

Untersuchungen zur Biogenese der Indolalkaloide. Synthese und Verfütterung radioaktiv markierter Hydroxyloganin-Derivate¹⁾

Alan R. Battersby^a, Neil D. Westcott^a, Karl-Heinz Glösenkamp^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

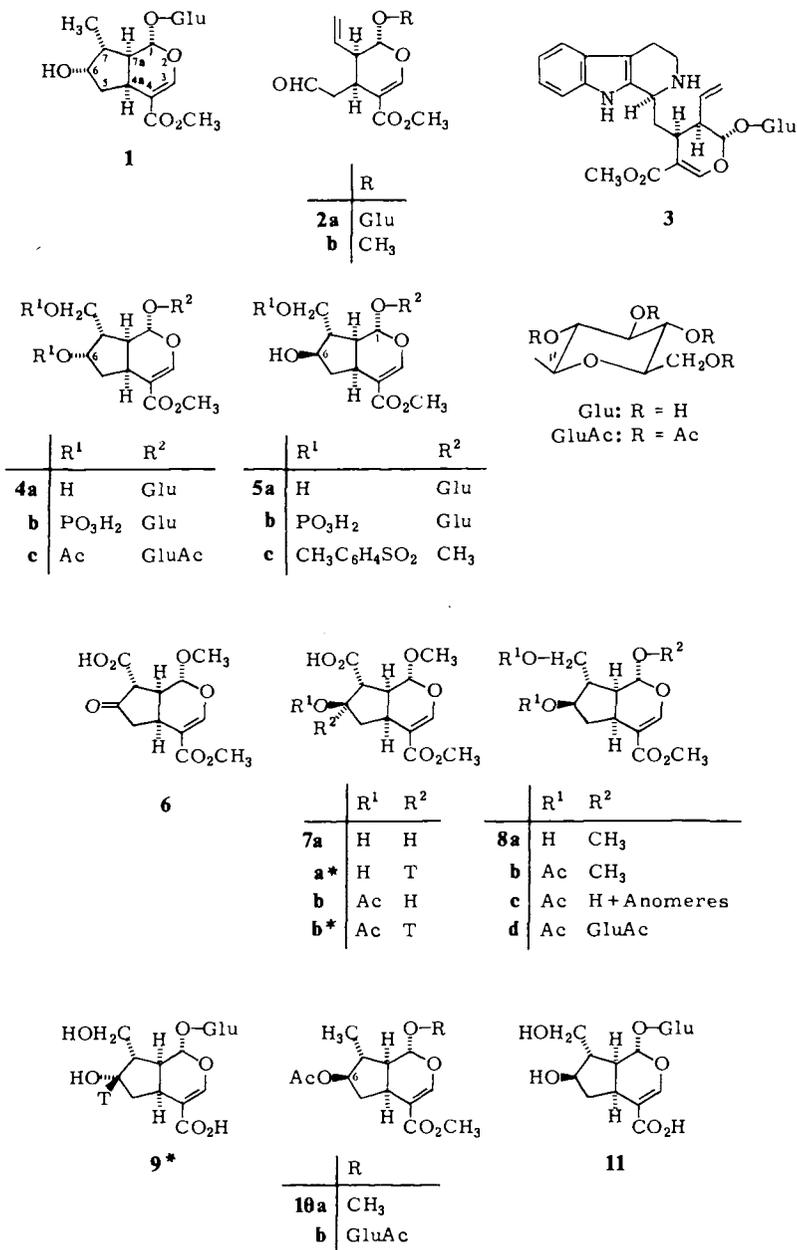
Zur Prüfung der Möglichkeit, ob Hydroxyloganin (**4a**) oder 6-Epihydroxyloganin (**5a**) Zwischenstufen in der Biogenese von Secologanin (**2a**) und der Indolalkaloide sind, wurden beide Verbindungen in radioaktiv markierter Form hergestellt. Dazu reduzierte man die Ketocarbonsäure **6** mit [³H]Natriumborhydrid und veresterte die Hydroxycarbonsäuren **9*** bzw. **11** mit [¹⁴C]Diazomethan. Fütterungsversuche mit *Catharanthus roseus* G. Don ergaben, daß **4a** und **5a** mit großer Wahrscheinlichkeit keine Vorstufen von **2a** und der Indolalkaloide sind. Durch Isolierungsversuche wurde außerdem gezeigt, daß **4a** kein natürlich vorkommendes Iridoidglycosid in *Menyanthes trifoliata* ist.

Investigations of the Biosynthesis of Indole Alkaloids.

