgenommen und bis zum Versuchsende wurde Wasser nachgegeben. Danach wurden die betreffenden Pflanzenteile zerkleinert und bei 20° dreimal jeweils ca 24 hr mit Et_2O extrahiert. Die erhaltenen Extrakte trennte man zunächst durch SC (Al_2O_3) und anschließend weiter durch präparative DC in die einzelnen Polyne auf [**1**]. Polynacetate (**(27b)**; (**31b**); (**32b**)) wurden zunächst in MeOH (10 ml) durch Röhren mit 5 ml 15-proz. KOH für 2 min bei 55° verseift, die entstandenen Alkohole chromatographiert und mit den jeweils isolierten entsprechenden Alkoholen (**(27a)**, (**31a**), (**32a**)) desselben Fütterungsversuches vereinigt. Die isolierten Polyne wurden bis zur konstanten spezif. Aktivität aus Et_2O -PE kristallisiert, gegebenenfalls wurde wegen sehr geringer Polymenngabe vor dem Kristallisieren mit inaktivem Material definiert verdünnt. Die bereits bekannten Substanzen [**1**] wurden durch Vergleich ihrer UV-, IR-, NMR-Spektren und ihrer Wanderungsgeschwindigkeiten bei der DC mit denen authentischer Proben identifiziert und durch ihre Schmelzpunkte [**1**] auf Reinheit kontrolliert. Die Mengenangaben der isolierten Polyne beziehen sich auf UV-spektroskopisch ermittelte Werte [**1**]. Die experimentellen Angaben der Fütterungen sind in Tabelle 4 zusammengestellt, die Fütterungsergebnisse in den Tabellen 1-3.

Anerkennungen—Sir Ewart R. H. Jones sei vielmals für die Überlassung von radioaktiv-markiertem (**3**) gedankt. Herrn

* Dargestellt von Joachim Laser, unveröffentlicht, analog nach Vorschriften für die Synthese von [$^{18-14}\text{C}$]-**(7)** [**9**].

Prof. Dr. F. Bohlmann danken wir für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung und für wertvolle Diskussion bei der Zusammenstellung dieser Arbeit.

LITERATUR

- Bohlmann, F., Burkhardt, T. and Zdero, C. (1973) *Naturally Occurring Acetylenes*, Academic Press, New York.
- Bu'Lock, J. D. and Smith, G. N. (1967) *J. Chem. Soc. (C)* 332.
- Haigh, W. G. and James, A. T. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **137**, 391.
- Bohlmann, F., Jente, R., Lucas, W., Laser, J. und Schulz, H. (1967) *Chem. Ber.* **100**, 3183.
- Barley, G. C., Day, A. C., Graf, U., Jones, Sir Ewart R. H.; O'Neill, I., Tachikawa, R., Thaller, V. and Vere Hodge, R. A. (1971) *J. Chem. Soc. (C)* 3308.
- Jones, Sir Ewart R. H., Thaller, V. and Turner, J. L. (1975) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 424.
- Bohlmann, F. und Schulz, H. (1968) *Tetrahedron Letters* 1801.
- Bohlmann, F. und Weber, D. (1973) *Chem. Ber.* **106**, 3020.
- Bohlmann, F., Jente, R. und Reinecke, R. (1969) *Chem. Ber.* **102**, 3283.
- Bohlmann, F., Lucas, W., Laser, J. und Bonnet, P.-H. (1968) *Chem. Ber.* **101**, 1176.
- Reinecke, R. (1968) Dissertation Techn. Univ. Berlin.
- Bohlmann, F. und Thefeld, W. (1969) *Chem. Ber.* **102**, 1698.
- Dehmel, G. (1967) Dissertation Techn. Univ. Berlin.
- Bohlmann, F., v. Kap-herr, W., Jente, R. und Grau, G. (1966) *Chem. Ber.* **99**, 2091.
- Jente, R. (1968) Dissertation Techn. Univ. Berlin.
- Sprecher, H. W., Maier, R., Barber, M. and Holman, R. T. (1965) *Biochemistry* **4**, 1856.
- Bohlmann, F. und Mitarbeiter, unveröffentlicht.
- Bohlmann, F., Thefeld, W. und Zdero, C. (1970) *Chem. Ber.* **103**, 2245.
- Noller, C. R. and Adams, R. (1926) *J. Am. Chem. Soc.* **48**, 1074.
- Armitage, J. B., Jones, E. R. H. and Whiting, M. C. (1951) *J. Chem. Soc. (London)* 44.
- Bohlmann, F. und Laser, J. (1966) *Chem. Ber.* **99**, 1834.
- Bohlmann, F. und Herbst, P. (1958) *Chem. Ber.* **91**, 1631.
- Barley, G. C., Jones, Sir Ewart R. H., Thaller, V. and Vere Hodge, R. A. (1973) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 151.