

Untersuchungen zur Biogenese der Indolalkaloide. Synthese und Verfütterung radioaktiv markierter Monoterpenaldehyde

Alan R. Battersby^a, Mervyn Thompson^a, Karl-Heinz Glüsenkamp^b und
Lutz-F. Tietze^{*b}

University Chemical Laboratory^a, Lensfield Road,
Cambridge CB2 1EW, England, und

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen^b,
Tammannstraße 2, D-3400 Göttingen

Eingegangen am 27. Februar 1981

Durch Oxidation von Citral (**8a/b**) mit Selendioxid wurden unter verschiedenen Reaktionsbedingungen die Hydroxyaldehyde **4a/b** und die Dialdehyde **5a/b** erhalten. Reduktion von **5a/b** mit Kaliumborhydrid in Gegenwart von LiCl lieferte die Hydroxyaldehyde **4c/d**. Fütterungsversuche mit den tritiierten Verbindungen **4a–d** und **5a/b** an *Catharanthus roseus* G. Don ergaben mit sehr großer Wahrscheinlichkeit, daß **4a/b** und **4c/d** sowie **5a/b** Biogenesevorstufen von Secologanin (**3**) und den Indolalkaloiden der Corynanthe-, Aspidosperma- und Iboga-Gruppe sind.

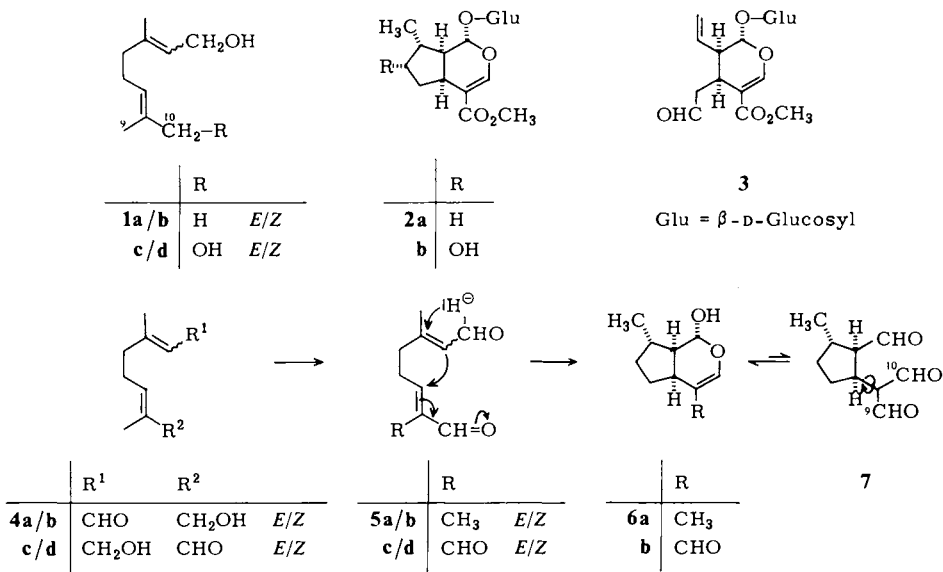
Investigations of the Biosynthesis of Indole Alkaloids.

Feeding Experiments with Synthetic Radioactively Labelled Monoterpene Aldehydes

Oxidation of citral (**8a/b**) with selenium dioxide using different reaction conditions gave the hydroxy aldehydes **4a/b** and the dialdehydes **5a/b**. Reduction of **5a/b** with potassium borohydride in the presence of LiCl led to the hydroxy aldehydes **4c/d**. Feeding experiments with the corresponding tritiated compounds **4a–d** and **5a/b** to *Catharanthus roseus* G. Don indicate that **4a/b**, **4c/d**, and **5a/b** are biogenetic precursors of secologanin (**3**) and the indole alkaloids of the Corynanthe, Aspidosperma, and Iboga type.

Die Indolalkaloide vom Typ Corynanthe, Aspidosperma Iboga¹⁾, die Ipecacuanha-²⁾, Cinchona-³⁾ sowie Pyrrolochinolinalkaloide⁴⁾ werden in der Natur durch Kondensation einer Aminosäure bzw. eines biogenenamins mit dem Monoterpenglycosid Secologanin⁵⁾ (**3**) und nachfolgende Umwandlungen gebildet. Als Vorstufen bei der Biosynthese von **3** konnten Geraniol (**1a**), Nerol (**1b**), 10-Hydroxygeraniol (**1c**) und 10-Hydroxynерol (**1d**)^{6,7)} sowie Desoxyloganin (**2a**)⁸⁾ und Loganin (**2b**)¹⁾ nachgewiesen werden. Die Art der Bildung des Cyclopenta[c]pyran-Systems in **2a** ist bisher noch nicht bekannt. Man muß jedoch annehmen, daß hierbei primär eine Oxidation von **1c** bzw. **1d** erfolgt. Als mögliche Zwischenstufen lassen sich die isomeren Hydroxyaldehyde **4a/b** und **4c/d** sowie die Dialdehyde **5a/b** und Trialdehyde **5c/d** formulieren. Eine reduktive Cyclisierung von **5c/d** nach Art einer Michael-Addition würde in der ange deuteten Weise zu der Cyclopenta[c]pyran-Verbindung **6b** führen⁶⁾. **6b** befindet sich