Feeding Experiments with Synthetic Radioactively Labeled Hydroxyloganin Derivatives¹⁾

Hydroxyloganin (**4a**) and 6-epihydroxyloganin (**5a**) were synthesized with a radioactive label to check the hypothesis that these compounds lie directly on the biosynthetic pathways to secologanin (**2a**) and the indole alkaloids. The labels were introduced by reduction of the keto acid **6** with sodium [³H]borohydride and esterification of the hydroxy acids **9*** or **11** with [¹⁴C]diazomethane. According to feeding experiments with *Catharanthus roseus* G. Don it is highly improbable that **4a** and **5a** are precursors of **2a** and the indole alkaloids. Moreover, isolation experiments showed that **4a** is not a naturally occurring iridoid glycoside in *Menyanthes trifoliata* plants.

Eine Schlüsselreaktion in der Biogenese der Indolalkaloide²⁾ und weiterer Naturstoffe³⁾ ist die Überführung des Monoterpen-Bausteins Loganin (**1**) in Secologanin (**2a**), das dann mit Tryptamin in Art einer Mannich-Reaktion zu Strictosidin (Isovinco-side)⁴⁾ (**3**), der ersten stickstoffhaltigen Vorstufe der Indolalkaloide, kondensieren kann. Beim Übergang von **1** in **2a** erfolgt Spaltung des Cyclopentanringes unter Bildung einer δ, ϵ -ungesättigten Aldehydgruppe. Als mögliche Zwischenstufen lassen sich hierbei Hydroxyloganin (**4a**)⁵⁾ und 6-Epihydroxyloganin (**5a**) formulieren, die durch eine enzymatische Fragmentierung z. B. in Form der Phosphorsäureester **4b** und **5b** zu **2a** gepalten werden können⁶⁾. So gelang es vor kurzem, das 6-Epihydroxyloganin-Derivat **5c** *in vitro* mit sehr guten Ausbeuten in das Secologanin-Derivat **2b** zu überführen⁷⁾.



In dieser Arbeit beschreiben wir nun die Synthese und Verfüterung von radioaktiv markiertem Hydroxyloganin (**4a***) und 6-Epihydroxyloganin (**5a***). Außerdem wurde untersucht, ob **4a** ein natürlich vorkommendes Iridoidglycosid ist.

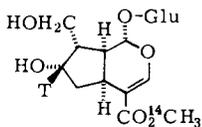
Synthese von 6-Epihydroxyloganin (5a)

Zur Synthese von **5a** acetylierten wir den Alkohol **8a**⁹⁾ mit Acetanhydrid/Pyridin zu **8b**. Spaltung der Acetalgruppe in **8b** mit Perchlorsäure in wäßriger Essigsäure führte zu den Aglykonen **8c**, die mit β -D-Tetra-*O*-acetylglucose in Gegenwart von Bortrifluorid·Ether nach mehrfacher chromatographischer Reinigung mit 4% Ausbeute 6-Epihydroxyloganin-hexaacetat (**8d**) lieferten. Durch Hydrolyse mit Bariumhydroxid in wäßrigem Methanol erhielt man die Hydroxycarbonsäure **11**, die mit Diazomethan zu **5a** verestert wurde. Dessen Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin ergab wiederum das Hexaacetat **8d**. Das IR-Spektrum von **8d** zeigt für die Carbonylgruppen Absorptionen bei 1760, 1740 und 1705 cm^{-1} und für die Enolether-Doppelbindung bei 1645 cm^{-1} . Das ¹H-NMR-Spektrum stimmt weitgehend mit dem des Hydroxyloganin-hexaacetats (**4c**) überein. So findet man für 3-H ein Dublett bei $\delta = 7.41$ ($J_{3,4} = 1$ Hz) und für die Methoxycarbonylgruppe ein Singulett bei 3.71⁹⁾.

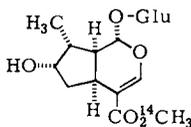
Die Konfiguration von **8d** an C-1 und C-1' ergab sich aufgrund der Syntheseführung und der annähernden Übereinstimmung der Molrotation der bekannten 6-Epiloganin-Derivate **10a** ($[M]_D^{22} = -346^\circ$) und **10b** ($[M]_D^{22} = -720^\circ$)⁹⁾ mit den synthetischen 6-Epihydroxyloganin-Verbindungen **8b** ($[M]_D^{20} = -408^\circ$) und **8d** ($[M]_D^{20} = -612^\circ$)¹⁰⁾.

Synthese der radioaktiv markierten Hydroxyloganin-Derivate 4a* und 5a* und Fütterungsversuche

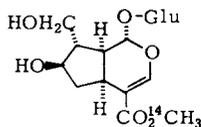
Für eine Markierung mit radioaktiven Isotopen war die Methylgruppe der Esterfunktion in **4a** und **5a** besonders gut geeignet, da diese im letzten Reaktionsschritt der Synthesen eingeführt werden kann und außerdem diese Art der Markierung bei Biogenese-Untersuchungen mit Logenin (**1**) bereits erfolgreich angewendet worden war⁹⁾. Um hierbei jedoch eine Verfälschung der Verfütterungsergebnisse durch eine mögliche intermediäre Umesterung¹¹⁾ zu vermeiden, wurde bei Hydroxyloganin (**4a**) zusätzlich noch eine Markierung mit dem Radioisotop ³H an C-6 durchgeführt. In 6-Epihydroxyloganin (**5a**) wurde nur die Methylgruppe des Esters markiert, da hier eine Umesterung nicht zu befürchten war¹²⁾.



