

## 2. Zur Biosynthese des Dendrolasins, eines Inhaltsstoffes der Ameise *Lasius fuliginosus* LATR.

VON E. E. Waldner, Ch. Schlatter und H. Schmid

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich

(4. XI. 68)

*Summary.* By feeding the ant *Lasius fuliginosus* LATR. with [ $^{14}\text{C}$ ]-1-acetate, [ $^{14}\text{C}$ ]-2-acetate, [ $^{14}\text{C}$ ]-2-mevalonate, [ $^{14}\text{C}$ ]-1-glucose and [ $^{14}\text{C}$ ]-U-glucose, incorporation ratios of  $10^{-4}$  – 0,15% were obtained in the sesquiterpenoid dendrolasin. It was shown by analysis of the labelling pattern in dendrolasin that the insertions were spread over the whole molecule in exactly the manner that would be expected from terpene biosynthesis.

Die in Europa weit verbreitete schwarz glänzende Holzameise *Lasius fuliginosus* LATR. enthält zu ca. 1% des Lebendgewichtes das Sesquiterpen Dendrolasin. Der ölige Stoff wurde zuerst von PAVAN [1] isoliert. QUILICO, PIOZZI & PAVAN führten im Jahre 1957 die Strukturauflklärung aus<sup>1)</sup> [2].

Es ist interessant, dass Dendrolasin von japanischen Autoren auch im Fuselöl der süßen Kartoffel [3] und im Wasserdampfdestillat des Stammholzes von *Torreya nucifera* SIEB *et* ZUCC. [4] nachgewiesen wurde.

Die Struktur von Dendrolasin legt nahe, dass die Substanz wie andere Terpenoide aus Isopreneinheiten aufgebaut wird. Mit [ $^{14}\text{C}$ ]-2-Mevalonat als Vorläufer müssten die C-Atome 4, 8 und 12 je  $\frac{1}{3}$  der inkorporierten Aktivität, mit [ $^{14}\text{C}$ ]-1-Acetat die C-Atome 1, 3, 5, 7, 9 und 11 je  $\frac{1}{6}$  der Gesamtaktivität enthalten.

1966 berichteten CASTELLANI & PAVAN [5], dass beim Verfüttern von [ $^{14}\text{C}$ ]-2-Mevalonat an *Lasius fuliginosus* LATR. diese radioaktives Dendrolasin synthetisierten. Eine Inkorporierungsrate wurde nicht angegeben und ein Abbau des markierten Dendrolasins nicht ausgeführt.

Unabhängig von den Studien von CASTELLANI & PAVAN haben wir ebenfalls untersucht, ob an *Lasius fuliginosus* verabreichte radioaktive Vorläufer in Dendrolasin eingebaut werden.

In sechs Versuchen wurden je 30  $\mu\text{C}$  Natrium-[ $^{14}\text{C}$ ]-2-mevalonat zusammen mit dem Futter je 4–10 g Ameisen verabreicht. Die Tiere wurden nach wenigen Stunden bis 18 Tagen nach Zugabe von inaktivem Dendrolasin aufgearbeitet. Die Dendrolasinfraction wurde durch Chromatographie an Kieselgel, an Aluminiumoxid und durch Hochvakuumdestillation gereinigt. Hierauf wurde das schön kristallisierende Dienaddukt mit N-Phenyl-maleinimid bereitet, welches an Kieselgel chromatographiert und anschliessend mehrmals umkristallisiert wurde. Zwischen den Kristallisationen trat kein Aktivitätsabfall ein. Die Inkorporierungsraten sind in Tab. 1 wiedergegeben; sie sind ausserordentlich niedrig und liegen zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}\%$ . Auch mit radioaktivem Acetat waren die Einbauraten nicht wesentlich besser, mit Ausnahme eines

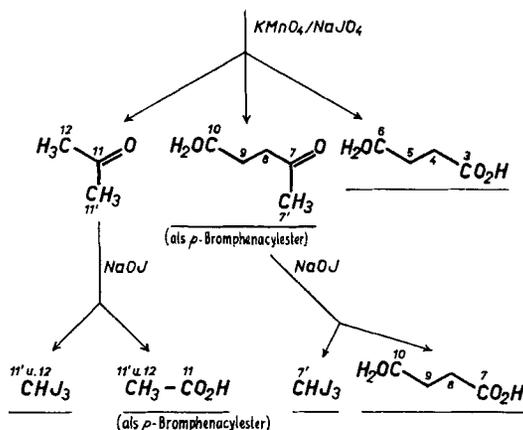
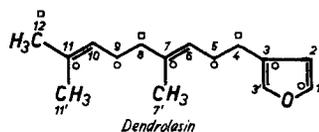
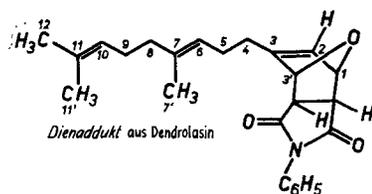
<sup>1)</sup> Das von Frl. Dr. R. MONDELLI, Istituto di Chimica del Politecnico Milano, Italien, aufgenommene und interpretierte 100-MHz-NMR.-Spektrum steht mit der Strukturformel in vollem Einklang (Privatmitteilung vom 13. 7. 1966).