im Gleichgewicht mit **7**, in dem C-9 und C-10 gleichwertig sind. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Befund, daß im Laufe der Biogenese von Secologanin (**3**) eine Äquilibrierung von C-9 und C-10 in **1c/d** erfolgt^{1,6)}.



In dieser Arbeit beschreiben wir nun die Synthese und Verfüterung der markierten Hydroxyaldehyde **4a/b** und **4c/d** sowie der Dialdehyde **5a/b**.

Synthese der Hydroxyaldehyde **4a/b** und **4c/d** sowie der Dialdehyde **5a/b**

Die Darstellung der Dialdehyde **5a/b** gelang durch Oxidation von käuflichem Citral (**8a/b**) (64% Geranial und 36% Neral) mit einem Überschuß an Selendioxid in siedendem Ethanol mit 38% Ausbeute. Als Nebenprodukte erhielt man zu etwa 3% die Hydroxyaldehyde **4a** und **4b**, die jedoch durch fraktionierte Destillation abgetrennt werden konnten. Gaschromatographische Untersuchungen von **5a/b** ergaben einen Reinheitsgrad von ca. 99%. Führt man die Oxidation von **8a/b** mit nur äquimolaren Mengen an Selendioxid durch, so erhielt man neben nicht umgesetzter Ausgangsverbindung **8a/b** und 10% **5a/b** die Hydroxyaldehyde **4a/b** mit 15% Ausbeute. Die Abtrennung erfolgte hierbei durch Chromatographie an Kieselgel.

Das Verhältnis von *E*- und *Z*-Isomeren im eingesetzten Gemisch änderte sich während der Reaktion nicht. Es sollte daher möglich sein, durch Oxidation von **8a** bzw. **8b** die reinen Isomeren **4a** bzw. **4b** und **5a** bzw. **5b** herzustellen. Im vorliegenden Fall wurde jedoch darauf verzichtet.

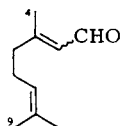
Die Umsetzung von **8a/b** mit Selendioxid verläuft stereoselektiv ausschließlich unter Oxidation der Methylgruppe mit *E*-Konfiguration an der stärker nucleophilen olefinischen Doppelbindung. Ein an C-4 oder C-9 oxidiertes Produkt konnte nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen von *Büchi*⁹⁾ und *Rapoport*¹⁰⁾.

Zur Synthese von **4c/d** wurde das Gemisch der Dialdehyde **5a/b** mit Kaliumborhydrid in Dioxan/Isopropylalkohol in Gegenwart von Lithiumchlorid¹¹⁾ und acetatgepuffertem Ionenaustauscher¹²⁾ reduziert. Nach 4 Stunden erhielt man neben nicht umgesetzter Ausgangsverbindung **5a/b** ausschließlich die Hydroxyaldehyde **4c/d**. Diese Selektivität der Reduktion ist möglicherweise auf die geringere sterische Hinderung der C-1-Carbonylgruppe zurückzuführen. Verlängert man die Reaktionszeit, so findet man zusätzlich die Dihydroxy-Verbindungen **1c/d**, die nach 40 Stunden als einziges Produkt isoliert werden. Zur Reindarstellung von **4c/d** wurde nach 15 Stunden chromatographisch aufgetrennt und im Vakuum destilliert.

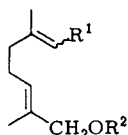
Versuche, die Hydroxyaldehyde **4a/b** durch selektive Oxidation von **1a/b** zu erhalten, blieben dagegen ohne Erfolg. Umsetzung mit Mangandioxid^{13,14)} ergab neben den Dialdehyden **5a/b** stets nur ein Gemisch der Hydroxyaldehyde **4a/b** und **4c/d**, das chromatographisch nicht aufgetrennt werden konnte.