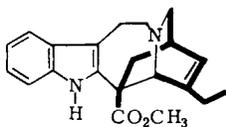
4a*



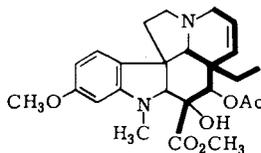
1*



5a*



12



13

Die spezifische Einführung des ^3H -Isotops an C-6 gelang durch Reduktion der Keto-carbonsäure **6** zur Hydroxycarbonsäure **7b*** mit $[^3\text{H}]$ Natriumborhydrid in Isopropylalkohol/Ether. Zur Markierung mit dem ^{14}C -Isotop wurde $[6\text{-}^3\text{H}]$ Hydroxyloganinsäure (**9***) mit $[^{14}\text{C}]$ Diazomethan verestert. In gleicher Weise führte man die Umsetzung der 6-Epihydroxyloganinsäure (**11**) zu **5a*** durch.

Für die Tracer-Versuche wurden jeweils etwa 5 mg **4a*** und **5a*** in Wasser gelöst und in der bereits beschriebenen Weise¹³⁾ an junge Sprößlinge von *Catharanthus roseus* G. Don (*Vinca rosea* L.) verfüttert. Als Trägermaterialien bei der Aufarbeitung verwendete man die Indolalkaloide Catharanthin (**12**) und Vindolin (**13**). In einem Kontroll-Experiment wurde zusätzlich die bereits bekannte Vorstufe $[\text{CO}_2^{14}\text{CH}_3]$ Loganin (**1***) appliziert. Hierdurch sollte sichergestellt werden, daß die verwendeten Pflanzen Indolalkaloide produzieren und die Methoden der Markierung, Verfütterung und Aufarbeitung geeignet sind.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Fütterungsversuche sind in Tab. 1 wiedergegeben. Während man für $[\text{CO}_2^{14}\text{CH}_3]$ Loganin (**1***) die erwarteten Einbauraten fand, waren die nach Verfütterung von **4a*** und **5a*** isolierten Indolalkaloide nahezu inaktiv. Inouye*) und Mitarbeiter haben unabhängig von uns gefunden, daß **4a*** und **5a*** auch in *Lonocera morrowii* und *Adina pululifera* nicht als Vorstufen in der Biosynthese von Secologanin (**2a**) fungieren.

Tab. 1. Absolute Einbauraten (in %) bei der Verfütterung von markiertem **1***, **4a*** und **5a*** an *Catharanthus roseus* G. Don

Verfütterte Verbindungen	Einbauraten	
	Catharanthin (12)	Vindolin (13)
$[\text{CO}_2^{14}\text{CH}_3, 6\text{-}^3\text{H}]$ Hydroxyloganin (4a*)	< 0.02	< 0.01
$[\text{CO}_2^{14}\text{CH}_3]$ 6-Epihydroxyloganin (5a*)	< 0.01	< 0.01
$[\text{CO}_2^{14}\text{CH}_3]$ Loganin (1*)	0.26	0.13

Es lassen sich hierfür drei mögliche Erklärungen formulieren:

I. Hydroxyloganin (**4a**) und 6-Epihydroxyloganin (**5a**) sind keine Vorstufen in der Biogenese von Secologanin (**2a**) und der Indolalkaloide¹⁴⁾.

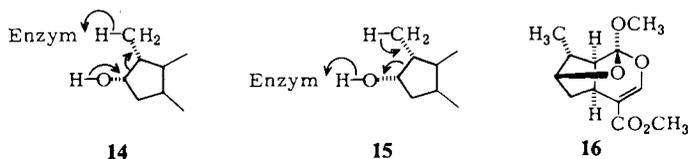
II. Im Gegensatz zu Loganin (**1**) werden **4a** und **5a** nicht an den Ort der Alkaloidbiogenese transportiert.

III. Die Bildung und Spaltung von Hydroxyloganin **4a** bzw. **5a** erfolgen in einem Multienzym-Komplex, so daß freies **4a** und **5a** von den Pflanzen nicht verwertet werden kann.

Hierbei scheint die Erklärung I am wahrscheinlichsten zu sein, da eine unterschiedliche Permeabilität der Zellmembran gegenüber Loganin (**1**) und Hydroxyloganin (**4a**) bzw. 6-Epihydroxyloganin (**5a**) – wenngleich möglich – äußerst überraschend wäre.

*) H. Inouye, Kyoto Universität, persönliche Mitteilung.

Gegen das Vorliegen eines ausschließlich enzymgebundenen **4a** bzw. **5a** spricht, daß die Vorstufen Desoxyloganin¹⁵⁾, Logenin (**1**) und Secologenin (**2a**)¹⁶⁾ aus Pflanzenmaterialien isoliert werden konnten.



