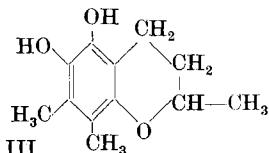


zwischen β -Tocopherol und d,l -5,8-Dimethyl-tocol einerseits und γ -Tocopherol und d,l -7,8-Dimethyl-tocol andererseits.

Da der besprochene Farbtest für die 3 natürlichen Tocopherole verschieden stark ausfällt, ergeben sich beim Vorliegen von Mischungen unübersichtliche Verhältnisse, welche die Verwendbarkeit dieser Bestimmungsmethode weiter beschränken. So liefert, wie wir sahen, γ -Tocopherol, das nur ca. $\frac{1}{3}$ der biologischen Aktivität des α -Tocopherols besitzt, eine Farbreaktion, die wesentlich stärker als diejenige des α -Tocopherols ist.

Schliesslich beschreiben wir hier noch das Reduktionsprodukt des roten 2,7,8-Trimethyl-chroman-o-chinons-(5,6), das 2,7,8-Trimethyl-5,6-dioxychroman (Formel III), das man aus dem entsprechen-



den o-Chinon durch Reduktion mit Natriumdithionit in wässrig-alkoholischer Lösung leicht erhält. Nach dem Ausziehen mit Äther wird die Verbindung aus einem Gemisch von Äther und Petroläther umkristallisiert. Farblose Nadeln, Smp. 141°. Mit Eisen(III)-chlorid grüne Farbreaktion wie andere Brenzcatechinderivate; wirkt stark reduzierend.

$C_{12}H_{16}O_3$ Ber. C 69,19 H 7,75%
Gef. „ 68,84 „ 7,78%

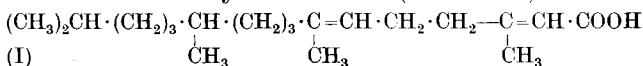
Zürich, Chemisches Institut der Universität.

40. $\Delta^{2,6}$ -Phytadiensäure nebst Beobachtungen über enzymatische Dehydrierbarkeit von Phytan-, Phyten- und Phytadiensäure

von P. Karrer und H. Koenig.

(13. III. 41.)

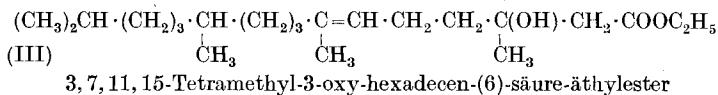
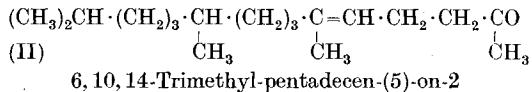
Für Phytansäure und Phytenäsäure sind vor einem Jahr neue Synthesen mitgeteilt worden¹⁾. In ähnlicher Weise haben wir die bisher unbekannte $\Delta^{2,6}$ -Phytadiensäure (Formel I)



dargestellt. Ausgangsmaterial dafür ist das ungesättigte Keton (II). Dieses unterwirft man der Reformatsky-Synthese mit Bromessigester und verkupfertem Zink, die zum Oxysäure-ester (III) führt. In diesem wird die Hydroxylgruppe durch Brom ersetzt und hierauf

¹⁾ P. Karrer, A. Epprecht und H. Koenig, Helv. 23, 272 (1940).

der Brom-carbonsäure-ester durch Kalilauge in die $\Delta^{2,6}$ -Phytadiensäure übergeführt.



$\Delta^{2,6}$ -Phytadiensäure ist bei Zimmertemperatur eine farblose, mässig bewegliche Flüssigkeit. Sdp._{0,25 mm} = 164°; d₄¹⁴ = 0,9024. Als eine Verbindung der Phytolreihe besitzt sie einiges Interesse.