Tabelle 1. Versuche mit radioaktiven Vorläufern

Ver-such Nr.	Monat	Radioaktive Vorläufer	Verabrei- chungsart	Aktivität*) im Pentan- auszug [%]	Einbaurate*) in Dendrolasin [%]	Aktivität*) in der Kohlen- wasserstoff- Fraktion [%]
1-6	Nov., Dez.	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	Fütterung	1,5	$2 \cdot 10^{-4}$ - $10^{-3}$	0,9
8-10	Jan.-Juni	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	Fütterung	1,5-4	$10^{-4}$ - $0,5 \cdot 10^{-3}$	1,1-3,2
11	August	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	Fütterung	1,35	$2 \cdot 10^{-2}$	0,9
13-15	Mai	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	Injektion	3-3,5	$3 \cdot 10^{-3}$ - $7 \cdot 10^{-3}$	3,1
17	Juli	<sup>14</sup> C-U-Glucose	Fütterung	11,7	$1,5 \cdot 10^{-1}$	0,1
18	Oktober	<sup>14</sup> C-U-Glucose	Fütterung	4,3	$\approx 10^{-5}$	nicht best.
19	Sept.	<sup>14</sup> C-1-Glucose	Fütterung	20	$4 \cdot 10^{-4}$	nicht best.
16	Feb.	T-U-Cholesterin	Fütterung	27	$\leq 10^{-4}$	nicht best.

\*) Bezogen auf die aus dem Futtergefäss aufgenommene Aktivität

## Formelschema



- erwartete Aktivität bei [<sup>14</sup>C]-2-Mevalonat-Fütterung  
 ○ erwartete Aktivität bei [<sup>14</sup>C]-1-Acetat-Fütterung

Versuches im August, in dem eine Inkorporierung von immerhin  $2 \times 10^{-2}\%$  beobachtet wurde. Bemerkenswert sind zwei Versuche mit uniform markierter Glucose. Beim Experiment im Juli betrug die Inkorporierung 0,15%, beim Versuch im Oktober wurde praktisch kein Einbau ( $\approx 10^{-5}\%$ ) festgestellt. Sehr klein war die Einbaurrate von  $[^{14}\text{C}]$ -1-Glucose und tritiiertem Cholesterin.

Trotz der sehr geringen Aktivität hat man das Dendrolasin nach folgendem Schema abgebaut (Formelschema 1): Durch  $\text{KMnO}_4/\text{Na}_2\text{J}_2\text{O}_4$ -Oxydation [6] erhielt man die drei Spaltstücke Aceton, Lävulinsäure und Bernsteinsäure. Das Aceton wurde direkt in Jodoform und Essigsäure umgewandelt, welche als *p*-Bromphenacylester gemessen wurde. Lävulinsäure wurde ebenfalls als *p*-Bromphenacylester, Bernsteinsäure nach Kristallisation und Sublimation direkt ausgezählt. Auch die Lävulinsäure hat man mit NaOJ abgebaut und die Spaltstücke Jodoform und Bernsteinsäure direkt bestimmt.

Die Dendrolasinpräparate aus den Versuchen 1–6 (Mevalonat-Fütterung) wurden vereinigt, die Präparate aus den Versuchen 10 und 11 (Acetat-Fütterung) sowie 17 (Glucose-Fütterung) getrennt abgebaut (s. Tab. 2). Trotz der durch die geringen Aktivitäten bedingten grossen Fehlerbreite von ca.  $\pm 10\%$  der angegebenen Werte sind unserer Ansicht nach die Aktivitäten des Jodoforms aus den C-Atomen 11' und 12 des Mevalonat- und Acetat-Dendrolasins sowie die Aktivität des Jodoforms aus dem C-Atom 7' (Acetat-Dendrolasin) deutlich verschieden von den Radioaktivitäten der beiden Jodoformpräparate aus dem  $[^{14}\text{C}]$ -U-Glucose-Dendrolasin, in welchem jedes C-Atom  $1/15$  der Aktivität besitzt. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass sowohl Acetat wie Mevalonat in der für Terpeneide gültigen Weise spezifisch in Dendrolasin eingebaut werden [7].

Tabelle 2. Verteilung der Aktivität in den Abbauprodukten von Dendrolasin  
(relative molare Aktivitäten)

Versuch Nr. radioaktive Vorläufer	1–6 Na- $^{14}\text{C}$ -2- Mevalonat	10 Na- $^{14}\text{C}$ -1- Acetat	11 Na- $^{14}\text{C}$ -1- Acetat	17 $^{14}\text{C}$ -U- Glucose
Dendrolasin	1,0	1,0	1,0	1,0
$\text{CHJ}_3$ (C-11' oder 12)	0,16	0,00	0,01	0,07
$\text{CH}_3\text{COOH}$ (C-11; C-11' oder 12)	0,15	0,18	0,13	0,13
$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (C-7', 7, 8, 9, 10)	0,30	0,36	0,31	0,33
$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (C-3, 4, 5, 6)	0,25	0,25	0,24	0,28
$\text{CHJ}_3$ (C-7')	–	–	0,00	0,07
$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (C-7, 8, 9, 10)	–	–	0,26	0,27

Bei der Chromatographie der Dendrolasin-haltigen Pentanextrakte wurde jedesmal eine rascher als Dendrolasin wandernde stark radioaktive Fraktion erhalten (s. Figur im exp. Teil). Die Aktivität dieser Fraktion belief sich bei den Mevalonat-Versuchen auf 0,9%, bei den Acetat-Versuchen auf 1,1–3,2% und beim  $[^{14}\text{C}]$ -U-Glucose-Versuch

auf 0,1% der gefütterten Aktivität (s. Tab.1). Diese Fraktion war unverseifbar und besteht auf Grund von gas-chromatographischen, chemischen und spektroskopischen Untersuchungen aus einem Gemisch von gerad- und verzweigt-kettigen gesättigten Kohlenwasserstoffen von  $C_{11}$  bis ca.  $C_{40}$ . Unverzweigte Kohlenwasserstoffe wurden bereits früher in Ameisen aufgefunden, so Undecan in *Lasius (Chthonolasius) umbratus* NYL. [8] sowie Undecan und Tridecan in *Lasius fuliginosus* LATR. [9].

