

86. Einbauversuche mit Geraniol und Farnesol in Cantharidin

4. Mitteilung zur Biosynthese des Cantharidins¹⁾²⁾

von Martin G. Peter³⁾⁴⁾, Wolf-Dietrich Woggon⁵⁾, Christian Schlatter⁶⁾ und Hans Schmid[†]

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(9.2.77)

On the incorporation of geraniol and farnesol into cantharidin

Summary

Earlier investigations [1] have shown that cantharidin (**1**) is biosynthesized by the male *Lytta vesicatoria* L. (*Meloidae*, *Coleoptera*) from the common terpenoid precursors mevalonate and farnesol (**3**). To prove if geraniol (**2**) is incorporated *via* farnesol (**3**) into cantharidin (**1**) the following geraniols have been synthesized and injected into either larvae or male adult *Lytta vesicatoria*, partly in a mixture with synthetic 11',12'-[³H]-farnesol as an internal standard: 2-[¹⁴C]-, 7-[¹⁴C]-, 7',8-[¹⁴C]-, 7',8-[³H]-geraniol. Unexpectedly, geraniol (**2**) was not specifically incorporated into cantharidin (**1**) perhaps due to its higher toxicity or its faster degradation relative to the other precursors before incorporation. The incorporation of U-[¹⁴C]-leucine, U-[¹⁴C]-isoleucine and 1-[¹⁴C]-glucose into cantharidin (**1**) *via* their metabolites is evident by degradation studies, whereas 1-[¹⁴C]- and 2-[¹⁴C]-glycine do not serve as precursors for cantharidin (**1**).

1. Einleitung. - In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass Cantharidin (**1**), der charakteristische Inhaltsstoff der Käfer *Lytta vesicatoria* L. («Spanische Fliege», *Meloidae*, *Coleoptera*) von den Insekten aus Acetat bzw. Mevalonat biosynthetisiert wird [2]. Nach Applikation von 1-[¹⁴C]-Acetat und 2-[¹⁴C]-Mevalonat an männliche adulte Tiere wurde die in Tab. 1 wiedergegebene Aktivitätsverteilung im Cantharidin gefunden. Die Einbaurate betrug *ca.* 0,2%⁷⁾. Die Resultate wurden im wesentlichen von Günther, Ramstad & Floss [3] bestätigt. Weibliche *Lytta vesicatoria*

1) 3. Mitt. siehe [1].

2) Korrespondenzautor: W.-D. Woggon.

3) Teil der Dissertation, Universität Zürich 1973.

4) Neue Adresse: Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Max-Planck-Str. 1, D-5300 Bonn.

5) Teil der Dissertation, Universität Zürich 1975.

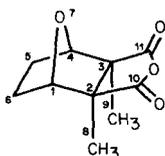
6) Neue Adresse: Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich, Schorenstrasse 16, CH-8603 Schwerzenbach.

7) Die Einbaurate bezieht sich auf die insgesamt aus den Insekten extrahierbare Radioaktivität (= 100%).

Tabelle 1. *Isopenverteilung im Cantharidin nach Injektion von 1-[¹⁴C]-Acetat bzw. 2-[¹⁴C]-Mevalonat [2]*
 (Angaben in % der Totalaktivität)

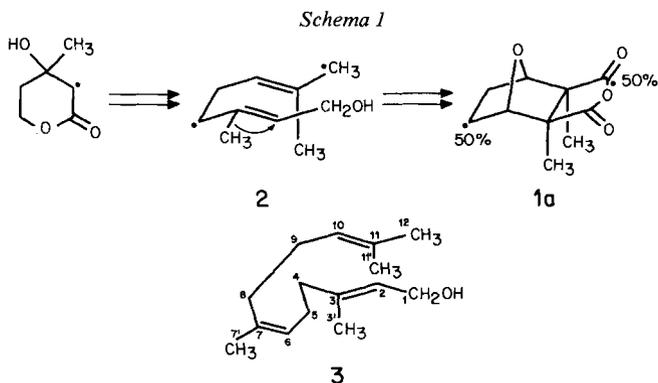
	Acetat-Experiment	Mevalonat-Experiment
Cantharidin	100	100
C(2), C(3), C(8) und C(9)	67	18
C(2) und C(3)	66	< 1
C(8) und C(9)	< 1	17
C(10) und C(11)	< 1	20

bauten diese Vorläufer nicht in Cantharidin ein. Das aus 2-3 Wochen alten weiblichen Insekten isolierbare Cantharidin stammt, wie kürzlich nachgewiesen wurde [1], von den männlichen Käfern. Nach Injektion von 2-[³H, ¹⁴C]-Mevalonat in männliche *Lytta vesicatoria* wird das biosynthetisierte Cantharidin während der Kopulation praktisch quantitativ in die Weibchen übertragen und anschliessend an das Eigelege weitergegeben [4].