Diskussion der spektroskopischen Daten

Konstitution und Konfiguration der einzelnen Verbindungen sind spektroskopisch abgesichert. In den IR-Spektren findet man die Absorption für die α,β -ungesättigten Carbonyl-Gruppen bei 1680 cm^{-1} . Die Massenspektren von **4a/b**, **4c/d** und **5a/b** zeigen die Molekül-Ionen $m/e = 168$, 168 und 166 sowie als Basispeak das Fragment $m/e = 84$, das durch Spaltung in Allylstellung gebildet wird. Besonders aufschlußreich zur Bestimmung der Konfiguration waren die ¹H-NMR-Spektren. So findet man die Signale der C-1-Aldehydprotonen der Verbindungen mit *E*-Konfiguration **4a** und **5a** bei tieferem Feld als die der Isomeren **4b** und **5b**¹⁵⁾. Eine noch bessere Unterscheidung ermöglichten die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der 3-Methylgruppen. Die 4-H-Signale liegen in **4a** bzw. **5a** bei $\delta = 2.16$ bzw. 2.20 und in **4b** bzw. **5b** bei $\delta = 2.00$ bzw. 2.01 . Diese Daten stehen in guter Übereinstimmung mit den von *Jackman*¹⁶⁾ gefundenen Ergebnissen über die Anisotropie-Effekte durch β -Aldehydgruppen. Auch zur Konfigurationsbestimmung von **4c** und **4d** lassen sich solche Effekte heranziehen. Da hier jedoch die Unterschiede sehr viel geringer sind¹⁷⁾ und zudem Überlappung durch andere Signale vorliegt, wurde durch Oxidation mit Mangandioxid in die Dialdehyde **5a** und **5b** übergeführt. Eine Änderung der Konfiguration sollte hierbei nicht auftreten¹⁸⁾.



8a/b: *E/Z*



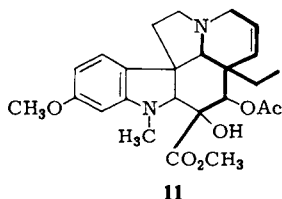
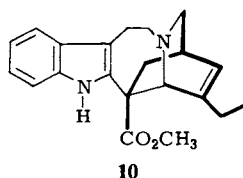
	R ¹	R ²	
9a/b	CHO	Ac	<i>E/Z</i>
c/d	CH ₂ OH	Ac	<i>E/Z</i>

Zur Konfigurationsbestimmung der C-7,8-Doppelbindung in **4c**, **4d**, **5a** und **5b** läßt sich das Signal des Vinylprotons nicht benutzen. Man findet hier jedoch charakteristische Unterschiede in den Absorptionen der Aldehydprotonen¹⁹⁾. Aufgrund der Singulets für 10-H bei $\delta = 9.38$ läßt sich diesen Verbindungen eindeutig die *E*-Konfiguration an der C-7,8-Doppelbindung zuordnen. Bei Vorliegen der *Z*-Konfiguration sollte man Signale bei $\delta = 10.1$ finden¹⁹⁾.

Markierung von **4a/b**, **4c/d** und **5a/b** mit dem Radioisotop ^3H und Fütterungsversuche

Reduktion der Dialdehyde **5a/b** mit einem Überschuß an ^3H Kaliumborhydrid (100 mC ^3H) in der bereits beschriebenen Form ergab ein Gemisch von $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4c/d}$ und $[1,10\text{-}^3\text{H}_1]\text{-1c/d}$, das durch Schichtchromatographie an Kieselgel aufgetrennt wurde. Oxidation von $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4c/d}$ mit Mangandioxid¹³⁾ führte zu den an C-1 spezifisch markierten Dialdehyden $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-5a/b}$. Zur Synthese von $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4a/b}$ verwendeten wir die inaktiven Hydroxyaldehyde **4a/b**. Die primäre Hydroxygruppe wurde durch Veresterung mit Acetanhydrid in Pyridin zu **9a/b** geschützt. Nachfolgende Reduktion mit ^3H Kaliumborhydrid (100 mC ^3H) zu $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-9c/d}$ und Oxidation mit Mangandioxid ergaben $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-9a/b}$, das durch Solvolyse mit Bariumhydroxid in wasserfreiem Methanol die gewünschte Verbindung $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4a/b}$ lieferte. Der Verlauf der Reduktion und Esterspaltung wurde schichtchromatographisch verfolgt. Dies war notwendig, da bei zu langen Reaktionszeiten im ersteren Fall eine partielle Spaltung der Acetatgruppe und im letzteren Fall die Bildung von Kondensationsprodukten beobachtet wurde.

Die Applikation der markierten Verbindungen erfolgte durch hydroponische Verfütterung an blühende Zweige junger *Catharanthus roseus* G. Don-Pflanzen. Verwendet wurden Lösungen von je 5 mg von $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4a/b}$, -4c/d und -5a/b in wäßrigem „Tween 80“ bzw. einem „Tween 80“/Dimethylsulfoxid-Gemisch. Die Aufarbeitung der Pflanzenmaterialien erfolgte nach 72 Stunden unter Zugabe der inaktiven Trägersubstanzen Loganin (**2b**), Catharanthin (**10**) und Vindolin (**11**), die man nach Rückisolierung bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisierte. Loganin wurde außerdem noch in das Pentaacetat übergeführt und der Verlust an Radioaktivität gemessen.