Der Kohlenwasserstofffraktion aus den Mevalonat-Experimenten Nr. 1–6, welche einen gas-chromatographisch ermittelten Gehalt von 5,4% an Undecan besitzt, hat man reines inaktives Undecan zugefügt und dieses hierauf mit Hilfe von präparativer Gas-Chromatographie zurückgewonnen und anschliessend aus Pentan bei tiefer Temperatur umkristallisiert. Es besass danach 0,45% der Aktivität der entsprechenden Kohlenwasserstofffraktion. Die Inkorporierungsrate des Undecans beträgt daher  $3 \times 10^{-3}\%$ . Die Aktivität der Kohlenwasserstofffraktion beruht somit vorwiegend auf dem Einbau von  $^{14}C$  in höhere Kohlenwasserstoffe.

Die Aktivität von bis zu 3% der angebotenen «Tracer» im Pentanextrakt zeigt, dass die verabreichten wasserlöslichen Vorläufer von der Ameise aufgenommen werden und in den Stoffwechsel eingehen.

Wie erwähnt ist das aus *Lasius fuliginosus* LATR. isolierte radioaktive Dendrolasin mevaloniden Ursprungs. Für die sehr geringe Inkorporierungsrate für Mevalonat und Acetat gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten: 1. Die Ameise baut höchstens einen sehr kleinen Teil ihres Dendrolasins aus Acetat oder Mevalonat auf; die Hauptmenge entsteht auf einem anderen Weg. 2. Bei unseren Versuchen synthetisierten die Ameisen praktisch kein neues Dendrolasin. 3. Fremdorganismen bauen einen unbekanntem mevaloniden Vorläufer auf, der von der Ameise für die Dendrolasin-Synthese verwendet werden kann. 4. Die verfütterten oder injizierten Vorläufer Acetat und Mevalonat werden zwar von der Ameise metabolisiert (siehe den relativ starken Einbau in die Kohlenwasserstofffraktion), gelangen aber aus irgendwelchen Gründen nur zu einem sehr kleinen Teil an den Ort der Biosynthese des Dendrolasins. 5. Das in der Ameise enthaltene Dendrolasin stammt vollständig aus der Nahrung. Da der Dendrolasingehalt 1% beträgt, erachten wir diese Hypothese für unwahrscheinlich.

Über die Biosynthese von isoprenoiden Insekteninhaltsstoffen ist allgemein noch wenig bekannt. Nach SCHMIALEK [10] wird  $[^{14}C]$ -2-Mevalonat von *Samia cynthia* (Wildseidenspinner) in Farnesol, Farnesal und Nerolidol, und nach HAPP & MEINWALD [11] wird derselbe Vorläufer, sowie  $[^{14}C]$ -1- und -2-Acetat, durch die Ameise *Acanthomyops claviger* (ROGER) in Citronellal und Citral eingebaut. Angaben über Einbauraten fehlen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, beobachteten CASTELLANI & PAVAN [5] den Einbau von  $[^{14}C]$ -2-Mevalonat durch *Lasius fuliginosus* in Dendrolasin. Auch hier fehlt die Angabe der Einbaurate. Etwas später haben MEINWALD, HAPP, LABOWS & EISNER [12] bei der Gespenstheuschrecke *Anisomorpha buprestoides* die Inkorporierung von Acetat (Einbaurate  $4-8 \times 10^{-2}\%$ ) und  $[^{14}C]$ -2-Mevalolacton (Einbaurate  $8 \times 10^{-3}\%$ ) in das cyclopentanoide Terpen Anisomorphal gefunden. In keinem Fall wurde ein Abbau durchgeführt. Die Frage, ob die verabreichten Vorläufer spezifisch in die untersuchten Terpene eingebaut werden, ist somit noch offen. In diesem Zusammenhang von Interesse sind die Befunde, wonach Insekten nicht imstande sind, Steroide aus Terpenvorläufern zu synthetisieren [13]. So haben CLARK & BLOCH [14] gefunden, dass der Käfer *Dermestes vulpinus* FABR. weder  $[^{14}C]$ -1-Acetat noch  $[^{14}C]$ -

U-Fructose in Squalen oder Steroide einbaut. Aktivität fand sich hingegen in einer Mischung gesättigter, unverzweigter aliphatischer Kohlenwasserstoffe (Molekulargewicht ca. 346) und in einer aliphatischen Alkoholfraction (Molekulargewicht ca. 395).

Wir danken sehr Herrn Dr. H. KÜTTER (Männedorf ZH) und Herrn Dr. W. HANGARTNER (zur Zeit Harvard University USA) für ihre Hilfe und Ratschläge; zu danken haben wir ferner Herrn Prof. Dr. K. GROB (Zürich) für gas-chromatographische Untersuchungen, Herrn E. KUBLI (Zürich) für die Injektionsversuche, Herrn H. FROHOFER (Mikroanalytisches Labor) für die Radioaktivitätsbestimmungen und dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS für die gewährte Unterstützung.

### Experimenteller Teil

1. *Fütterungsversuche.* Die verwendeten Ameisen *Lasius fuliginosus* LATR. (nur Arbeiterinnen) wurden für jeden Versuch frisch in der Umgebung von Zürich gesammelt. Die Ameisen wurden in Kristallisierschalen von 25 cm Durchmesser, die am Rande mit Paraffin eingerieben und mit Gaze verschlossen waren, gehalten. Die Schalen goss man mit Gips aus, der ständig feucht gehalten wurde. Pro Versuch wurden 4–10 g Ameisen verwendet, die erst 1–2 Tage nach dem Sammeln gefüttert wurden. Als Futternäpfe dienten kleine Plastikschälchen (30 × 5 mm). Die verwendeten Futterlösungen sind in der nachstehenden Tab. 3 aufgeführt. Am Anfang wurden 1–2 ml Futterlösung gegeben. Anschliessend wurde regelmässig mit Wasser nachgefüllt. Bei den Versuchen 17 bis 19 wurden zweimal im Abstand von einigen Std. je 200–300 Ameisen aus einem fremden Nest zugesetzt. Weitere Angaben s. Tab. 3.