1

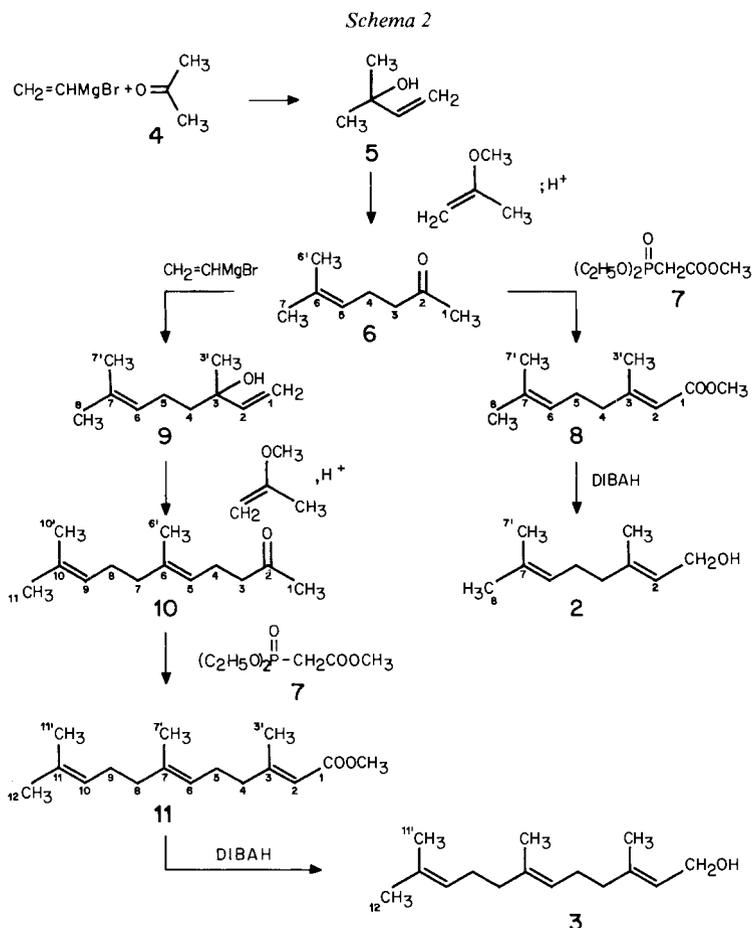
Aufgrund der in Tab. 1 dargestellten Befunde ergibt sich, dass Cantharidin (**1**) weder durch Schwanz-Schwanz-Verknüpfung von zwei Isopreneinheiten noch aus Geraniol (**2**), *via* eine Verschiebung der Methylgruppe H₃C(3') aufgebaut wird (*Schema 1*). Im ersten Fall müsste nach Applikation von 2-[¹⁴C]-Mevalonat das durch *Schmidt*-Abbau des Cantharidins aus C(10) und C(11) gebildete CO₂ und die durch *Kuhn-Roth*-Abbau aus C(2), C(3), C(8) und C(9) entstandene Essigsäure die gesamte Aktivität des Cantharidins enthalten. Im zweiten Fall wäre eine Aktivitätsverteilung gemäss Formel **1a** zu erwarten. Dagegen ist die Isotopenverteilung (Tab. 1) mit einer Biosynthese des Cantharidin (**1**) aus drei Isopreneinheiten vereinbar.



In der Folge wurde gezeigt [5], dass 2-[^{14}C]-Farnesol (2-[^{14}C]-**3**) zu ca. 1% von männlichen *Lytta vesicatoria* in Cantharidin (**1**) eingebaut wird, wobei über 85% der Totalaktivität des Cantharidins in einer der beiden Carboxylgruppen lokalisiert war. Bei Applikation von 1-[^{14}C]-Farnesol (1-[^{14}C]-**3**) oder 2-[^{14}C]-Geraniol (2-[^{14}C]-**2**) war der Einbau um den Faktor 100 geringer. Demnach kommt Farnesol (**3**) als biogenetischer Vorläufer für Cantharidin (**1**) in Frage.

Nachstehend wird über Experimente mit 2-[^{14}C]-, 7-[^{14}C]-, 7',8-[^{14}C]- und 7',8-[^3H]-Geraniol und 11',12-[^3H]-Farnesol als mögliche Cantharidinvorläufer berichtet sowie über Experimente mit 1-[^{14}C]- und 2-[^{14}C]-Glycin, U-[^{14}C]-Leucin, U-[^{14}C]-Isoleucin und 1-[^{14}C]-Glucose.

2. Synthese von radioaktiv markierten Geraniolen und von radioaktiv markiertem Farnesol. - 2-[^{14}C]-Geraniol (2-[^{14}C]-**2**; (*E*)/(*Z*)=4:1-Gemisch) wurde nach [6] hergestellt⁸). Das 7-[^{14}C]-Geraniol (7-[^{14}C]-**2**) wurde gemäss *Schema 2* aus 2-[^{14}C]-



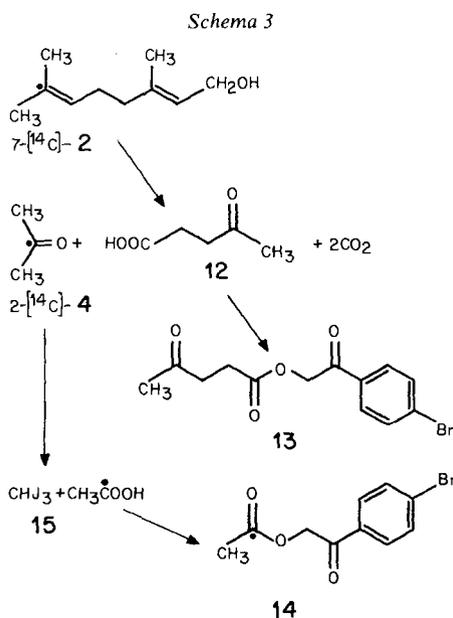
⁸) Wir danken Herrn Prof. Dr. A. R. Battersby (Cambridge) für ergänzende Angaben.

Aceton (2-[^{14}C]-4) gewonnen, wobei es sich im wesentlichen um bekannte Reaktionsstufen handelte, die dem Millimol-Maßstab angepasst wurden (siehe exper. Teil). Das Endprodukt stellte ein Gemisch von 82% Geraniol, 12% Nerol und 6% Citronellol⁹⁾ dar. Die Radioausbeute betrug 32%. 7',8-[^{14}C]-Geraniol (7',8-[^{14}C]-2) wurden ebenfalls gemäss *Schema 2* hergestellt. In diesem Fall wurden die (*E*), (*Z*)-isomeren Geranylsäure-methylester (**8**) chromatographisch an Kieselgel getrennt. Die (*E*)-Verbindung **8** gab nach Reduktion ein (*E*)-7',8-[^{14}C]-Geraniol (7',8-[^{14}C]-2), das noch 7% Nerol und 10% Citronellol⁹⁾ enthält. 7-[^{14}C]-Geraniol (7-[^{14}C]-2) wurde nach Abschluss dieser Arbeit in ähnlicher Weise auch von *Durst & Leete* [8] hergestellt.

Zur Überprüfung der Spezifität der Markierung wurde eine Probe 7-[^{14}C]-Geraniol (7-[^{14}C]-2) nach Verdünnung mit inaktivem reinem Material dem im *Schema 3* dargestellten oxydativen Abbau unterzogen [9]. Die Resultate sind in Tab. 2 wiedergegeben. Danach sind über 99% der Radioaktivität an C(7) lokalisiert.