Aufgrund der Fütterungsversuche muß man daher annehmen, daß die Spaltung des carbocyclischen Ringes in Logenin (**1**) nicht über eine Hydroxylierung an C-8 verläuft. Als Alternative ließen sich schwefelanaloge Hydroxyloganin-Derivate formulieren. So konnte vor kurzem Inouye¹⁷⁾ Paederosid, das an C-7 eine Mercaptomethyl-Gruppe trägt, aus der Kletterpflanze *Paedera scandens* isolieren. Eine weitere Möglichkeit, der eine größere Wahrscheinlichkeit zukommt, ist die Fragmentierung von **1** durch Oxidation wie in **14** und **15** wiedergegeben oder über einen entsprechenden Radikalprozeß. *In vitro*-Versuche, Logenin-Derivate durch Oxidation mit Bleitetraacetat zu fragmentieren, ergaben jedoch ausschließlich den Tricyclus **16**¹⁸⁾. Als Zwischenstufe wird hierbei allerdings ein Radikal vermutet, in dem der Cyclopentanring geöffnet ist.

Versuche zur Isolierung von Hydroxyloganin (**4a**) aus Pflanzenextrakten

Zur Absicherung des negativen Biogenese-Befundes und um festzustellen, ob Hydroxyloganin (**4a**) eventuell ein natürlich vorkommendes Iridoidglycosid ist, untersuchten wir Extrakte von *Menyanthes trifoliata* auf ihren Gehalt an **4a**. Diese Pflanze wurde gewählt, da hieraus bereits eine Vielzahl von Iridoiden und Secoiridoiden isoliert werden konnte.

Besonders geeignet für den Nachweis von nur in geringen Mengen vorkommenden Naturstoffen ist die umgekehrte Isotopenverdünnungsanalyse. Im vorliegenden Fall konnte diese jedoch nicht angewendet werden, da keine ausreichenden Mengen an Hydroxyloganin (**4a**) zur Verfügung standen. Wir führten daher eine Makroisolierung mit $[\text{CO}_2^{14}\text{CH}_3, 6\text{-}^3\text{H}]$ Hydroxyloganinhexaacetat (**4c***) als Indikator durch. Hierzu wurden frisch geerntete Stengel und Blätter von *Menyanthes trifoliata* in üblicher Weise aufgearbeitet (s. Exp. Teil) und die Glycosid- und Zuckerfraktion mit *n*-Butanol extrahiert. Zur besseren Handhabung wurde das Glycosid-Zucker-Gemisch unter milden Bedingungen mit Pyridin/Acetanhydrid acetyliert und das Substanzgemisch durch Säulenchromatographie an Kieselgel in sechs Fraktionen aufgeteilt. Die Fraktion mit dem R_F -Wert des Hydroxyloganin-hexaacetats **4c** wurde nochmals durch Zugabe von **4c*** durch multiplikative PSC an Kieselgel aufgetrennt und die entsprechende Zone im Radiochromatogramm ¹H-NMR-spektroskopisch auf ihren Gehalt an **4c** untersucht. Aus dem Fehlen des Signals der Methoxycarbonylgruppen im ¹H-NMR-Spektrum dieser Fraktion kann geschlossen werden, daß Hydroxyloganin (**4a**) nicht oder zu weniger als 0.0001% in *Menyanthes trifoliata* enthalten ist. Aus den weiteren Fraktionen des Extraktes konnten die bereits bekannten Iridoide und Secoiridoide Logenin (**1**), Foliamenthin¹⁹⁾, Menthiafolin²⁰⁾ und Swerosid²¹⁾ in ihrer acetylierten Form isoliert werden.

Diese Arbeit wurde von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und der *Nuffield Foundation, England*, gefördert. Herrn Prof. *H. Inouye* von der *Kyoto Universität, Japan*, danken wir herzlich für die Übermittlung unveröffentlichter Ergebnisse.

Experimenteller Teil

Spektren und sonstige Methoden wie vorstehend²²⁾. – Optische Drehungen: Perkin-Elmer 141 Polarimeter, Mikroküvette. – Radioaktivitätsmessungen: Flüssigkeits-Scintillationszähler Packard-Tricarb 3314 und Nuclear-Chicago Mark I 6860, zur Messung wurden die Proben gegebenenfalls unter Zugabe von Methanol in 15 ml flüssigem Scintillator²²⁾ gelöst. – Analytische (0.2 mm) und präparative Schichtchromatographie (PSC): Kieselgel P_F 254 (E. Merck), Lösungsmittelsysteme: 1) Ether, 2) Hexan/Essigester (1:1), 3) Chloroform/Methanol (1:1), 4) Chloroform/Methanol/Essigsäure (10:10:1), 5) Ether/Chloroform/Isopropylalkohol (50:50:1).