Die Ergebnisse der Verfütterung sind in Tab. 1 wiedergegeben. Die Zahlen sind entsprechend einem 50proz. Verlust von Tritium an C-1 in den $[1\text{-}^3\text{H}_1]$ -markierten Verbindungen korrigiert. Aus den Daten geht hervor, daß die Einbauraten der Hydroxyaldehyde **4a/b** und **4c/d** sowie der Dialdehyde **5a/b** vergleichbar bzw. höher sind als die unter ähnlichen Verfütterungsbedingungen erhaltenen Werte von 10-Hydroxygeraniol/10-Hydroxynerol (**1c/d**)⁷⁾. Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß in der Biogenese des Secologanins (**3**) und der Indolalkaloide nach Hydroxylierung von Geraniol (**1a**) bzw. Nerol (**1b**) an C-10 eine Oxidation der primären Hydroxygruppen an C-1 und C-10 zu Aldehydfunktionen erfolgt. Eine Aussage darüber, welche OH-Gruppe zuerst oxidiert wird, läßt sich aufgrund der Einbauraten jedoch nicht machen.

Für die Fütterungsversuche wurden die Gemische der an der C-2,3-Doppelbindung isomeren Verbindungen benutzt; denn es ist bekannt, daß α,β -ungesättigte Aldehyde sehr leicht isomerisieren¹⁹⁾. Zum anderen wurde durch Fütterungsexperimente mit **1a**

und **b** gezeigt, daß beide Isomeren eingebaut werden²⁰. *Arigoni*⁶) fand allerdings für **1d** gegenüber **1c** eine etwas bessere Inkorporationsrate. Er nimmt daher an, daß die Verbindungen mit *Z*-Konfiguration an der C-2,3-Doppelbindung die eigentlichen Vorstufen sind.

Tab. 1. Absolute Einbauraten (in %) in Loganin (**2b**) und die Indolalkaloide **10** und **11** bei Verfütterung der markierten Monoterpenaldehyde $[1-^3\text{H}_1]$ -**4a/b**, **4c/d** und **5a/b** an *Catharanthus roseus* G. Don

Vorstufe	Catharanthin (10)	Einbauraten Vindolin (11)	Loganin (2b) ^{c)}
10-Hydroxy- $[1-^3\text{H}_1]$ geranial/neral (4a/b) ^{a)}	0.22	0.14	0.91 (99)
10-Oxo- $[1-^3\text{H}_1]$ geraniol/nerol (4c/d) ^{b)}	0.12	0.13	0.23 (97)
10-Oxo- $[1-^3\text{H}_1]$ geranial/neral (5a/b) ^{b)}	0.09	0.12	0.28 (97)

a) Verfüttert als Emulsion in wäßrigem „Tween 80“. – b) Verfüttert in einem wäßrigem „Tween 80“/DMSO-Gemisch (10:1). – c) In Klammern: Retention an Radioaktivität (in %) bei Überführung in das Pentaacetat.

Diese Arbeit wurde von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, dem *Science Research Council, England*, und dem *Fonds der Chemischen Industrie* gefördert.

Experimenteller Teil

¹H-NMR-Spektren: TMS innerer Standard, Geräte Varian T 60 und HA 100. – Massenspektren: Varian MAT SM 1. – IR-Spektren: Perkin-Elmer Spektrometer 421 (als Film, wenn nicht anders angegeben). – UV-Spektren: Zeiss PMQ II und Beckman DK 2. – Radioaktivitätsmessungen: Flüssigkeits-Scintillationszähler Packard-Tricarb 3314 und Nuclear-Chicago Mark I 6860, Scintillator: Lösung von 4.0 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 50 mg 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzol (POPOP) in 1 Liter Toluol. Die Proben wurden in 15 ml Scintillator gelöst. Die Bestimmung der Zählausbeute erfolgte durch externen Standard (¹³³Ba-Quelle) in Verbindung mit Löschkurven. – Zur Analyse wurden die Substanzen, wenn nicht anders angegeben, bei 25 °C i. Hochvak. getrocknet. – Analytische Gaschromatographie (AGC): Geräte Perkin-Elmer F 7 und F 20, Silicongummi SE 52 auf Chromosorb G (62 S 5.57). – Analytische (0.2 mm) und präparative Schichtchromatographie (PSC): Kieselgel P_F 254 (E. Merck), Lösungsmittelsysteme: 1) Benzol/Essigester (1:1), 2) Ether, 3) Chloroform/Methanol (1:1).