Tabelle 2. Durch Abbau bestimmte Isotopenverteilung in 7-[^{14}C]-Geraniol (7-[^{14}C]-2)

Derivat	rel. Aktivität (%)
Essigsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester (14)	99,75
Lävulinsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester (13)	0,23
Jodoform (15)	0,04

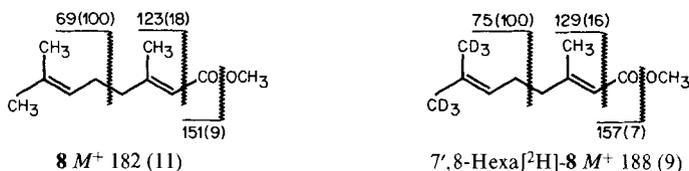


⁹⁾ Die Bildung des Citronellols (Reduktion der 2,3-Doppelbindung [7] zusätzlich zu derjenigen der Estergruppe des Geranylsäure-methylesters (**8**)) lässt sich, wie wir später gefunden haben, vermeiden, wenn anstelle von LiAlH_4 Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL) verwendet wird.

Zur Herstellung der tritiierten Terpene wurde eine basenkatalysierte Austauschreaktion verwendet. Behandlung von Aceton mit Tritiumoxid und Kaliumcarbonat ergab 1,3- ^3H -Aceton (1,3- ^3H -4), das gemäss *Schema 2* zum 6',7- ^3H -6-methyl-5-hepten-2-on (6',7- ^3H -6) umgesetzt wurde. Daraus wurde ein Gemisch von (*E*)- und (*Z*)-7',8- ^3H -Geraniol (7',8- ^3H -2) mit einer spezifischen Aktivität von 400 mCi/mmol erhalten. 6',7- ^3H -6 wurde auf dem im *Schema 2* beschriebenen Weg in 11',12- ^3H -Farnesol (11',12- ^3H -3) umgewandelt, das sich aus folgenden Isomeren zusammensetzte: 44,3% (*E,E*), 31,0% (*E,Z*), 12,3% (*Z,E*) und 11,3% (*Z,Z*). Eine Trennung dieser Isomeren wurde nicht vorgenommen. Die spezifische Aktivität von 11',12- ^3H -3 wurde zu 400 mCi/mmol bestimmt. Die Radioausbeute bezogen auf 6',7- ^3H -6 betrug 23,3%.

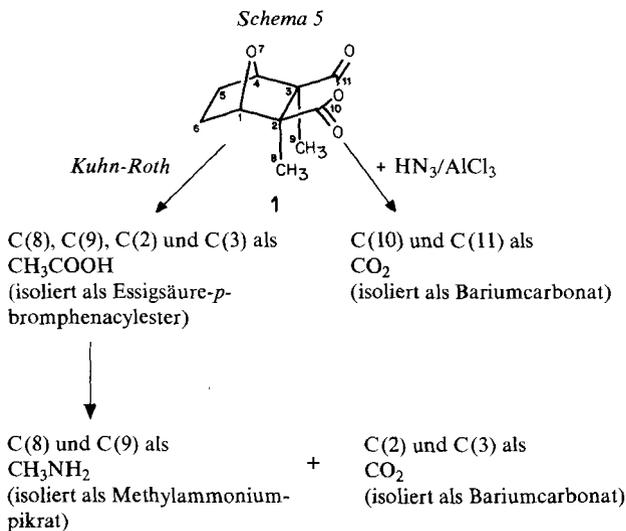
Mit Hilfe der Synthese von 7',8-Hexa ^2H -geranylsäure-methylester (7',8-Hexa ^2H -8) aus Hexa ^2H -aceton wurde nachgewiesen, dass im Verlauf der oben beschriebenen Synthesen mit 1,3-Hexa ^3H -aceton keine Verteilung der ^3H -Aktivität auf andere C-Atome des Geraniols (2) bzw. Farnesols (3) stattfand. Im 100-MHz-NMR.-Spektrum (CDCl_3) des nicht deuterierten Geranylsäure-methylesters (8) erscheinen die Signale der beiden endständigen Methylgruppen als etwas verbreiterte *s* bei 1,68 und 1,61 ppm [10]. In diesem Bereich decken sich die Absorptionen von (*E*)- und (*Z*)-8. Im NMR.-Spektrum von 7',8-Hexa ^2H -8 fehlen diese beiden Signale vollständig. Das Massenspektrum von Geranylsäure-methylester (8) ist durch die im *Schema 4* angegebene Fragmentierung gekennzeichnet. Demgegenüber zeigt das Massenspektrum von 7',8-Hexa ^2H -8 die erwarteten Verschiebungen des Molekularionenpikes und der charakteristischen Fragment-Ionenpikete um +6 Masseneinheiten sowie für die Pike *m/e* 74-69 Intensitäten von weniger als 6%.

Schema 4



Angaben in *m/e* (rel. %)

3. Einbauversuche mit radioaktiv markierten Vorläufern. - 3.1. *Allgemeine Bemerkungen zur Methodik.* Die Injektion der radioaktiven Vorläufer sowie die Isolierung des Cantharidins (1) wurde, wenn nicht anders angegeben, gemäss [1] vorgenommen. Zur Bestimmung der Isotopenverteilung wurde das Cantharidin dem im *Schema 5* gezeigten Abbau unterworfen. *Kuhn-Roth*-Oxydation lieferte C(2), C(3), C(8) und C(9) in Form von Essigsäure, welche als Essigsäure-*p*-bromphenacylester (14) ausgezählt wurde. Durch *Schmidt*-Abbau der Essigsäure [11] mit Natriumazid und Polyphosphorsäure wurden C(2) und C(3) in Form von Bariumcarbonat und C(8) und C(9) als Methylammoniumpikrat isoliert. Anwenden der *Schmidt*-Reak-



tion auf Cantharidin in Gegenwart von Aluminiumchlorid ergab C(10) und C(11) als Kohlendioxid, welches als Bariumcarbonat isoliert wurde.