2. *Isolierung und Abbau von Dendrolasin.* – 2.1. *Allgemeine Bemerkungen:* Smp. auf Schmelzpunktmikroskop METTLER FP 2. Dünnschichtchromatogramme an Kieselgel MERCK HF<sub>254</sub>. Farb-reaktion mit 0,5 g Vanillin in 50 ml konz. Salzsäure (Vanillinreaktion). Präparative Chromatogramme an Kieselgel MERCK (0,05–0,2 mm) Laufmittel für Dünnschicht- und präparative Chromatographien: Pentan; Benzol; Pentan/Äther = 5/1. Gas-Chromatogramme: CARLO ERBA, Modell D, FID, und AEROGRAPH, Modell 1520 B. Säulen: Glas 75 m  $\varnothing$  0,04 mm, 8% Emulphor; Glas 37 m, *idem.*; Glas 30 m  $\varnothing$  0,04 mm, 8% Ucon; Glas 20 m  $\varnothing$  0,033 mm, Polytrifluorchloräthylen SE 30. Stahl 1,2 m  $\times$  1,8", 10% Emulphor Chromosorb W 100/120 mesh. Abdampfoperationen im Rotationsverdampfer bei 30–40°/12 Torr. Destillationen im Kugelrohr und Luftbad bei 10<sup>-3</sup> Torr. Die Radioaktivitätsbestimmungen hat man mit Hilfe eines Flüssigkeits-Szintillationspektrometers Tricarb Mod. 314 EX (PACKARD INSTRUMENT CO., Ill. USA) ausgeführt. Die Verbindungen, 1–7 mg, wurden in einem Gemisch aus 10 ml Szintillationslösung, 6,5 ml Methanol und 1,5 ml einer 10-proz. methanolischen Äthanolaminlösung aufgenommen. Die Szintillationslösung bestand aus 4,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 100 mg POPOP (1,4-Bis-[2-(5-phenyloxazolyl)]-benzol) in 1000 ml reinem Toluol. Zählausbeute: 55%. Allfällig auftretende Lösch-Effekte wurden berücksichtigt. Nach Möglichkeit wurden Doppel- oder Mehrfachbestimmungen ausgeführt. Die zu bestimmenden Präparate zeigten eine sehr geringe Aktivität, in der Regel etwa 10 cpm über dem Blindwert. Die Proben wurden auf einen statistischen Standardfehler von  $\pm$  5% ausgezählt. Geschätzte Reproduzierbarkeit der Messungen:  $\pm$  10%.

2.2. *Isolierung von Dendrolasin:* Ca. 500 g frisch gesammelte Ameisen hat man im Mixer mit wenig Pentan zerkleinert und den Brei so lange mit Pentan extrahiert, bis der Extrakt keine Vanillinreaktion (rotviolett) mehr gab. Nach dem Filtrieren wurde der Extrakt getrocknet, eingedampft und der dunkelbraune, ölige Rückstand über 600 g Kieselgel mit Pentan filtriert. Man eluierte so lange mit Pentan, bis die Auszüge keine Vanillinreaktion mehr gaben. Das eingedampfte Pentaneluat hat man an 150 g Kieselgel mit Pentan chromatographiert, wobei folgende Fraktionen erhalten wurden: 2.2.1.: 2,1 g; 2.2.2.: 4,3 g; 2.2.3.: 0,7 g eines gelben Öles.

Die *Fraktion 2.2.2.* stellte im wesentlichen Dendrolasin dar. Gas-chromatographisch war das Präparat mindestens zu 95% rein. Zur weiteren Reinigung wurde das Dendrolasin bei 80° im Hochvakuum destilliert.  $n_D^{20} = 1,489$ . IR.-Spektrum (Film): Banden bei 1667, 1563, 1504, 1164, 1063, 1024, 871, 830, 772  $\text{cm}^{-1}$ . MS.-Spektrum [ $m/e$  (%)] : 218 ( $M^+$ , 2), 203 (6), 175 (10), 136 (9,5), 123 (5), 95 (10), 82 (17), 81 (95), 69 (100), 53 (39), 41 (88), 39 (21). – Diese physikalischen Daten stimmen mit den in der Literatur für Dendrolasin gegebenen Werten [2] [9] überein. Das so erhaltene Dendrolasin wurde bei den Fütterungsversuchen zum Verdünnen verwendet.