Oxidation von Geranial (8a) und Neral (8b) mit Selendioxid

a) Zu 40.0 g (260 mmol) eines Gemisches aus 64% **8a** und 36% **8b** in 200 ml siedendem Ethanol gab man innerhalb von 45 min 34.0 g (300 mmol) Selendioxid. Die dunkelrote Lösung wurde filtriert, eingedampft und der Rückstand portionsweise im Kugelrohr bei 105 °C (Ofentemp.)/10⁻² Torr destilliert. Man erhielt 16.4 g (38%) eines Gemisches aus 65% *10-Oxo-geranial* (**5a**) und 35% *10-Oxoneral* (**5b**). Verunreinigungen mit 10-Hydroxygeranial und 10-Hydroxyneral (**4a/b**) lagen vor der Destillation bei 3% und nach der Destillation unter 1%. –

IR: 2840 (CH), 1680 (C=O), 1650 (C=C), 1450 cm^{-1} . – MS (70 eV): $m/e = 166$ (6%, M^+), 148 (31, $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 137 (33), 84 (100, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 10.00$ (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.65 CH), 9.94 (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.35 CH), 9.38 (s; CH), 6.44 (m; CH), 5.90 (m; CH), 2.9–2.3 (m; 2 CH_2), 2.20 (s; ca. 0.65 CH_3), 2.01 (s; ca. 0.35 CH_3), 1.74 (s; CH_3).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ (166.2) Ber. C 72.26 H 8.49 Gef. C 71.98 H 8.55

b) Wie oben beschrieben, wurden 6.00 g (40.0 mmol) **8a/b** in 100 ml Ethanol mit 3.00 g (27.0 mmol) Selendioxid oxidiert. Nach Aufarbeitung dampfte man nicht umgesetzte Ausgangsverbindung bei 85 °C (Ofentemp.)/ 10^{-2} Torr ab und destillierte den Rückstand bei 120 °C (Ofentemp.)/ 10^{-2} Torr. Das erhaltene viskose Öl wurde durch Chromatographie an Kieselgel (System 1) aufgetrennt:

Fraktion I; $R_F = 0.58$: 0.62 g (10%) eines Gemisches aus 64% **5a** und 36% **5b**.

Fraktion II; $R_F = 0.36$: 0.95 g (15%) eines Gemisches aus 10-Hydroxygeraniol (**4a**) und 10-Hydroxynerol (**4b**). AGC (SE 52, 200 °C): Verhältnis der Retentionszeiten $t_{4b} : t_{4a} = 1 : 1.18$. Verhältnis der Isomeren: 38% **4b** und 62% **4a**. – IR: 3230 (OH), 2890 (CH), 1680 (C=O), 1660 (C=C), 1450 cm^{-1} . – MS (70 eV): $m/e = 168$ (2%, M^+), 150 (20, $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 135 (19, 150 – CH_3), 84 (100, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9.97$ (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.6 CH), 9.87 (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.4 CH), 5.88 (d, $J = 8$ Hz; CH), 5.40 (m; CH), 3.96 (s; CH_2), 2.50 (s; OH, austauschbar mit D_2O), 2.7–2.2 (m; 2 CH_2), 2.16 (s; ca. 0.6 CH_3), 2.00 (s; ca. 0.4 CH_3), 1.66 (s; CH_3).

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ (168.2) Ber. C 71.39 H 9.59 Gef. C 71.72 H 9.53

10-Oxogeraniol (**4c**) und 10-Oxonerol (**4d**): Eine Lösung von 1.00 mmol des Gemisches der Dialdehyd **5a/b** in 4 ml 2-Propanol und 2 ml Dioxan wurde mit 35 mg (0.65 mmol) Kaliumborhydrid, 200 mg Lithiumchlorid¹¹⁾ und 200 mg acetatgepuffertem Ionenaustauscher¹²⁾ bei 20 °C 10 h gerührt. Nach Zugabe von 0.2 ml Eisessig dampfte man i. Vak. ein und trennte durch PSC an Kieselgel (System 1):

Fraktion I; $R_F = 0.15$: 69 mg (41%) **1c/d**.

Fraktion II; $R_F = 0.36$: 82 mg (49%) **4c/d**. IR: 3230 (OH), 2890 (CH), 1680 (C=O), 1660 (C=C), 1450 cm^{-1} . – MS (70 eV): $m/e = 168$ (2%, M^+), 150 (20, $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 135 (19, 150 – CH_3), 84 (100, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9.38$ (s; CH), 6.46 (m; CH), 5.38 (m; CH), 4.08 (d, $J = 7$ Hz; CH_2), 3.30 (s; OH, austauschbar mit D_2O), 2.6–2.0 (m; 2 CH_2), 1.76 (s; CH_3) und ca. 0.4 CH_3), 1.64 (s; 0.6 CH_3).

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$ (168.2) Ber. C 71.39 H 9.59 Gef. C 71.67 H 9.40

In gleicher Weise wie oben wurden 201 mg (1.21 mmol) eines Gemisches aus 64% **5a** und 36% **5b** mit 59.0 mg (1.09 mmol) [^3H]Kaliumborhydrid ($^3\text{H}: 2.0 \cdot 10^{11}$ dpm/mmol) 15 h umgesetzt, und das entstandene Gemisch wurde durch zweifache PSC an Kieselgel (System 1) getrennt und gereinigt.