Wie in Kontrollversuchen ermittelt wurde, lagen die Werte für die spezifische Aktivität des aus dem *Schmidt*-Abbau der Essigsäure erhaltenen Bariumcarbonates im Mittel um 12% unter dem theoretischen Wert; die Reproduzierbarkeit des Mittelwertes betrug dabei $\pm 8\%$ (bei 8 Messwerten und einer Irrtumswahrscheinlichkeit $*P=0,05$). Als theoretischer Wert wurde die spezifische Aktivität des aus derselben Essigsäure hergestellten *p*-Bromphenacylesters angenommen; die Reproduzierbarkeit dieses Wertes wurde zu $\pm 5\%$ geschätzt. Zur Kontrolle des durch die Gegenwart von Aluminiumchlorid modifizierten *Schmidt*-Abbaues von Cantharidin wurde ein nach Einbau von 1-[¹⁴C]-Natriumacetat isoliertes Cantharidin (Isotopenverteilung: siehe Tab. 1) abgebaut. Das erhaltene Bariumcarbonat war praktisch inaktiv. Damit ist gesichert, dass bei der *Schmidt*-Reaktion unter den modifizierten Bedingungen keine Radioaktivität aus C(2) und C(3) des Cantharidins im Bariumcarbonat auftrat.

3.2. *Geraniol* (2). Trotz einer Vielzahl von Versuchen konnte in keinem Fall ein signifikanter Einbau von Geraniol (2) in Cantharidin (1) erreicht werden. Verwendet wurden 7-[¹⁴C]-Geraniol (7-[¹⁴C]-2) mit einer Aktivität von 0,88 mCi/mmol, 2,7-[¹⁴C]-Geraniol (2,7-[¹⁴C]-2) mit einer Aktivität von 0,84 mCi/mmol und 7',8-[³H]-2, 7',8-[¹⁴C]-Geraniol (7',8-[³H]-2, 7',8-[¹⁴C]-2). Die Vorläufer wurden sowohl direkt als auch in Leinöl gelöst injiziert oder auf die Oberfläche der Insekten aufgetragen. Die Einbauraten lagen zwischen 0,03 und 0,001%⁷⁾, die spezifischen Aktivitäten der nach der Aufarbeitung erhaltenen Cantharidinpräparate betragen zwischen 1 und 200 dpm/mg. Ein nach der Vorschrift von *Cramer & Böhm* [12] hergestelltes Rohpräparat von 7-[¹⁴C]-Geranylpyrophosphat, das noch Geranylmonophosphat und anorganisches Phosphat enthielt, wurde ebenfalls nicht in Cantharidin eingebaut. Zur Zeit haben wir keine Erklärung dafür,

dass zwar Farnesol (3), nicht aber sein Vorläufer Geraniol (2) (vgl. [13]), in Cantharidin (1) eingebaut wird. Auffallend ist die Toxizität von Geraniol: sowohl Larven als auch adulte Insekten zeigten nach Injektionen von mehr als 1 mg/g Insekt bereits nach wenigen Stunden schwere Vergiftungserscheinungen. Farnesol (3) dagegen war in Dosierungen bis 5 mg/g Insekt verträglich. Zur Prüfung der Frage, ob die Insekten auch nach der Applikation des radioaktiven Geraniols Cantharidin *in vivo* synthetisieren, wurde ein Gemisch von 7',8-[³H]-Geraniol (7',8-[³H]-2) und 2-[¹⁴C]-Mevalonat in adulte Insekten und Larven von *Lytta vesicatoria* injiziert bzw. auf die Oberfläche der Insekten aufgetragen. Desgleichen wurde mit einer Mischung aus 11',12-[³H]-Farnesol (11',12-[³H]-3) und 2-[¹⁴C]-Mevalonat verfahren. Die Experimente an adulten Insekten und an Larven wurden jeweils zur gleichen Zeit ausgeführt und dafür Insekten bzw. Larven des Stadiums 5 derselben Population verwendet. Die Resultate sind in den Tab. 3 und 4 wiedergegeben. Demnach wurde Geraniol (2) in keinem Fall signifikant eingebaut, wohl aber 2-[¹⁴C]-Mevalonat und 11',12-[³H]-Farnesol (11',12-[³H]-3). Nicht mehr signifikant war der Einbau sowohl von Farnesol als auch von Mevalonat in die Larven, wenn diese mit dem Vorläufergemisch angestrichen wurden. Vermutlich ist diese Applikationstechnik bei den Larven ungeeignet.

Trotz der sehr geringen spezifischen Aktivitäten wurden einige Cantharidinpräparate aus 7-[¹⁴C]-Geraniol (7-[¹⁴C]-2) abgebaut. Falls Geraniol *via* Farnesol spezifisch in Cantharidin eingebaut worden wäre, müsste die spezifische Aktivität an C(3) des Cantharidins lokalisiert sein. Beim Abbau gemäss *Schema 5* wurde in den Produkten eine Isotopenverteilung gefunden, die trotz der durch die geringen spezifischen Aktivitäten der Präparate (≤ 10 dpm/mg) bedingten grossen Fehlergrenze nur im Sinne einer annähernd statistischen Verteilung interpretiert werden kann¹⁰⁾.

Aufgrund dieser Experimente kann ausgeschlossen werden, dass Geraniol (2) unter den Applikationsbedingungen als Vorläufer für die Biosynthese des Cantharidins verwendet wird. Möglicherweise wird das C₁₀-Terpen Geraniol (2) nach der Injektion im Gegensatz zum C₁₅-Terpen Farnesol abgebaut, bevor es an den Ort der Biosynthese gelangt, vgl. [14].

3.3. *Glycin, Leucin, Isoleucin und Glucose.* 3.3.1. *1-[¹⁴C]- und 2-[¹⁴C]-Glycin.* Verschiedentlich wurde berichtet, dass 2-[¹⁴C]-Glycin in einige Pflanzenprodukte terpenoider Natur oder mit terpenoiden Teilstrukturen spezifisch eingebaut wird. Die Angaben sind allerdings kontrovers, vgl. [15] und die dort angegebene Literatur. Injektion von 1-[¹⁴C]- oder 2-[¹⁴C]-Glycin in männliche Adulte und Larven von *Lytta vesicatoria* führte zu keinem signifikanten Einbau. Glycin nimmt somit an der Biosynthese des Cantharidins nicht teil.