Nach neueren Untersuchungen von *O. St. A. Lang*¹⁾ können höhere Fettsäuren durch ein in der Leber und Muskulatur vorkommendes Fermentsystem dehydriert werden. Wir haben deshalb geprüft, ob auch die stark verzweigten Carbonsäuren: Phytansäure, Phytensäure und Phytadiensäure einer enzymatischen Dehydrierung unterliegen. Als Methodik wurde einerseits der *Thunberg*-Versuch mit Methylenblau als Dehydrierungsmittel, andererseits die Sauerstoffabsorption im *Warburg*-Apparat gewählt. In beiden Versuchsanordnungen zeigten sowohl Phytansäure als auch Phytensäure und Phytadiensäure Reduktionswirkung, wenn man die Leber- und Muskel-fermentlösung nach dem Vorschlag von *Lang* aktivierte, was wir durch etwas Adenosin-triphosphorsäure oder Inosinsäure erreichten. Welche Dehydrierungsprodukte dabei entstehen, wurde bisher nicht ermittelt.

Experimenteller Teil.

22 g 6,10,14-Trimethyl-pentadecen-(5)-on-2 (II) wurden mit 12,5 g Bromessigester (2 Mol) und 20 g verkupfertem Zink in 80 cm³ trockenem Toluol auf dem Wasserbad erwärmt, bis die Reaktion in Gang kam. Nach deren Abklingen wurde die Flüssigkeit noch 2 Stunden im Ölbad am Rückfluss auf 120° erwärmt. Nach dem Erkalten schüttelte man das grünbraune Gemisch dreimal mit 2-n. Essigsäure und hierauf die braune Toluollösung mit Wasser bis zur neutralen Reaktion aus. Die Toluolschicht wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Dabei blieb ein dunkelbraunes Öl mit jonenartigem Geruch zurück. Das rohe Produkt haben wir der Destillation im Hochvakuum unterworfen und dabei den 3,7,11,15-Tetramethyl-3-oxy-hexadecen-(6)-säure-äthylester (III) als fast farbloses Öl vom Sdp._{0,7 mm} 169—170° erhalten. Ausbeute 28 g Oxysäure-ester.

Zwecks Ersetzung der Hydroxylgruppe durch Brom wurden 28 g Oxysäure-ester mit 23 g Phosphortribromid in 80 cm³ absolutem

¹⁾ Z. physiol. Ch. 261, 240, 249 (1939); 262, 120, 123 (1940).

Petroläther zuerst 2 Stunden stehen gelassen und dann noch 2 Stunden im Ölbad am Rückfluss auf 60° erwärmt. Beim Erwärmen entwichen dichte Bromwasserstoff-Nebel dem Reaktionsgemisch, das sich langsam trübte.

Nach dem Erkalten wurde die Reaktionsmasse in kaltes Wasser gegossen, etwas Petroläther zugesetzt und mit Wasser 5 mal ausgewaschen. Die hiebei entstehenden Emulsionen liessen sich durch Alkoholzusatz beseitigen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde die Petrolätherlösung filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum verjagt, wobei der rohe 3,7,11,15-Tetramethyl-3-brom-hexadecen-(6)-säure-äthylester zurückblieb.

Dieser Brom-carbonsäure-ester wurde mit 30 cm³ 5-proz. äthanolischer Kalilauge 2 Stunden auf 80° erhitzt und die Reaktionsmischung nach dem Erkalten in Wasser gegossen, die Flüssigkeit mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther viermal extrahiert. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat dampfte man die Ätherlösung im Vakuum zur Trockne ein. Das so erhaltene Reaktionsprodukt erwies sich als bromfrei, war aber nicht einheitlich, indem es sich zum kleineren Teil aus Δ^{2,6}-Phytadiensäure, zum grösseren Teil aus deren Äthylester zusammensetzte. Darum wurde es einem zweiten Verseifungsprozess mit wässriger Natronlauge unterworfen.

Wir haben 16 g der Verbindung mit 100 cm³ wässriger 2-n. Na-tronlauge und 10 cm³ Alkohol im Rundkolben 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt und am Schluss noch 1 Stunde auf 80° erwärmt. Nach dem Erkalten schwammen dichte, seifenartige Flocken an der Oberfläche. Hierauf wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther viermal extrahiert, die ätherische Schicht getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Die anschliessende Destillation im Hochvakuum lieferte nach einem kleinen Vorlauf die Δ^{2,6}-Phytadiensäure als farbloses Öl, das unter 0,07 mm Druck bei 152—156° überging und bei der zweiten Destillation unter 0,25 mm konstant bei 164° sott. Ausbeute 13 g.