I; 10-Hydroxy-[1,10- ^3H]geraniol ([1,10- $^3\text{H}_1$]-**1c**) und 10-Hydroxy-[1,10- ^3H]nerol ([1,10- $^3\text{H}_1$]-**1d**): 63.4 mg (31%) ($^3\text{H}: 1.11 \cdot 10^{11}$ dpm/mmol).

II; 10-Oxo-[1- ^3H]geraniol ([1- $^3\text{H}_1$]-**4c**) und 10-Oxo-[1- ^3H]nerol ([1- $^3\text{H}_1$]-**4d**): 36.5 mg (18%) ($^3\text{H}: 6.06 \cdot 10^{10}$ dpm/mmol).

10-Oxogeraniol (**5a**) und 10-Oxonerol (**5b**): 170 mg (1.00 mmol) des Gemisches von 10-Hydroxygeraniol (**1c**) und 10-Hydroxynerol (**1d**) wurden 60 h mit 4.0 g Mangandioxid¹³⁾ in 40 ml wasserfreiem Chloroform gerührt. Man filtrierte, wusch mit konz. NaHCO_3 -Lösung und erhielt nach Abdampfen des Lösungsmittels ein gelbes viskoses Öl, das im Kugelrohr destilliert wurde: 144 mg (87%), Sdp. 105 °C (Ofentemp.)/ 10^{-2} Torr. AGC (SE 52, 180 °C): Verhältnis der Retentionszeiten $t_{5b} : t_{5a} = 1 : 1.24$. Verhältnis der Isomeren: 64% (**5b**) und 36% (**5a**).

Läßt man nur 24 h reagieren, so erhält man neben **5a/b** ein Gemisch der Hydroxyaldehyde **4a/b** und **4c/d** im Verhältnis 76: 24.

Wie oben beschrieben, wurden 15 mg (0.090 mmol) $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4c/4d}$ (^3H : $6.06 \cdot 10^{10}$ dpm/mmol) mit 200 mg Mangandioxid¹³) oxidiert. Das entstandene Produkt wurde durch zweifache PSC an Kieselgel (System 2) gereinigt. $10\text{-Oxo-}[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{geranial}$ ($[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-5a}$) und $10\text{-Oxo-}[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{neral}$ ($[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-5b}$): 3.67 mg (25%) (^3H : $3.31 \cdot 10^{10}$ dpm/mmol).

$10\text{-Acetoxygeranial}$ (**9a**) und 10-Acetoxyneral (**9b**): 250 mg (1.49 mmol) **4a/b** wurden in 1 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid 3 h bei 6°C gerührt. Anschließend engte man i. Vak. ein und destillierte den Rückstand im Kugelrohr: 288 mg (92%), Sdp. 110°C (Ofentemp.)/ 10^{-2} Torr. – IR: 2940 (CH), 1750 (C=O), 1685 (C=O), 1645 cm^{-1} (C=C). – MS (70 eV): $m/e = 211$ (4%, $M^+ + 1$), 210 (2, M^+), 181 (62, $M^+ - \text{CHO}$ oder $\text{C}_2\text{H}_4 + \text{H}$), 168 (17, $M^+ - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$), 150 (92, $M^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), 84 (100, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9.98$ (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.6 CH), 9.90 (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.4 CH), 5.85 (d, $J = 8$ Hz; CH), 5.42 (m; CH), 4.42 (s; CH_2), 2.8–2.2 (m, 2 CH_2), 2.17 (s; ca. 0.6 CH_3), 2.04 (s; CH_3), 1.99 (s; ca. 0.4 CH_3), 1.65 (s; CH_3).

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3$ (210.3) Ber. C 68.54 H 8.63 Gef. C 68.79 H 8.93

$10\text{-Hydroxy-}[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{geranial}$ ($[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4a}$) und $10\text{-Hydroxy-}[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{neral}$ ($[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4b}$): 210 mg (1.00 mmol) eines Gemisches aus 62% **9a** und 38% **9b** in 4 ml 2-Propanol und 2 ml Dioxan wurden mit 59 mg (1.09 mmol) $[^3\text{H}]\text{Kaliumborhydrid}$ (^3H : $2.0 \cdot 10^{11}$ dpm/mmol) in Gegenwart von 0.2 g Lithiumchlorid¹¹) und 0.2 g acetatgepuffertem Ionen austauscher¹¹) 14 h bei 20°C gerührt²¹). Nach Zugabe von 0.2 ml Eisessig engte man i. Vak. ein, nahm in Ether auf und destillierte nach Abdampfen des Lösungsmittels im Kugelrohr. Man erhielt 172 g (81%) eines Gemisches aus $10\text{-Acetoxy-}[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{geranial}$ ($[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-9c}$) und $10\text{-Acetoxy-}[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{neral}$ ($[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-9d}$), Sdp. 130°C (Ofentemp.)/ 10^{-2} Torr. – IR: 3340 (OH), 2900 (CH), 1740 (C=O), 1230 cm^{-1} . – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 5.42$ (m; 2 CH), 4.42 (s; CH_2), 4.09 (d, $J = 7$ Hz; CH_2), 3.05 (s, OH, austauschbar mit D_2O), 2.09 (m, 2 CH_2 , 2 CH_3), 1.66 (m, CH_3).