3.3.2. *U-[¹⁴C]-Leucin.* Es ist bekannt, dass Leucin *via* β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym-A in Mikroorganismen und Leberhomogenaten in Mevalonat umgewandelt werden kann. Nach Injektion einer wässrigen Lösung von U-[¹⁴C]-Leucin in männliche adulte *Lytta vesicatoria* liess sich radioaktives Cantharidin mit einer Einbaurrate von 1,1%¹¹⁾ isolieren. Da das verwendete Leucin uniform markiert

¹⁰⁾ Zur Sicherung der Resultate wurde parallel ein Kontrollabbau mit inaktivem Material ausgeführt.

¹¹⁾ Einbaurrate bezogen auf die applizierte Aktivität.

Tabelle 3. Einbau von Mischungen aus 7',8-[³H]-Geraniol und 2-[¹⁴C]-Mevalolacton bzw. 11',12-[³H]-Farnesol und 2-[¹⁴C]-Mevalolacton nach Injektion in adulte Insekten

Vorläufergemisch	³ H/ ¹⁴ C im Vorläufergemisch	Gesamtaktivität im Cantharidin dpm ³ H	¹⁴ C	
			³ H/ ¹⁴ C im Cantharidin	³ H/ ¹⁴ C im Vorläufergemisch
7',8-[³ H]-Geraniol und 2-[¹⁴ C]-Mevalolacton	9,6	4720	0,0089	0,00093
11',12-[³ H]-Farnesol und 2-[¹⁴ C]-Mevalolacton	6,0	115000	0,181	0,030

Tabelle 4. Einbau von Mischungen aus 7',8-[³H]-Geraniol und 2-[¹⁴C]-Mevalolacton bzw. 11',12-[³H]-Farnesol und 2-[¹⁴C]-Mevalolacton nach Applikation an Larven (Mittelwerte aus je drei Experimenten)

Applikationsart	Geraniol-Experiment ⁽¹⁾		Farnesol-Experiment ⁽¹⁾	
	Einbaurrate der ³ H-Aktivität	Einbaurrate der ¹⁴ C-Aktivität	Einbaurrate der ³ H-Aktivität	Einbaurrate der ¹⁴ C-Aktivität
Injektionen	0,00077 ± 0,00026	0,293 ± 0,140	0,022 ± 0,016	0,30 ± 0,024
Anstreichen	0,00043 ± 0,00010	0,060 ± 0,036	0,0023 ± 0,0010	0,11 ± 0,03

war, sollte die Radioaktivität im Cantharidin auf alle C-Atome gleichmässig verteilt sein, d. h. 10% der Gesamtaktivität pro C-Atom. Gemäss dem in *Schema 5* beschriebenen Abbau wurde folgende Isotopenverteilung bestimmt: 36,1% an C(2), C(3), C(8) und C(9), 20% an C(8) und C(9), 19,8% an C(10) und C(11) und 11,9% an C(2) und C(3). Diese Verteilung stimmt befriedigend mit den Erwartungen überein.

3.3.3. *U-[¹⁴C]-Isoleucin*. Der biochemische Abbau von Isoleucin führt bekanntlich durch Desaminierung und oxydative Decarboxylierung zur Tiglinsäure (= *trans*-2-Methyl-2-butensäure), die in der Natur häufig vorkommt, u. a. auch als Insekteninhaltsstoff [16]. Der weitere biochemische Abbau von Tiglinsäure ergibt letztlich Essigsäure und Propionsäure. Injektion von U-[¹⁴C]-Isoleucin in männliche adulte *Lytta vesicatoria* führte im Ausmass von 1,3%¹¹⁾ zum Einbau von Radioaktivität in das isolierte Cantharidin. Dessen Abbau zeigte die folgende Verteilung der Radioaktivität auf die C-Atome: 35,8% an C(2), C(3), C(8) und C(9), 19,4% an C(2) und C(3), 17% an C(8) und C(9) und 20% an C(10) und C(11). Mit diesen Resultaten, die auf eine gleichmässige Verteilung der Radioaktivität im Cantharidin hindeuten, lässt sich nicht entscheiden, welcher Metabolit des Isoleucins in Cantharidin eingebaut wurde.

3.3.4. *1-[¹⁴C]-Glucose*. Der biochemische Abbau von 1-[¹⁴C]-Glucose führt unter aeroben Bedingungen zu 2-[¹⁴C]-Acetat. Demnach sollte auch Glucose über Acetat zur Bildung des Cantharidins beitragen. In diesem Fall würden C(8) und C(9) und C(10) und C(11) des Cantharidins je 28,6% der Gesamtaktivität aufweisen, C(2) und C(3) sollten inaktiv sein. 1-[¹⁴C]-Glucose wurde von männlichen adulten *Lytta vesicatoria* mit einer Rate von 0,14%¹¹⁾ eingebaut. Der Abbau des Cantharidins nach *Schema 5* ergab die folgende Verteilung der Radioaktivität: 29% an C(2), C(3), C(8) und C(9), 22,6% an C(8) und C(9), 5,4% an C(2) und C(3) und 21% an C(10) und C(11). Dieses Resultat zeigt, dass 1-[¹⁴C]-Glucose zu etwa 70% *via* 2-[¹⁴C]-Acetat in Cantharidin eingebaut wurde, unter der Voraussetzung, dass das Acetat zu 100% spezifisch inkorporiert wird. 30% der Aktivität sind statistisch verteilt¹²⁾.