(–)-6β-Acetoxy-7α-(acetoxymethyl)-1α-methoxy-1,4α,5,6,7,7α-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure-methylester (**8b**): 200 mg (0.66 mmol) des Alkohols **8a**⁵⁾ wurden in 2 ml wasserfreiem Pyridin und 2 ml Acetanhydrid 4 h bei 20°C gerührt. Man engte i. Vak. ein und destillierte den Rückstand im Kugelrohr. Sdp. 140°C (Ofentemp.)/10⁻² Torr, Ausb. 205 mg (91%), $[\alpha]_D^{20} = -119.3^\circ$ ($c = 0.7$ in CHCl₃), $[M]_D^{20} = -408^\circ$. – IR (CHCl₃): 1740 (Acetat), 1705 (C=O), 1640 cm⁻¹ (C=C). – UV (Ethanol): λ_{\max} (lg ϵ) = 235 nm (4.02). – ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 7.41$ (d, $J = 1.5$ Hz; CH), 4.98 (m, CH), 4.74 (d, $J = 6$ Hz; CH), 4.16 (m; CH₂), 3.70 (s; CH₃), 3.52 (s; CH₃), 2.05 (s; CH₃), 1.99 (s; CH₃), 3.2–1.2 (m; 5 aliphat. H).

C₁₆H₂₂O₈ (342.3) Ber. C 56.13 H 6.48 Gef. C 56.20 H 6.37

(–)-6β-Acetoxy-7α-(acetoxymethyl)-1α-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyloxy)-1,4α,5,6,7,7α-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure-methylester (**8d**): 200 mg (0.58 mmol) **8b** wurden in 30 ml Essigsäure, 1 ml Wasser und 0.5 ml 70proz. Perchlorsäure 2 h auf 60°C erhitzt. Man kühlte auf 0°C ab, neutralisierte die Perchlorsäure mit Natriumhydrogencarbonat und engte i. Vak. ein. Verteilung des Rückstands zwischen Ether und Wasser sowie Eindampfen der org. Phase ergaben **8c** als gelbes Öl, das durch PSC an Kieselgel (System 1) gereinigt wurde (Ausb. 160 mg, 85%). Zu einer Lösung von **8c** in 5 ml wasserfreiem 1,2-Dichlorethan wurden bei 0°C 174 mg (0.50 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranose und 2.5 ml Bortrifluorid·Ether gegeben. Man rührte 4 h bei 20°C unter weiterer Zugabe von 260 mg (0.75 mmol) der Tetraacetylglucopyranose, verdünnte mit 100 ml Chloroform und neutralisierte mit konz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Eindampfen der org. Phase ergab 580 mg eines weißen Schaums, der durch multiplikative PSC an Kieselgel aufgetrennt wurde (System 1 und 2; **8d**: $R_F = 0.32$ im System 1). Ausb. 16 mg (4%), $[\alpha]_D^{20} = -93^\circ$ ($c = 0.1$ in CHCl₃), $[M]_D^{20} = -612^\circ$. – IR (CHCl₃): 1760 (Acetat), 1740 (Acetat), 1705 (C=O), 1645 (C=C), 1235 cm⁻¹. – UV (Ethanol): λ_{\max} (lg ϵ) = 232 nm (4.03). – ¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 7.41$ (d, $J = 1$ Hz; CH), 5.6–4.8 (m; 6 CH), 4.3–3.75 (m; CH, 2 CH₂), 3.71 (s; CH₃)⁸⁾, 2.94 (m; CH), 2.16–1.98 (m; 6 CH₃), 2.8–1.2 (m; 4 aliphat. H).

C₂₉H₃₈O₁₇ (658.6) Ber. C 52.88 H 5.81 Gef. C 52.39 H 5.61

(–)-1α-(β-D-Glucopyranosyloxy)-6β-hydroxy-7α-(hydroxymethyl)-1,4α,5,6,7,7α-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure-methylester (6-Epihydroxyloganin) (**5a**): 13 mg (0.02 mmol) **8d** in 1.0 ml Methanol wurden zu 60 mg (0.35 mmol) Bariumhydroxid in 5 ml Wasser gegeben, und 16 h wurde bei 20°C gerührt. Man engte i. Vak. ein, nahm den Rückstand in wenig Wasser auf und chromatographierte über eine kurze Säule mit 2 g saurem Ionenaustauscher IR 120 (E.

Merck) und Wasser als Eluens (20 ml). Eindampfen i. Vak. ergab die Carbonsäure **11** als farbloses Glas, das, in 5 ml Methanol gelöst, mit ether. Diazomethan-Lösung umgesetzt wurde, bis keine Entfärbung mehr eintrat (10 min). Man fügte 1 Tropfen Essigsäure zu, dampfte i. Vak. ein und reinigte den Rückstand durch PSC an Kieselgel (System 3). Ausb. 4.5 mg (55%).