Tabelle 3. Fütterungsbedingungen

Versuch Nr.	Datum	Dauer [Tage]	Futtermischung	Zugesetzter Tracer	Gefütterte Aktivität [ $\mu\text{C}$ ] <sup>a)</sup>	Menge [mM] des Vorläufers	Einbau- rate <sup>b)</sup> im Dendrolasin [%]
1	Nov. 66	0,1	20-proz. wässrige Rohrzuckerlösung	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	30	$8,5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
2	Nov. 66	0,2	20-proz. wässrige Rohrzuckerlösung	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	30	$8,5 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-4}$
3	Nov. 66	1	20-proz. wässrige Rohrzuckerlösung	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	30	$8,5 \cdot 10^{-3}$	$10^{-3}$
4	Dez. 66	2	Bienenhonig/Wasser = 1/1	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	30	$8,5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
5	Dez. 66	10	Bienenhonig/Wasser = 1/1	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	30	$8,5 \cdot 10^{-3}$	
6	Dez. 66	18	Bienenhonig/Wasser = 1/1	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	30	$8,5 \cdot 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
7 <sup>c)</sup>	Mai 67	0,1	Baden <sup>c)</sup>	Na- <sup>14</sup> C-2-Mevalonat	1,5	$4,2 \cdot 10^{-4}$	- <sup>c)</sup>
8	Jan. 67	4	20-proz. wässrige Rohrzuckerlösung	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	100	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$\leq 10^{-4}$
9	Mai 67	1	Wasser mit Mehlwurmbrei	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	50	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$
10	Juni 67	2	Honig mit Wasser und Mehlwurmbrei	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	1000	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
11	Aug. 67	50	Honig mit Wasser und Mehlwurmbrei	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	500	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-2}$
12 <sup>c)</sup>	Mai 67	1,7	Baden <sup>c)</sup>	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	-	-	- <sup>c)</sup>
13 <sup>d)</sup>	Mai 67	0,2	Injektion <sup>d)</sup>	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	0,2	$3 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-3d)}$
14 <sup>d)</sup>	Mai 67	0,4	Injektion <sup>d)</sup>	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	0,2	$3 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-3d)}$
15 <sup>d)</sup>	Mai 67	1	Injektion <sup>d)</sup>	Na- <sup>14</sup> C-1-Acetat	0,2	$3 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-3d)}$
16 <sup>e)</sup>	Feb. 67	2	Rohrzucker mit Wasser und Mehlwurmbrei <sup>e)</sup>	T-U-Cholesterin	1000	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$\leq 10^{-4}$
17	Juli 67	16	Honig mit Wasser und Mehlwurmbrei	<sup>14</sup> C-U-Glucose	200	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$
18	Okt. 67	2	Honig mit Wasser und Mehlwurmbrei	<sup>14</sup> C-U-Glucose	100	$6 \cdot 10^{-3}$	$\approx 10^{-5}$
19	Sept. 67	7	Honig mit Wasser und Mehlwurmbrei	<sup>14</sup> C-1-Glucose	50	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-4}$

a) Gefütterte Aktivität = angebotene Aktivität - im Futtergefäß zurückisolierte Aktivität. Bei allen Versuchen war die zurückgewonnene Aktivität  $< 5\%$ .

b) Einbaureate in % ist gleich  $100 \times$  Gesamtaktivität des Dendrolasins/gefütterte Aktivität.

c) Je 100 Ameisen wurden in einem 100-ml-Rundkolben mit 2 ml wässriger Tracerlösung «gebadet».

d) Tracer gelöst in 0,03 ml Insekten-Ringer-Lösung; Injektionen in 30 Ameisen.

e) Das in wenig Äther gelöste radioaktive Cholesterin hat man mit dem Futterbrei verrieben.

2.3. *Dienaddukt von Dendrolasin*: 50 mg reines Dendrolasin und 50 mg frisch im Hochvakuum sublimiertes N-Phenyl-maleinimid in 5 ml Toluol liess man 24 Std. bei 20° stehen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand an 5 g Kieselgel chromatographiert. Pentan eluierte überschüssiges N-Phenylmaleinimid, Pentan/Äther = 1/5 das Dienaddukt. Smp. der farblosen Plättchen nach dem Umkristallisieren aus Äther/Pentan: 111,5–112°. Ausbeute 86 mg (96%). IR.-Spektrum (KBr): 1712, 1783  $\text{cm}^{-1}$  (Imid). NMR.-Spektrum (100 MHz), ( $\text{CDCl}_3$ , Tetramethylsilan als externer Standard): 7,20–7,47 ppm (5 H, Aromatenmultiplett), 6,07 ppm (H-C(6), Triplett,  $J \approx 1$  Hz), 5,30 ppm (H-C(10), Triplett  $J \approx 1$  Hz), 5,14 (H-C(2), Singulett), 5,08 (H-C(3') und H-C(1), Multiplett), 3,03 und 2,95  $\left( \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{N} \quad \text{O} \end{array} \right)$ , je 1 Dublett,  $J \approx 7$  Hz), 2,26 und 2,02  $\left( \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} \right)$  und  $\left( \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} \right)$ , je 1 Multiplett), 1,69  $\left( \begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{H} \end{array} \right)$  (7'), Singulett), 1,62  $\left( \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} \right)$  (11'), Singulett). MS.-Spektrum [ $m/e$  (%): 391 ( $M^+$ , 4), 376 (1,5), 348 (0,5), 335 (2), 333 (1), 308 (1), 218 (14), 203 (12), 175 (26), 174 (26), 173 (67), 81 (78), 69 (100).

2.4. *Oxydativer Abbau von Dendrolasin*: 100 mg (0,46 mMol) Dendrolasin wurden während 5 Std. bei 20° unter Lichtausschluss mit einer Lösung von 2,6 g (12 mFG)  $\text{NaJO}_4$ , 50 mg (0,32 mFG)  $\text{KMnO}_4$ , 400 mg  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 200 ml Wasser kräftig gerührt. Anschliessend wurde mit einer Eis/Kochsalz-Mischung gekühlt und die klare violette Lösung mit einer Lösung aus 10 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  und 7 ml konz. HCl in 50 ml Wasser titriert, bis die Reaktionslösung klar und nurmehr hellgelb gefärbt war. Anschliessend wurden 50 ml abdestilliert und das Aceton enthaltende Destillat unter guter Kühlung aufgefangen.

2.4.1. Dieses *Destillat* wurde dann mit 10-proz. wässriger Natronlauge stark alkalisch gestellt und mit 10 ml einer Lösung aus 200 g KJ und 100 g  $\text{J}_2$  in 800 ml Wasser versetzt. Man liess 2 Std. bei 20° stehen, entfernte überschüssiges Jod durch Zugabe von Natronlauge und schüttelte das Reaktionsgemisch mit Methylchlorid aus. Die Methylchloridphase wurde mit 1N NaOH gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das erhaltene *Jodoform* (150 mg, 83%) wurde zur Reinigung dreimal bei 50° im Hochvakuum sublimiert.