Die vorliegende Arbeit wurde in dankenswerter Weise vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* unterstützt. Ferner danken wir den Herren Prof. K. Grob (EAWAG, Dübendorf) für seine Hilfe bei gas-chromatographischen Problemen, Prof. W. v. Philipsborn und seinen Mitarbeitern (Universität Zürich) für NMR.-Untersuchungen, Prof. M. Hesse und seinen Mitarbeitern (Universität Zürich) für Massenspektren, H. Frohofer (mikroanalytische Abteilung der Universität Zürich) für IR.-Spektren, Analysen und Radioaktivitätsmessungen sowie Frau A. Dürsteler-Meier für experimentelle Mitarbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. - Bestimmungen des Smp. auf dem *Mettler FP/2*-Gerät. IR.-Spektren: Angaben in cm^{-1} . ¹H-NMR.-Spektren: chemische Verschiebung (Bereiche oder Signalzentren) in ppm relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard (= 0 ppm), Kopplungskonstanten *J* in Hz; *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quartett, *m* = Multiplett. Massenspektren (MS.) an einem *CEC*-Gerät Typ 21-110B bei 70 eV; Angaben der Pike in *m/e* (rel. %). Abdampfoperationen mit einem Rotationsverdampfer (RV.) bei 20-40°/12 Torr. Destillationen kleiner Substanzmengen im Kugelrohr (Luftbad). Analytische Dünnschichtchromatographie (DC.) an Kieselgel HF₂₅₄ (Typ 60, *Merck*); Sprühreagens:

¹²⁾ Einbauexperimente mit 2-[¹⁴C]-Acetat in adulte *Lytta vesicatoria* wurden bisher nicht ausgeführt.

lproz., wässrige, mit Na_2CO_3 alkalisch gestellte Kaliumpermanganatlösung. Präparative Dünnschichtchromatogramme (präp. DC.), wenn nicht anders angegeben an mit Kieselgel PF₂₅₄ (Merck) beschichteten Glasplatten. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel (Merck, Korngrösse 0,063–0,2 mm) benutzt. Analytische Gas-chromatogramme (GC.) an den Geräten Fractovap (Carlo Erba) Modell IG (FID) unter Verwendung der Glaskapillarkolonne nach Grob [17] (XE 60 (31 m × 0,38 mm)) bei Verdampferblocktemperaturen von 230–250° und Trägergasdrucken von 0,37–0,4 atm (Trägergas: Wasserstoff), und Aerograph 1520B (FID) (Varian) mit gepackter Kolonne Chromosorb G silaniert 80/100 mesh (1,8 m × 3,17 mm), beladen mit 4% XE 60. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Integrator des W+W Schreibers 2201. Die angegebenen Werte stellen bei inaktiven Verbindungen Mittelwerte aus mindestens 3 GC. dar, von den radioaktiven Proben wurden höchstens 3 GC. ausgeführt. Messungen der Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler TRI-CARB 3320 (Packard Instruments & Co.). Hochaktive Substanzen wurden in Methanol oder Alkohol gelöst und Aliquote von 0,01–0,1 ml in die Zählgläschen pipettiert; ansonsten wurden Einwaagen von 1–7 mg Substanz für ¹⁴C-Messungen in 5 ml Methanol und 10 ml Scintillationslösung bzw. für ³H-Messungen in 2 ml Methanol und 10 ml Scintillationslösung gelöst. Die Scintillationslösung bestand aus 4,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 100 mg Dimethyl-POPOP (1,4-Di(4-methyl-5-phenyloxazol-2-yl)-benzol) in 1000 ml reinem Toluol. ³H- und ¹⁴C-doppeltmarkierte Proben wurden nach Frohofer [18] zu Wasser und Kohlendioxid verbrannt und diese ausgezählt. Die Radioaktivitätsmessung von [¹⁴C]-Bariumcarbonat erfolgte wie in [17] angegeben. Zählausbeute für ³H 26% und für ¹⁴C 75%. Die Proben wurden auf einen Standardfehler von 0,5–2% ausgezählt (Vertrauensgrenze: 95%). Geschätzte Reproduzierbarkeit der Methode: ± 10%. Radiodünnschichtscanning an einem DC.-Scanner Packard Modell 7200 mit 2π-Geiger-Müller Durchflusszählrohr, Trägergas Helium/Isobutylalkohol 98,7:1,3.

1. Synthesen isotope markierter Verbindungen. - 1.1. *Vorversuche mit inaktiven Substanzen.* 1.1.1. *2-Methyl-3-buten-2-ol (5).* Vinylmagnesiumbromid wurde nach [19] aus Vinylbromid und Magnesium in Tetrahydrofuran hergestellt. Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden Stammlösungen verwendet, welche das Reagens in Konzentrationen von 1–2 mmol/ml enthielten. Zu 10 ml (20 mmol) Vinylmagnesiumbromid-Lösung wurden aus einer Zerschlagampulle bei –192°/0,0001 Torr 319 mg (5,5 mmol) Aceton kondensiert. Nach dem Auftauen wurde 4 Std. bei 50° unter Stickstoff gerührt und dann mit 15 ml gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung versetzt. Nach üblicher Aufarbeitung mit Äther wurde das Lösungsmittelgemisch bis zum Sdp. 65°/720 Torr über eine Vigreux-Kolonne abdestilliert. Der Rückstand (1,2 g) enthielt 456 mg (65,8%, GC.-Evidenz) 2-Methyl-3-buten-2-ol (5).

1.1.2. *6-Methyl-5-hepten-2-on (6).* Der das Methylbutenol 5 enthaltende Rückstand aus 1.1.1 wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von Saucy & Marbet [20] mit 7 ml Isopropylmethyläther und 0,127 ml einer 0,4proz. Lösung von Phosphorsäure in Eisessig im Bombenrohr 24 Std. auf 125° erhitzt. Der Bombeninhalt wurde hierauf mit lproz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Äther wie üblich aufgearbeitet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels über eine Vigreux-Kolonne bis zum Sdp. 85°/720 Torr wurde der Rückstand mittels präp. DC. an Kieselgel mit Pentan/Äther 9:1 gereinigt. Destillation bei 59°/10 Torr ergab 397 mg (87%) 6-Methyl-5-hepten-2-on (6).