Eine Lösung von 4.0 mg (10 mmol) **5a** in 1 ml wasserfreiem Pyridin und 1 ml Acetanhydrid wurde 20 h bei 20°C gerührt und anschließend i. Hochvak. zur Trockne eingedampft. Ein Vergleich der IR- und UV-Spektren sowie des dünnschichtchromatographischen Verhaltens (CD an Kieselgel in den Systemen 1 und 2) des Rückstandes mit **8d** zeigten keinen Unterschied.

(-)- α -Methylbenzylammonium-Salz von (-)-6 β -Acetoxy-1 α -methoxy-4-(methoxycarbonyl)-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-[6-³H]cyclopenta[c]pyran-7 α -carbonsäure (**7b***): Ca. 130 mg (0.48 mmol) der Ketocarbonsäure **6** in 50 ml Ether [Umsetzung von 155 mg (0.69 mmol) des entsprechenden Ketons (**6**, H statt CO₂H) in der bereits beschriebenen Weise⁵⁾; (berechnet entsprechend einer 70proz. Ausb.)] wurden mit 20 ml Isopropylalkohol und 4.8 mg (0.12 mmol) Natriumborhydrid 15 min bei 0°C gerührt. Anschließend gab man 0.96 mg (0.020 mmol) [³H]Natriumborhydrid (³H: 1.10 · 10¹³ dpm/mmol) und 3.0 mg (0.08 mmol) Natriumborhydrid in 4 ml Isopropylalkohol zu und rührte 48 h bei 20°C. Zur Vervollständigung der Reaktion wurden danach nochmals 22.8 mg (0.60 mmol) Natriumborhydrid zugefügt. Die weitere Aufarbeitung und Acetylierung erfolgten wie üblich. Zur Trennung der Antipoden wurde der ether. Extrakt der (\pm)-[³H]-Acetoxysäure **7b*** i. Vak. eingedampft, der Rückstand zusammen mit 2.5 g des (-)- α -Methylbenzylammonium-Salzes der inaktiven Säure **7b** und 45 mg (0.45 mmol) (-)- α -Methylbenzylamin in wenig Ether gelöst und durch Zugabe von Petrolether zur Kristallisation gebracht. Man kristallisierte dreimal aus Ether/Petrolether um. Die Mutterlaugen wurden unter Zugabe von 0.70 g des (-)- α -Methylbenzylammonium-Salzes von **7b** aufgearbeitet. Schmp. 129–130°C. Ausb. 2.90 g (³H: 4.4 · 10⁸ dpm/mmol, Radioaktivitätsausb. 1.3%).

(-)-1 α -(β -D-Glucopyranosyloxy)-6 α -hydroxy-7 α -(hydroxymethyl)-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-[CO₂¹⁴CH₃, 6-³H]cyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure-methylester ([CO₂¹⁴CH₃, 6-³H]Hydroxyloganin) (**4a***): 79 mg (0.12 mmol) [6-³H]Hydroxyloganin-hexaacetat (**4c***) (³H: 3.6 · 10⁸ dpm/mmol; die Herstellung von **4c*** aus **7b*** erfolgte analog zur Synthese des inaktiven Hydroxyloganin-hexaacetats⁵⁾) in 4 ml Methanol wurden zu 250 mg (1.70 mmol) Bariumhydroxid in 15 ml Wasser gegeben, und 16 h wurde bei 20°C gerührt. Man engte i. Vak. ein, arbeitete wie für **11** auf und erhielt 38 mg (81%) [6-³H]Hydroxyloganinsäure (**9***). 17.8 mg (0.083 mmol) [¹⁴C]Diazald (¹⁴C: 2.35 · 10¹⁰ dpm/mmol) in 12 ml Ether wurden tropfenweise zu einer auf 65–70°C erhitzten Lösung von 2 g Kaliumhydroxid in 3 ml Wasser und 10 ml Ethanol gegeben. Das freigesetzte [¹⁴C]Diazomethan destillierte man zusammen mit Ether in eine eiskalte Lösung von 38 mg (0.097 mmol) **9*** (³H: 3.6 · 10⁸ dpm/mmol) in 10 ml Methanol. Das Endstück des Kühlers tauchte dabei in die Lösung ein. Es wurde mit 10 ml Ether gewaschen und anschließend mit 428 mg (2.0 mmol) inaktivem Diazald in 20 ml Ether in der oben beschriebenen Weise umgesetzt, bis die methanolische Lösung eine gelbliche Färbung zeigte (10 min). Man gab 1 Tropfen Essigsäure zu, dampfte i. Vak. ein und reinigte den Rückstand durch zweifache PSC an Kieselgel (Systeme 3 und 4). Ausb. 17.6 mg (45%) (¹⁴C: 6.3 · 10⁸ dpm/mmol, ³H: 3.6 · 10⁸ dpm/mmol, ¹⁴C-Radioaktivitätsausb. 2.2%).