2.4.2. Die *alkalische Lösung aus der Jodoformreaktion* hat man mit starker Schwefelsäure angesäuert und das überschüssige Jod mit einer 10-proz.  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung unter Zusatz von wenig Stärke titriert. Aus einer KUNN-ROTH-Apparatur destillierte man ca. 300 ml Wasser ab, titrierte mit 0,1N Natronlauge (Phenolphthalein), dampfte stark ein und setzte 5 ml Dimethylformamid und 85 mg (110%) *p*-Bromphenacylbromid zu. Nach 2 Std. Rühren bei Zimmertemperatur wurde im Hochvakuum eingedampft und der Rückstand an einer Kieselgelplatte mit Benzol chromatographiert. Der erhaltene *Essigsäure-p-Bromphenacyl-ester* (55 mg, 42%) wurde im Hochvakuum destilliert, aus Aceton/Pentan umkristallisiert und zur Analyse nochmals destilliert: Smp.: 84,3–85°.

2.4.3. Die *ursprüngliche wässrige Oxydationslösung* (2.4.) wurde angesäuert und erschöpfend mit Äther extrahiert. Der eingedampfte Ätherextrakt lieferte 90 mg (ca. 85%) eines Gemisches von Lävulin- und Bernsteinsäure. Dieses Gemisch nahm man in 10 ml Chloroform auf und zentrifugierte die unlösliche *Bernsteinsäure* ab. Die überstehende Lösung wurde eingedampft und der Rückstand bei 120–130° destilliert. Das Destillat enthielt, wie die folgenden Kontrollexperimente zeigten, höchstens Spuren von Bernsteinsäure. Zur Kontrolle wurde die destillierte Lävulinäurefraktion in 5 ml  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{Äther}$  (1/1) aufgenommen und auf die übliche Weise mit Diazomethan in der Kälte umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde eingedampft, in Äther gelöst und gaschromatographisch auf den Gehalt an Bernsteinsäure-dimethylester untersucht. Es konnte neben dem *Lävulinäure-methylester* kein Bernsteinsäure-dimethylester festgestellt werden. – Die Hälfte der erhaltenen *Lävulinäure* nahm man in wenig Wasser auf und wandelte sie in der oben beschriebenen Weise in den *p-Bromphenacyl-ester* um, der durch Chromatographie und Umlösen in Aceton/Pentan gereinigt wurde. Smp. 82,5–83,3°; Ausbeute 25 mg (38%).

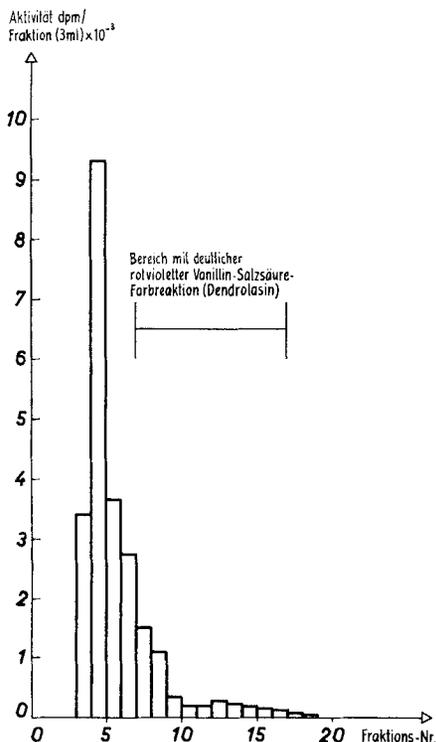


2.4.4. Die andere Hälfte der *Lävulinäure* hat man mit 10 ml der unter 2.4.1. beschriebenen Jodlösung oxydiert und wie dort angegeben auf *Jodoform* aufgearbeitet. Ausbeute 24 mg.

2.4.5. Aus der *alkalischen Lösung der Jodoformreaktion* erhielt man nach Ansäuern mit starker Schwefelsäure, Titration mit  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung und erschöpfender Ätherextraktion nach dem Eindampfen des Destillates einen Rückstand, der in gutem Hochvakuum bei  $90^\circ$  sublimiert (16 mg), aus Methanol/Hexan umkristallisiert und nochmals sublimiert wurde. Smp. der so erhaltenen *Bernsteinsäure*  $183,2-184,2^\circ$ .

2.4.6. Die ursprünglich (2.4.3.) erhaltene, mit Chloroform gewaschene *Bernsteinsäure* (35 mg) wurde ebenfalls durch Umkristallisation aus Methanol/Hexan und Sublimation gereinigt. Smp.  $184,1-185,2^\circ$ .

3. *Isolierung und Abbau von Dendrolasin aus den Fütterungsversuchen.* Nach Beendigung der Fütterung hat man die 4–10 g Ameisen nach Tiefkühlung und Zugabe von 135–365 mg inaktivem Dendrolasin mit Pentan homogenisiert. Anschliessend wurde der Brei erschöpfend mit Pentan extrahiert (SOXHLET). Die Pentanlösung wurde auf ca. 25 ml eingengt und mit 1N NaOH, 1N HCl und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde der Rückstand wie unter 2.2. beschrieben an 6 g Kieselgel chromatographiert. Eine typische Verteilung der Radioaktivität bei diesen Chromatographien zeigt die Figur. Die Dendrolasin-haltigen Fraktionen wurden an 1,5 g neutralem Alox WöELM III und dann nochmals an 1,5 g Kieselgel chromatographiert. Das so erhaltene Dendrolasin wurde zweimal im Hochvakuum destilliert. Ausbeute je nach Ansatz 100–200 mg geruch- und farbloses Öl. Dieses Material wurde zum Teil in das Dienaddukt umgewandelt, der grösste Teil dem Abbau wie unter 2.4. beschrieben unterworfen. Die Resultate sind im theoretischen Teil wiedergegeben.