1.1.3. *Geranylsäure-methylester (8).* Erhitzen von 150 mg (0,98 mmol) Bromessigsäure-methylester und 280 mg (1,68 mmol) Triäthylphosphit während 1 Std. bei 140°–150° unter Stickstoff ergab den (Diäthoxyphosphono)essigsäure-methylester (7). Nach Zugabe einer Lösung von 100 mg (0,79 mmol) Methylheptenon 6 in 5 ml Benzol wurde mit 1 ml 2M Natriummethylat in Methanol versetzt und die Mischung 18 Std. bei 20° unter Stickstoff stehengelassen⁸⁾. Nach Zugabe von 0,2 ml Eisessig, gefolgt von 5 ml Wasser, wurde wie üblich aufgearbeitet und nach präp. DC. an Kieselgel mit Pentan/Äther 8:2 und Destillation bei 85°/0,01 Torr wurden 106 mg (73,6%) Geranylsäure-methylester (8) erhalten. Gemäss GC. handelte es sich um eine (2:1)-Mischung der (E)- und (Z)-Verbindung. - ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 5,67 (s mit Aufspaltung, H–C(2)), 5,1 (m, H–C(6)), 3,67 (s, COOCH₃), 2,9–2,4 (m, 0,9H, 2H–C(4) und 2H–C(5) von (Z)-8), 2,4–2,0 (s-artiges m, 6H 2H–C(4) und 2H–C(5) von (E)-8 und H aus 2H–C(4) und 2H–C(5) von (Z)-8 sowie 3H–C(3') von (E)-8), 1,89 (d, H, J = 1,5, 3H–C(3') von (Z)-8), 1,68 (s, 3H–C(8)), 1,61 (s, 3H–C(7)). - MS.: 182 (M⁺, 11), 176 (5), 167 (1), 161 (4), 151 (9), 150 (4), 139 (6), 123 (18), 122 (7), 115 (4), 114 (44), 109 (3), 108 (3), 107 (5), 105 (3), 99 (2), 95 (2), 93 (2), 91 (4), 83 (18), 82 (11), 81 (3), 79 (3), 77 (3), 70 (5), 69 (100), 68 (4), 67 (6), 65 (2), 59 (3), 55 (5), 54 (3), 53 (8), 51 (3), 43 (3), 42 (2), 41 (36).

1.1.4. *Linalool (9).* Zu einer Lösung von 397 mg (3,15 mmol) 6 in 5 ml abs. Tetrahydrofuran wurden 6 ml der unter 1.1.1 beschriebenen Vinylmagnesiumbromid-Lösung (12 mmol) getropft.

Nach 4 Std. Erwärmen auf 50° wurde wie unter 1.1.1 aufgearbeitet. Präp. DC. an Kieselgel mit Pentan/Äther 9:1 und Destillation bei 100°/0,01 Torr ergab 308 mg (63,5%) Linalool (**9**), das gemäss GC. 95% rein war.

1.1.5. *Geranylaceton* (**10**). 308 mg (2,0 mmol) Linalool (**9**) in 4 ml Isopropenylmethyläther wurden mit 0,07 ml einer 0,4proz. Lösung von Phosphorsäure in Eisessig 24 Std. auf 125° im Bombenrohr erhitzt. Nach der Aufarbeitung gemäss 1.1.2 und Destillation bei 110°/0,01 Torr wurden 361 mg (93%) einer Mischung erhalten, welche gemäss GC. aus 56% (*E*)-**10** und 44% (*Z*)-**10** bestand.

1.1.6. *Farnesylsäure-methylester* (**11**). Die Mischung der stereoisomeren Farnesylsäure-methylester wurde analog 1.1.3 aus 361 mg (1,86 mmol) Geranylaceton (**10**) (*E*)/(*Z*) 1,27:1), 306 mg (2,0 mmol) Bromessigsäure-methylester und 332 mg (2,0 mmol) Triäthylphosphit bereitet. Chromatographie des Rohproduktes an Kieselgel mit Pentan/Äther 8,5:1,5 ergab nach Destillation bei 120°/0,01 Torr 372 mg (80%) einer Mischung, welche gemäss GC. aus 44,3% (*E, E*)-, 31% (*E, Z*)-, 12,3% (*Z, E*)- und 11,3% (*Z, Z*)-Farnesylsäure-methylester (**11**) bestand.

1.1.7. *Farnesol* (**3**). Zu 108 mg (0,43 mmol) der stereoisomeren Farnesylsäure-methylester (**11**) in 10 ml Äther wurden bei 20° unter Stickstoff 0,5 ml Diisobutylaluminiumhydrid (DIBALH) gegeben. Nach 1 Std. Rühren bei 20° wurde bei 0° mit gesättigter wässriger Seignettesalz-Lösung zersetzt und wie üblich aufgearbeitet. Destillation bei 130°/0,01 Torr ergab 95,0 mg (99,4%) Farnesol-Mischung, deren Isomerenzusammensetzung der des Ausgangsmaterials **11** (1.1.6) entsprach.

Bei der Ausführung der Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid (Äther; 0°) enthielt die Produktmischung neben den stereoisomeren Farnesolen noch die stereoisomeren 2,3-Dihydrofarnesole (total ca. \leq 10%; GC.).

1.1.8. *7',8'-Hexa[²H]-geranylensäure-methylester* (*7',8'-Hexa[²H]-8*). Eine Lösung von 2,772 g (43,23 mmol) Hexa[²H]-aceton (Hexa[²H]-4) (*Fluka*, ²H-Gehalt \geq 99,5%) in 80 ml Tetrahydrofuran wurden zu 125 ml des unter 1.1.1 beschriebenen *Grignard-Reagens*' (1 mmol/ml) getropft. Nach dem Erwärmen auf 50° während 3,5 Std. wurde wie üblich mit 200 ml gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung und Äther aufgearbeitet. Abdestillieren des Äthers ergab 6,90 g Rückstand, der gemäss GC. 2,656 g (66,6%) Methylbutenol(1,2'-Hexa[²H]-5) enthielt. 5,144 g dieses Rückstandes, enthaltend 21,5 mmol 1,2'-Hexa[²H]-5, wurden gemäss 1.1.2 zum Keton 6',7'-Hexa[²H]-6 umgesetzt. Von dem nach Aufarbeitung erhaltenen Rückstand (8,11 g) wurden 900 mg mit 735,6 mg (3,50 mmol) Phosphonat 7 entsprechend 1.1.3 umgesetzt. Säulenchromatographie an 15 g Kieselgel mit Pentan/Äther 8:2 ergab 382,0 mg (2,096 mmol) 7',8'-Hexa[²H]-geranylensäuremethylester (*7',8'-Hexa[²H]-8*). - ¹H-NMR. (100 MHz, CDCl₃): 5,67 (s mit Aufspaltung, H-C(2)), 5,24-4,96 (m, H-C(6)), 3,68 (s, COOCH₃), 2,8-2,5 (m, 0,52H, H-C(4) und H-C(5) von (*Z*)-7',8'-Hexa[²H]-8), 2,3-2,0 (m, 6,7H, 2H-C(4) und 2H-C(5) von (*E*)-7',8'-Hexa[²H]-8 und 1H aus 2H-C(4) und 2H-C(5) von (*Z*)-7',8'-Hexa[²H]-8 sowie 3H-C(3') von (*E*)-7',8'-Hexa[²H]-8), 1,89 (d, 0,68 H, J = 1,0, 3H-C(3') von (*Z*)-7',8'-Hexa[²H]-8). Die bei der nicht deuterierten, unter 1.1.3 beschriebenen Verbindung **8** beobachteten Signale bei 1,68 und 1,61 ppm fehlten vollständig. - MS.: 188 (M⁺, 9), 157 (7), 129 (16), 128 (8), 115 (26), 84 (10), 82 (8), 76 (6), 75 (100), 73 (6), 53 (5), 46 (5), 45 (14), 44 (11), 43 (9), 41 (8).