(-)-1 α -(β -D-Glucopyranosyloxy)-6 β -hydroxy-7 α -(hydroxymethyl)-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-[CO₂¹⁴CH₃]cyclopenta[c]pyran-4-carbonsäure-methylester ([CO₂¹⁴CH₃]6-Epihydroxyloganin) (**5a***): 30 mg (0.046 mmol) 6-Epihydroxyloganin-hexaacetat (**8d**) wurden in der bereits beschriebenen Weise hydrolysiert und mit [¹⁴C]Diazomethan aus 21.4 mg (0.10 mmol) [¹⁴C]Diazald (¹⁴C: 3.96 · 10⁹ dpm/mmol) umgesetzt. Nach zweifacher PSC an Kieselgel (Systeme 3 und 4) Ausb. 9.6 mg (52%) (¹⁴C: 6.1 · 10⁸ dpm/mmol, ¹⁴C-Radioaktivitätsausb. 3.7%).

Verfütterung von 1, 4a* und 5a* an Catharanthus roseus G. Don (Vinca rosea L.) und Isolierung der Alkaloide Catharanthin (12) und Vindolin (13):* Je 30 Reagenzgläser (1 ml) wurden mit Lösungen von ca. 5 mg **1***, **4a*** und **5a*** in 6 ml Wasser gefüllt. In die Lösungen gab man Blüten oder Knospen tragende Triebe von jungen *Catharanthus roseus* G. Don-Pflanzen, die zur Vermeidung eines Luftverschlusses der Kapillaren mit einem Rasiermesser unter Wasser auf die Länge von 2–3 cm zurechtgeschnitten wurden. Nach 72 h Inkubation bei 29–30 °C und hoher Luftfeuchtigkeit zerkleinerte man die Triebe im Mixer in 100 ml Methanol, gab 73 mg **13** und 73 mg **12** · HCl in 40 ml Methanol sowie 2 Tropfen wäbr. Ammoniumhydroxid-Lösung als inaktive Trägersubstanzen zu 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 organische 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 1) auf.

Fraktion I; $R_F = 0.27$: Catharanthin (**12**). Man löste 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).

Fraktion II; $R_F = 0.07$: Vindolin (**13**). Umkristallisation bis zur konstanten Aktivität aus Chloroform/Ether (s. Tab. 1).

Versuche zur Isolierung von Hydroxyloganin (4a) aus Menyanthes trifoliata: 19.3 kg Blätter und Stengel (geerntet 1972 am Erdwallsee/Heiliges Meer, Deutschland) wurden mit dest. Wasser gewaschen und mit 20 Liter Methanol/0.2 M Phosphat-Puffer pH 6.2 (4:1) im Mixer zerkleinert. Man filtrierte, wusch mit insgesamt 20 Liter des Extraktionsmittels nach und engte bei 35 °C i. Vak. ein. Der Rückstand wurde mit 300 ml Wasser verdünnt, mit 5 × 300 ml Petrolether, 5 × 300 ml Ether und nach Sättigen mit Natriumchlorid mit 10 × 400 ml *n*-Butanol extrahiert. Die *n*-Butanol-Phase wurde i. Hochvak. eingedampft und der Rückstand (119.8 g) in 250 ml wasserfreiem Pyridin und 250 ml Acetanhydrid 24 h bei 0 °C und 24 h bei 20 °C gerührt. Nach Einengen i. Hochvak. nahm man in Ether auf und wusch mit 300 ml 1 N HCl, konz. NaHCO₃- und konz. NaCl-Lösung. Abdampfen des Ethers ergab 51.8 g eines braunen Öls. 25.9 g dieses Öls wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel (System 2) in 6 Fraktionen aufgetrennt. Die Fraktion mit dem R_F -Wert des Hydroxyloganin-hexaacetats (**4c**) (463 mg) (DC an Kieselgel im System 2, $R_F = 0.25$) trennte man nochmals unter Zugabe von 0.5 mg [CO₂¹⁴CH₃, 6-³H]Hydroxyloganin-hexaacetat (**4c***) durch multiplikative PSC an Kieselgel in den Systemen 1, 2 und 5 auf und untersuchte die entsprechende Zone im Radiochromatogramm (43 mg) mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie. **4c** konnte nicht nachgewiesen werden (Nachweisgrenze: ca. 0.0001% bei 20 mg **4c** im Extrakt). Aus den weiteren Fraktionen wurden Foliamenthin-pentaacetat¹⁹⁾, Menthiafolin-tetraacetat²⁰⁾, Swerosid-tetraacetat²¹⁾ und Loganin-pentaacetat⁹⁾ isoliert.

¹⁾ Über die Ergebnisse der Untersuchungen, die 1973–1975 durchgeführt wurden, ist bereits mehrfach vorgetragen worden.

²⁾ Übersichtsartikel von A. R. Battersby in *The Alkaloids*, Chem. Soc. Spec. Period. Rep. **1**, 31 (1971); J. Staunton, ebenda **2**, 1 (1972).