Kieselgelchromatographie des Pentanextraktes aus Ameisen des Fütterungsversuches Nr. 3

4. *Citral.* Die *Fraktion 2.2.3.* enthielt auf Grund von dünn-schichtchromatographischer und gas-chromatographischer Evidenz ein Gemisch von *cis*- und *trans*-Citral, in dem letzteres vorherrscht. Bei den Experimenten 3, 5 und 6 wurden nach Abtrennung des Dendrolasins die Citral enthaltenden Fraktionen mit 100 mg inaktivem Citral versetzt und das Ganze in üblicher Weise [15] in das 2,4-Dinitrophenylhydrazon umgewandelt. Das erhaltene Rohprodukt wurde an einer

Dünnschichtplatte aus Kieselgel mit Benzol chromatographiert und aus Essigester/Pentan umkristallisiert. Das Dinitrophenylhydrazon hat man vor der Aktivitätsmessung im Hochvakuum getrocknet. Es handelt sich um ein Gemisch von *cis*- und *trans*-Citral-2,4-dinitrophenylhydrazon. Smp. 118,5°. Aktivität  $\leq 200$ –600 dpm/mMol. In analoger Weise wurde noch Citral aus dem Experiment 19 gewonnen. Das Präparat war praktisch inaktiv.

5. *Kohlenwasserstoffe*. Die Fraktion 2.2.1. (2,1 g) stellte im wesentlichen ein Gemisch aus Kohlenwasserstoffen dar. Nach dem Trocknen gab sie folgende Daten: IR. (Film): 2933, 1464, 1379, 870,3, 717,4  $\text{cm}^{-1}$ . NMR.-Spektrum ( $\text{CCl}_4$ ): keine Signale in der Region von 2,0–7 ppm; Multiplctt zwischen 1,9 und 0,6 ppm mit breitem Singulett bei 1,26 und Multiplctt mit Zentrum bei 0,9 ppm. Das Integralverhältnis des Bereiches von 1,9 bis 1,0 ppm zu dem von 1,0 bis 0,6 ppm entspricht 2,2:1. Dies würde ein Verhältnis von Methyl- zu Methyl-Gruppen = 3,3 ergeben. Bei der Gas-Chromatographie (Glaskapillarkolonne, Temperatur bis 190°) liessen sich etwa 30 Hauptpikie erkennen, mit geschätztem maximalen Molekulargewicht von 562. Massenspektrometrisch liessen sich von der Kohlenwasserstofffraktion Molekulargewichtspike bis ca. *m/e* 600 feststellen. Gaschromatographisch liess sich in dieser Kohlenwasserstofffraktion ein Gehalt von 5,4% an *n*-Undecan nachweisen. (Quantitative Bestimmung mit *n*-Tetradecan als Eichsubstanz.)

$(\text{CH}_2)_n$  ( $n \times 14,03$ ) Ber. C 85,60 H 14,40% Gef. C 85,68; 86,01 H 14,49; 14,64%

Ein Teil dieser Kohlenwasserstofffraktion wurde mit ca. 5 mg der entsprechenden radioaktiven Kohlenwasserstofffraktion aus Mevalonat-Fütterungsversuchen Nr. 1–6 versetzt. Nach 15-stdg. Kochen mit etwa 5*N* äthanolisch wässriger Kalilauge fand sich die gesamte Aktivität im unverseifbaren Anteil wieder. Die Kohlenwasserstofffraktion wurde beim Erhitzen mit  $\text{KMnO}_4$  in Aceton, beim Behandeln mit  $\text{H}_2/\text{Pt}$  in Eisessig (keine Wasserstoffaufnahme) oder beim Kochen mit überschüssigem  $\text{LiAlH}_4$  in Äther gemäss den Gas-Chromatogrammen nicht in signifikanter Weise verändert. Es handelt sich auf Grund der oben angeführten Daten bei dieser Neutralfraktion um ein Gemisch von gesättigten verzweigten und unverzweigten Kohlenwasserstoffen.

25 mg der aus den Mevalonat-Fütterungsversuchen Nr. 1–6 erhaltenen Kohlenwasserstofffraktion (undestilliert) wurden in 2 ml wasserfreiem Pyridin und 2 ml wasserfreiem Acetanhydrid während 12 Std. auf 60° erwärmt. Das Reaktionsgemisch hat man hierauf im Hochvakuum eingedampft, den Rückstand mit Eiswasser während 30 Min. kräftig gerührt und dann mit Pentan ausgeschüttelt. Die Pentanfraktion hat man nacheinander mit 2*N*  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , konz.  $\text{NaHCO}_3$  und konz.  $\text{NaCl}$ -Lösung mehrmals gewaschen, über wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingedampft. Das IR.-Spektrum (Film) des erhaltenen Produktes war vollständig identisch mit demjenigen der unbehandelten Kohlenwasserstofffraktion, insbesondere konnte keine Carbonylbande festgestellt werden.