160 mg (0.75 mmol) des Gemisches von markiertem **9c/9d** wurden 52 h mit 4.0 g Mangandioxid¹³) in wasserfreiem Chloroform gerührt. Man filtrierte, dampfte das Lösungsmittel ab und destillierte im Kugelrohr: Sdp. 120°C (Ofentemp.)/ 10^{-2} Torr. Das Destillat wurde mit 200 mg wasserfreiem Bariumhydroxid in 15 ml Methanol 10 min bei 0°C gerührt²⁰). Nach Zugabe von 0.3 ml Eisessig dampfte man das Lösungsmittel ab, reinigte den Rückstand durch zweimalige PSC an Kieselgel (System 1, $R_F = 0.36$) und destillierte im Kugelrohr: 56.3 mg (45%) $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4a/4b}$ (^3H : $2.30 \cdot 10^{10}$ dpm/mmol), Sdp. 125°C (Ofentemp.)/ 10^{-2} Torr. – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9.97$ (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.6 CH), 9.87 (d, $J = 8$ Hz; ca. 0.4 CH), 5.88 (d, $J = 8$ Hz; CH), 5.40 (m; CH), 3.96 (s; CH_2), 2.50 (s; OH, austauschbar mit D_2O), 2.7–2.2 (m; 2 CH_2), 2.16 (s; ca. 0.6 CH_3), 2.00 (s; ca. 0.4 CH_3), 1.66 (s; CH_3).

Verfütterung der Monoterpenaldehyde 4a/b, 4c/d und 5a/b an Catharanthus roseus G. Don sowie Isolierung der Indolalkaloide Catharanthin (10) und Vindolin (11) und des Iridoidglycosids Loganin (2b): Ca. 5 mg $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4a/b}$, gelöst in 6 ml 2proz. wäbr. „Tween 80“, $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-4c/d}$ und $[1\text{-}^3\text{H}_1]\text{-5a/b}$, gelöst in 6 ml 5proz. wäbr. „Tween 80“/DMS (10: 1), wurden auf je 30 Reagenzglaser verteilt und durch hydroponische Verfütterung an blühende Zweige von jungen *Catharanthus roseus* G. Don-Pflanzen appliziert. Nach 72 h Inkubation bei 29–30°C und hoher Luftfeuchtigkeit zerkleinerte man die Triebe im Mixer in 100 ml Methanol, gab Catharanthin-hydrochlorid (**10** · HCl), Vindolin (**11**) und Loganin (**2b**) in 40 ml Methanol sowie 2 Tropfen wäbr. Ammoniumhydroxid-Lösung als inaktive Trägersubstanzen zu (Mengenangaben in Tab. 2) und perkolierte das Pflanzenmaterial in einer Glassäule (4 × 30 cm) mit 3 Liter Methanol. Die Lösung wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand zwischen 100 ml 2proz. Weinsäure und 100 ml Petrolether (60–80°C) verteilt. Man wusch die org. Phase nochmals mit 50 ml 2proz. Weinsäure und die vereinigten wäbr. Phasen mit 50 ml Petrolether, stellte die wäbr. Phase mit 2 N NaOH auf pH 4 ein, extrahierte mit Chloroform, wusch mit konz. NaCl-Lösung und trennte nach Eindampfen i. Vak. durch PSC an Kieselgel (System 2) auf.

Fraktion I; $R_F = 0.27$: Catharanthin (**10**). Zur Reinigung löste man in 5 ml mit Chlorwasserstoff gesättigtem Methanol und gab Ether zu, bis gerade keine bleibende Trübung auftrat. Die ausgefallenen farblosen Nadeln des Hydrochlorids kristallisierte man bis zur konstanten Aktivität aus Methanol/Ether um (s. Tab. 1 und 2).