³⁾ A. R. Battersby und R. J. Parry, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 30, 31; C. R. Hutchinson, A. H. Heckendorf, P. E. Daddona, E. Hagaman und E. Wenkert, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 5609 (1974); A. R. Battersby und R. J. Parry, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 901.

- 4) *G. N. Smith*, Chem. Commun. **1968**, 912; *A. R. Battersby*, *A. R. Burnett* und *P. G. Parsons*, J. Chem. Soc. C **1969**, 1187; *J. Stöckigt* und *M. H. Zenk*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1977**, 646.
- 5) *L.-F. Tietze*, Chem. Ber. **107**, 2499 (1974). Die Synthese der Iridoidglycoside konnte inzwischen erheblich verbessert werden: *L.-F. Tietze* und *U. Niemeyer*, Chem. Ber. **111**, 2423 (1978); *L.-F. Tietze* und *P. Marx*, ebenda **111**, 2441 (1978); *L.-F. Tietze* und *R. Fischer*, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 6) Weitere mögliche Vorstufen konnten durch Fütterungsversuche ausgeschlossen werden: *H. Inouye*, *S. Ueda*, *K. Inouye* und *Y. Takeda*, Tetrahedron Lett. **1971**, 4073; *A. R. Battersby*, J. Am. Chem. Soc., 163 rd. meeting, Boston 1972.
- 7) *G. Kinast* und *L.-F. Tietze*, Chem. Ber. **109**, 3626 (1976); *L.-F. Tietze*, J. Am. Chem. Soc. **96**, 946 (1974).
- 8) Es tritt zusätzlich ein schwaches Singulett bei $\delta = 3.69$ auf. Es muß daher angenommen werden, daß 6-Epihydroxyloganin-hexaacetat (**8d**) nicht völlig rein ist. Die Verunreinigung dürfte etwa 10% betragen.
- 9) *A. R. Battersby*, *E. S. Hall* und *R. Southgate*, J. Chem. Soc. C **1969**, 721.
- 10) Inzwischen ist es gelungen, die verschiedenen C-1- und C-1'-Isomeren von Iridoidglycosiden zu synthetisieren und ^1H -, ^{13}C -NMR- und massenspektroskopisch sowie chiroptisch eindeutig zuzuordnen. *L.-F. Tietze*, *U. Niemeyer*, *P. Marx* und *K.-H. Glüsenkamp*, Tetrahedron **36**, 1231 (1980); *L.-F. Tietze*, *U. Niemeyer*, *P. Marx*, *K.-H. Glüsenkamp* und *L. Schwenen*, ebenda **36**, 735 (1980).
- 11) *R. Guarnaccia*, *L. Botta* und *C. J. Coscia*, J. Am. Chem. Soc. **96**, 7079 (1974).
- 12) *K. M. Madyastha*, *R. Guarnaccia*, *C. Baxter* und *C. J. Coscia*, J. Biol. Chem. **248**, 2497 (1973).
- 13) *A. R. Battersby*, *R. S. Kapil*, *J. A. Martin* und *L. Mo*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1968**, 133.
- 14) Es ist hierbei jedoch durchaus denkbar, daß anstelle von Hydroxyloganin (**4a**) Hydroxyloganin-phosphat (**4b**) als Vorstufe dienen könnte.
- 15) *A. R. Battersby*, *A. R. Burnett* und *P. G. Parsons*, Chem. Commun. **190**, 826; *H. Inouye*, *S. Ueda*, *Y. Aoki* und *Y. Takeda*, Tetrahedron Lett. **1969**, 2351.
- 16) *A. R. Battersby*, *A. R. Burnett* und *P. G. Parsons*, J. Chem. Soc. C **1969**, 1187; *I. Souzu* und *H. Mitsuhashi*, Tetrahedron Lett. **1970**, 191.
- 17) *H. Inouye*, *S. Inouye*, *N. Shimokawa* und *M. Okigawa*, Tetrahedron Lett. **1968**, 683.
- 18) *J. J. Patridge*, *N. K. Chadha*, *S. Faber* und *M. R. Uskokovic*, Synth. Commun. **1**, 233 (1971).
- 19) *P. Loew*, Ch. v. Szczepanski, *C. J. Coscia* und *D. Arigoni*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1968**, 1276.
- 20) *A. R. Battersby*, *A. R. Burnett*, *G. D. Knowles* und *P. G. Parsons*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1968**, 1277.
- 21) *H. Inouye*, *S. Ueda* und *Y. Nakamura*, Tetrahedron Lett. **1966**, 5229; *H. H. A. Linde* und *M. S. Ragab*, Helv. Chim. Acta **50**, 991 (1967).
- 22) *A. R. Battersby*, *M. Thompson*, *K.-H. Glüsenkamp* und *L.-F. Tietze*, Chem. Ber. **114**, 3430 (1981), vorstehend.

[73/81]