Die potentiometrische Titration führte zum Mol.-Gew. 318,0 (berechnet 308,4).

C ₂₀ H ₃₆ O ₂	Ber. C 77,82	H 11,80%
	Gef. „ 78,09; 77,69	„ 11,73; 11,71%

Fermentative Dehydrierung von Phytan-, Phyten- und Phytadiensäure.

1. Allgemeine Versuchstechnik.

Bei den Versuchen mit Thunberg-Röhren wurden immer folgende Ansätze zusammengestellt:

1 cm³ Leber- oder Muskelextrakt¹⁾ in 0,05-m. Phosphatpuffer p_H = 8,0 als Dehydrase-lösung,

¹⁾ Hergestellt nach O. St. A. Lang, Z. physiol. Ch. 261, 240 (1939).

1 cm³ Kaliumsalz der betr. Säure in 0,01-m. Verdünnung,

0,1 cm³ Codehydralösung = 50 γ

(Adenosin-triphosphorsaures Barium oder Inosinsaures Barium),

0,2 cm³ Methylenblaulösung 1 : 5000.

Bei den Blindversuchen haben wir das entsprechende Volumen durch Zugabe von destilliertem Wasser ergänzt.

Die Versuchstemperatur betrug konstant 39,0°.

2. Versuche mit der Thunberg-Methodik.

a) Kaliumphytanat:

Zusammensetzung	Entfärbungszeit
Phytanat + Leberextrakt + Adenos. tr.* + Methylenblau . . .	22'
Phytanat + Leberextrakt + Inosinsäure + Methylenblau . . .	24'
Phytanat + Muskelextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau . . .	16'
Phytanat + Muskelextrakt + Inosinsäure + Methylenblau . . .	21'
Blindversuche :	
H ₂ O + Leberextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau	69'
H ₂ O + Leberextrakt + Inosinsäure + Methylenblau	69'
H ₂ O + Muskelextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau	77'
H ₂ O + Muskelextrakt + Inosinsäure + Methylenblau	78'
Phytanat + Leberextrakt + Methylenblau	21'
Phytanat + Muskelextrakt + Methylenblau	19'
Phytanat + H ₂ O + Methylenblau	keine Entfärbung binnen 160'
Phytanat + H ₂ O + Adenos. tr. + Methylenblau	, 160'
Phytanat + H ₂ O + Inosinsäure + Methylenblau	, 160'

*) Adenos. tr. = Adenosin-triphosphorsaures Barium.

b) Kaliumphytenat :

Zusammensetzung	Entfärbungszeit
Phytenat + Leberextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau . . .	6'
Phytenat + Leberextrakt + Inosinsäure + Methylenblau . . .	8'
Phytenat + Muskelextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau . . .	18'
Phytenat + Muskelextrakt + Inosinsäure + Methylenblau . . .	15'
Blindversuch :	
H ₂ O + Leberextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau	69'
H ₂ O + Leberextrakt + Inosinsäure + Methylenblau	69'
H ₂ O + Muskelextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau	77'
H ₂ O + Muskelextrakt + Inosinsäure + Methylenblau	78'
Phytenat + Leberextrakt + Methylenblau	20'
Phytenat + Muskelextrakt + Methylenblau	19'
Phytenat + H ₂ O + Methylenblau	keine Entfärbung binnen 160'
Phytenat + H ₂ O + Adenos. tr. + Methylenblau	, 160'
Phytenat + H ₂ O + Inosinsäure + Methylenblau	, 160'

c) Kaliumphytadienat:

Zusammensetzung	Entfärbungszeit
Phytadienat + Leberextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau	5'
Phytadienat + Leberextrakt + Inosinsäure + Methylenblau	8'
Phytadienat + Muskelextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau	9'
Phytadienat + Muskelextrakt + Inosinsäure + Methylenblau	8'
Blindversuch :	
$H_2O + Leberextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau$	69'
$H_2O + Leberextrakt + Inosinsäure + Methylenblau$	69'
$H_2O + Muskelextrakt + Adenos. tr. + Methylenblau$	77'
$H_2O + Muskelextrakt + Inosinsäure + Methylenblau$	78'
Phytadienat + Leberextrakt + Methylenblau	20'
Phytadienat + Muskelextrakt + Methylenblau	19'
Phytadienat + $H_2O + Methylenblau$	keine Entfärbung binnen 160'
Phytadienat + $H_2O + Adenos. tr. + Methylenblau$.. 160'
Phytadienat + $H_2O + Inosinsäure + Methylenblau$.. 160'

Diese 3 Versuche wurden innerhalb eines Zeitintervalls von 28 Stunden durchgeführt.

3. Versuche in der Warburg-Apparatur.

Allgemeine Versuchstechnik: Die Versuche im Warburg-Apparat wurden alle mit einem frischen Extrakt aus Rattenmuskulatur ausgeführt. In den Seitenansätzen der Warburg-Gefässe befanden sich 5 Tropfen 30-proz. Kalilauge. Wir haben festgestellt, dass ein Zusatz von 5 Tropfen Methylenblaulösung (1 : 5000) keinen Einfluss auf die verbrauchte Menge Sauerstoff und auch keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reaktion ausübte, weshalb alle folgenden Versuche ohne Zusatz von Methylenblau gemacht wurden.

Eine Versuchslösung setzte sich zusammen aus:

- 2,0 cm³ 0,01-m. Kaliumsalzlösung der betr. Säure,
- 2,0 cm³ Muskelextrakt in 0,05-m. Phosphatpuffer $p_H = 8,0$,
- 0,2 cm³ Inosinsaures Barium = 100 γ
- 5 Tropfen 30-proz. KOH im Seitenansatz.

Bei den Blindversuchen wurde der Volumenausgleich durch Zufüge der entsprechenden Menge destillierten Wassers geschaffen. Die Warburg-Gefässe (ohne Kipp-Einrichtung) wurden stets am gleichen Manometer verwendet, mit Gummibändern gesichert und vor dem Versuch während 5 Minuten mit Sauerstoff durchströmt, dann in den Thermostaten eingesetzt und nach dem Anwärmen (5—8') mit dem Versuch begonnen. Die Thermostatentemperatur betrug 39,0°.

a) Kaliumphytanat: Die Zahlen bedeuten Volumabnahme in mm³.

Reaktions-dauer	Phytanat Muskelextr. Inosinsäure KOH	H ₂ O Muskelextr. Inosinsäure KOH	H ₂ O Muskelextr. H ₂ O KOH	H ₂ O H ₂ O Inosinsäure KOH	Phytanat H ₂ O H ₂ O KOH
0	0	0	0	0	0
30'	0,4	0	0	0	0
60'	0,8	0,1	0,1	0	0
90'	1,2	0,2	0,1	0,1	0
120'	1,7	0,4	0,2	0,1	0
150'	2,1	0,5	0,2	0,1	0
180'	2,5	0,6	0,3	0,2	0
210'	2,7	0,8	0,4	0,2	0
340'	3,2	1,5	1,0	0,4	0

b) Kaliumphytenat:

Reaktions-dauer	Phytenat Muskelextr. Inosinsäure KOH	H ₂ O Muskelextr. H ₂ O KOH	
0	0	0	
30'	0,1	0	
60'	0,4	0,2	
90'	0,8	0,3	
120'	1,2	0,5	
150'	1,5	0,6	
180'	1,8	0,7	
210'	1,9	0,8	
340'	2,5	1,6	

die 3 andern Blindversuche
zeigten gleiche Resultate
wie oben unter a)

c) Kaliumphytadienat:

Reaktions-dauer	Phytadienat Muskelextr. Inosinsäure KOH	H ₂ O Muskelextr. H ₂ O KOH	H ₂ O Muskelextr. Inosinsäure KOH	
0	0	0	0	
30'	0,2	0	0,1	
165'	0,8	0,2	0,3	
195'	0,9	0,2	0,3	
255'	1,3	0,3	0,4	
315'	1,8	0,4	0,7	

Phytadienat und
Inosinsäure allein
zeigten gleiche
Werte wie unter a)