Tab. 2. Radioaktivität der verfütterten Verbindungen [$1\text{-}^3\text{H}_1$]-**4a/b**, [$1\text{-}^3\text{H}_1$]-**4c/d** und [$1\text{-}^3\text{H}_1$]-**5a/b** sowie der isolierten Alkaloide **10** und **11** und des Glycosids **2b**

	[$1\text{-}^3\text{H}_1$]- 4a/b	[$1\text{-}^3\text{H}_1$]- 4c/d	[$1\text{-}^3\text{H}_1$]- 5a/b
Applizierte Radioaktivität (dpm)	$1.85 \cdot 10^8$	$1.52 \cdot 10^9$	$5.16 \cdot 10^8$
Isoliertes 10:			
Verdünnung	300 mg	268 mg	230 mg
Spez. Radioaktivität (dpm/mg)	$1.34 \cdot 10^3$	$3.48 \cdot 10^3$	$2.05 \cdot 10^3$
Isoliertes 11:			
Verdünnung	200 mg	200 mg	180 mg
Spez. Radioaktivität (dpm/mg)	$1.28 \cdot 10^3$	$4.83 \cdot 10^3$	$3.54 \cdot 10^3$
Isoliertes 2b:			
Verdünnung	220 mg	300 mg	295 mg
Spez. Radioaktivität (dpm/mg)	$7.62 \cdot 10^3$	$5.81 \cdot 10^3$	$4.83 \cdot 10^3$

Fraktion II; $R_F = 0.07$: Vindolin (**11**). Umkristallisation bis zur konstanten Aktivität aus Chloroform/Ether (s. Tab. 1 und 2).

Zur Isolierung von Loganin (**2b**) wurde die Mutterlauge des Chloroform-Extraktes auf pH 7 gebracht und mit 5×100 ml *n*-Butanol extrahiert. Die org. Phase wurde i. Hochvak. eingedampft, der Rückstand durch PSC an Kieselgel (System 3) gereinigt und aus Ethanol bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert. Das so erhaltene Loganin wurde mit Acetanhydrid/Pyridin in das Pentaacetat²²⁾ übergeführt (s. Tab. 1 und 2).

¹⁾ Übersichtsartikel u. a. von A. R. Battersby in The Alkaloids, Chem. Soc. Spec. Period. Rep. **1**, 31 (1971); A. I. Scott, Acc. Chem. Res. **3**, 151 (1970); R. J. Parry, The Catharanthus Alkaloids (Edit. W. I. Taylor und N. R. Farnsworth, S. 141, Dekker, New York 1975).

²⁾ A. R. Battersby und R. J. Parry, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1971**, 901; A. R. Battersby und B. Gregory, ebenda **1968**, 134.

³⁾ A. R. Battersby und R. J. Parry, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1971**, 30, 31; A. R. Battersby und E. S. Hall, ebenda **1970**, 194.

⁴⁾ C. R. Hutchinson, A. H. Heckendorf, P. E. Daddona, E. Hagaman und E. Wenkert, J. Am. Chem. Soc. **96**, 5609 (1974).

⁵⁾ A. R. Battersby, A. R. Burnett und P. G. Parsons, J. Chem. Soc. C **1969**, 1187.

⁶⁾ S. Escher, P. Loew und D. Arigoni, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1970**, 823.

⁷⁾ A. R. Battersby, S. H. Brown und T. G. Payne, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1970**, 827.

⁸⁾ H. Inouye, S. Ueda, Y. Aoki und Y. Takeda, Tetrahedron Lett. **1969**, 2351; A. R. Battersby, A. R. Burnett und P. G. Parsons, Chem. Commun. **1970**, 826.

⁹⁾ G. Büchi und H. Wuest, Helv. Chim. Acta **50**, 2440 (1967).

- 10) U. T. Bhalerao, J. J. Plattner und H. Rapoport, J. Am. Chem. Soc. **92**, 3429 (1970).
- 11) H. C. Brown und K. Ichikawa, J. Am. Chem. Soc. **83**, 4372 (1961).
- 12) Amberlit-Ionenaustauscher IR C-50 wurde mit 0.1 M Acetatpuffer (PH 4.75) gewaschen und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet.
- 13) L. A. Carpino, J. Org. Chem. **35**, 3971 (1970).
- 14) Die Oxidation wurde unabhängig auch von Herrn Dr. T. G. Payne untersucht.
- 15) P. B. Venuto und A. R. Day, J. Org. Chem. **29**, 2735 (1964).
- 16) L. M. Jackman, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, S. 121, Pergamon Press, Inc., New York, N. Y. 1959.
- 17) R. B. Bates und D. M. Gale, J. Am. Chem. Soc. **82**, 5749 (1960).
- 18) E. J. Corey, N. W. Gilman und B. E. Ganem, J. Am. Chem. Soc. **90**, 5616 (1968).
- 19) K. C. Chan, R. A. Jewell, W. H. Nutting und H. Rapoport, J. Org. Chem. **33**, 3382 (1968).
- 20) A. R. Battersby, R. T. Brown, R. S. Kapil, J. A. Knight, J. A. Martin und A. O. Plunkett, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1966**, 888.
- 21) Der Verlauf der Reaktion wurde durch DC an Kieselgel verfolgt.
- 22) A. R. Battersby, E. S. Hall und R. Southgate, J. Chem. Soc. C **1968**, 721.

[72/81]