6. *Isolierung von radioaktivem Undecan*. 240 mg der aus den Mevalonat-Fütterungsversuchen erhaltenen Kohlenwasserstofffraktion (Aktivität 5300 dpm/mg) wurde im Hochvakuum bis 150°/10<sup>-4</sup> Torr destilliert (Gewicht des Destillats 190 mg, Aktivität 4600 dpm/mg; Gewicht des Rückstandes 50 mg, Aktivität 7900 dpm/mg). 78 mg dieses Destillates (4600 dpm/mg) wurden mit 497 mg reinstem Undecan verdünnt und das Ganze einer präparativen Gas-Chromatographie (F+M Mod. 770, Säule: 16% XE 60 auf Chromosorb W (AW-DMST) 60–80 mesh, 2,44 m  $\times$  19 mm) unterworfen. Das erhaltene Undecan wurde bis zur Aktivitätskonstanz in einem Kohlensäure/Aceton-Gemisch aus Pentan umkristallisiert und im Hochvakuum destilliert. Gefundene Aktivität 3,3 dpm/mg. Das Undecan enthält somit 0,45 % der Aktivität der Kohlenwasserstofffraktion. Die Inkorporierungsrate in Undecan beträgt  $3 \times 10^{-3}$  %.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. PAVAN, Ric. sci. 26, 144 (1956).
- [2] A. QUILICO, F. PIOZZI & M. PAVAN, Ric. sci. 26, 177 (1956); Tetrahedron 1, 177 (1957).
- [3] Y. HIROSE, M. ABU & Y. SEKIYA, J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. (Nippon Kagaku Zasshi) 82, 725 (1961).
- [4] T. SAKAI, K. NISHIMURA & Y. HIROSE, Bull. chem. Soc. Japan, 38, 381 (1965); vgl. A. J. BIRCH, R. MASSY-WESTROFF & S. E. WRIGHT, Austral. J. Chemistry 6, 385 (1953); T. KUBOTA & T. MATSUURA, Chemistry & Ind. 1957, 491.
- [5] A. A. CASTELLANI & M. PAVAN, Boll. Soc. ital. Biol. sperim. 42, fasc. 20bis, 221 (1966).

- [6] E. V. RUDLOFF, *Canad. J. Chemistry* **43**, 2660 (1965).  
[7] J. H. RICHARDS & J. B. HENDRICKSON, «The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins», W. A. Benjamin, New York 1964.  
[8] A. QUILICO, F. PIOZZI & M. PAVAN, *Rend. Ist. lombardo, Sci.* **91**, 271 (1957).  
[9] R. BERNARDI, C. CARDANI, D. GHIRINGELLI, A. SELVA, A. BAGGINI & M. PAVAN, *Tetrahedron Letters* **40**, 3893 (1967).  
[10] P. SCHMALEK, *Z. Naturforsch.* **18b**, 462 (1963).  
[11] G. M. HAPP & J. MEINWALD, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2507 (1965).  
[12] J. MEINWALD, G. M. HAPP, J. LABOWS & T. EISNER, *Science* **151**, 79 (1966).  
[13] R. B. CLAYTON, *J. Lipid Res.* **5**, 3 (1964).  
[14] A. J. CLARK & K. BLOCH, *J. biol. Chemistry* **234**, 2578 (1959).  
[15] R. L. SHRINER, R. C. FUSON & D. Y. CURTIN, «The Systematic Identification of Organic Compounds», S. 219, J. Wiley, New York 1962.

---

### 3. Sur les constituants odorants de l'essence absolue de Cassie (*Acacia farnesiana* WILLD.)<sup>1)</sup>

par E. Demole, P. Enggist et M. Stoll

FIRMENICH & CIE, Laboratoire de Recherches, Genève

(6 XI 68)

*Summary.* The absolute oil of cassie (*Acacia farnesiana* WILLD.) has been thoroughly investigated by using several combined chromatographic techniques. Among the 38 new constituents which were thus identified in this oil, four deserve a particular mention, namely, the *cis*-3-methyl-dec-3-en-1-ol (I), the related acid III, the *trans*-3-methyl-dec-4-enoic acid (IV), and the homoterpene lactone dihydroactinidiolide (II). With the exception of the last one, these unusual C<sub>11</sub> compounds play a prominent role in the characteristic fragrance of cassie oil.

*Introduction.* La cassie ancienne (*Acacia farnesiana* WILLD.) est une plante buissonnière et épineuse croissant à l'état sauvage dans de nombreux pays chauds. On la cultive dans diverses contrées du bassin méditerranéen pour en extraire un parfum agréable, particulièrement apprécié dans les compositions à odeur de violette et d'iris. Malheureusement, cette essence tend à se raréfier peu à peu dans le commerce, aussi avons-nous entrepris d'en mettre au point une *reconstitution synthétique fidèle*, offrant l'avantage d'un coût et d'une accessibilité parfaitement stables. Dans cette perspective, nous avons tout d'abord soumis l'absolue naturelle à une analyse chimique poussée, et reconnu ainsi ses constituants les plus importants sur le plan olfactif: ce travail fait l'objet de la présente publication. Il s'apparente, par le but poursuivi, à notre précédente étude de l'essence de jasmin (*Jasminum grandiflorum* L.) [1].

L'essence de cassie ancienne a déjà fait l'objet de plusieurs investigations chimiques [2]. Au début du siècle, les chercheurs de SCHIMMEL & Co [3] décelèrent parmi ses constituants: les aldéhydes benzoïque, anisique, décylrique et cuminique; deux cétones présentant respectivement une odeur de menthe et de violette; des traces de *p*-crésol; le salicylate de méthyle et l'alcool benzylique. Le farnésol fut en outre détecté par HAARMANN & REIMER [4] en 1904 dans les parties lourdes de l'essence. Plus récemment enfin, en 1950, LA FACE [5] découvrit, dans une absolue de cassie pro-

<sup>1)</sup> Ce travail a été commencé au M.I.T. (Cambridge, USA), lors d'un séjour de E.D. (Postdoctoral Fellow 1964–1965) dans le service du Professeur G. BÜCHT. Nous exprimons à ce dernier notre entière gratitude pour sa très aimable collaboration.