1.2. *Radioaktive Verbindungen*. 1.2.1. *6',7-³H]-6-Methyl-5-hepten-2-on* (*6',7-³H]-6*). 0,515 mg (ber.) (5Ci)¹³ trägerfreies ³H₂-Gas wurden bei 500°/0,0001 Torr an 17 g Kupfer(II)oxid zu ³H₂O verbrannt. Dieses wurde in einer Zerschlagampulle, die 395 mg (6,8 mmol) Aceton (**4**) und 50 mg Kaliumcarbonat enthielt, kondensiert. Nach dem Abschmelzen der Ampulle wurde 72 Std. auf 150° erhitzt und dann das radioaktive Aceton bei -192°/0,0001 Torr zu 4 ml des unter 1.1.1. beschriebenen *Grignard-Reagens*' (2 mmol/ml) kondensiert. Die Umsetzung zu 1,2'-[³H]-5 und nachfolgend zu 6',7-[³H]-6 erfolgte wie unter 1.1.1 und 1.1.2 beschrieben. Nach präp. DC. und Destillation bei 60°/12 Torr wurden 480 mg (56%, bezogen auf Aceton (**4**)) 6',7-[³H]-6 mit einer Gesamtkativität von 1,63 Ci (429 mCi/mmol) erhalten. Mittels Radiodünnschichtscanning waren keine Verunreinigungen nachzuweisen.

1.2.2. *7',8-³H]-Geraniol* (*7',8-³H]-2*). 58,5 mg (0,463 mmol, 0,186 Ci) 6',7-[³H]-6 wurden wie unter 1.1.3 beschrieben mit 105 mg Phosphonat **7** zu 7',8-[³H]-8 umgesetzt. Präp. DC. und Destillation bei 85°/0,01 Torr ergab 60,0 mg (71,4%) 7',8-[³H]-8 mit einer Gesamtkativität von 0,132 Ci (396 mCi/mmol). 7',8-[³H]-8 wurde in 5 ml abs. Äther mit einem 2molaren Überschuss an Lithiumaluminiumhydrid bei 0° reduziert. Die übliche Aufarbeitung, präp. DC. und Destillation bei 100°/0,01 Torr ergab 46,2 mg (91%) radiodünnschichtchromatographisch reines 7',8-[³H]-2 mit einer Gesamtkativität von 0,120 Ci (400 mCi/mmol).

¹³) Angabe der Herstellerfirma *Amersham*, England.

1.2.3. 7- ^{14}C -Geraniol (7- ^{14}C -2). 3,1 mg 2- ^{14}C -Aceton (2- ^{14}C -4) (1,0 mCi, 18,5 mCi/mmol, radiochemische Reinheit 97%, chemische Reinheit 99%¹³) wurden mit 62,5 mg Aceton in 4,3 ml Tetrahydrofuran verdünnt (Gesamtmenge 1,11 mmol). Das radioaktive Aceton wurde gemäss 1.1.1 mit einer 1,1M Lösung von Vinylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran umgesetzt. Das erhaltene 2- ^{14}C -5 wurde gemäss 1.1.2 zu 6- ^{14}C -6 umgewandelt und entsprechend 1.1.3 radioaktives 7- ^{14}C -8 hergestellt. Dann wurde 7- ^{14}C -8 in 5 ml abs. Äther mit einem 2molaren Überschuss an Lithiumaluminiumhydrid bei 0° reduziert. Bei 0° wurde mit 10 ml gesättigter, wässriger Seignettesalz-Lösung zersetzt und erschöpfend mit Äther extrahiert. Der Extrakt wies eine Aktivität von 0,32 mCi auf (32% bezogen auf die Aktivität des eingesetzten 2- ^{14}C -4). Präp. DC. und Destillation bei 100°/0,01 Torr ergab ein Präparat, das gemäss GC. aus 82% 7- ^{14}C -2, 12% 7- ^{14}C -Nerol und 6% 7- ^{14}C -Citronellol bestand⁹). Die spezifische Aktivität betrug 0,88 mCi/mmol (berechnet: 0,901 mCi/mmol).

1.2.3.1. Abbau von 7- ^{14}C -Geraniol (7- ^{14}C -2). 0,982 mg 7- ^{14}C -Geraniol (7- ^{14}C -2) aus der Synthese 1.2.3. wurden mit 503,5 mg nerolfreiem, inaktivem Geraniol (2) (GC.-Reinheit: 98,4%) verdünnt. Berechnete Aktivität des verdünnten Präparates: $3,89 \cdot 10^6$ dpm/mmol. 100 mg (0,648 mmol) dieses Geraniolpräparates wurden nach Waldner et al. [9] oxydativ zu Aceton (4) und Lävulinsäure (12) abgebaut, wobei 12 nach der Extraktion direkt in den *p*-Bromphenacyl-ester 13 übergeführt und 4 weiter zu Essigsäure und Jodoform (15) abgebaut wurde. Es wurden 104 mg (62,4%) Essigsäure-*p*-bromphenacyl-ester (14) mit einer spezifischen Aktivität von 15411 dpm/mg ($3,96 \cdot 10^6$ dpm/mmol, berechnet $3,89 \cdot 10^6$ dpm/mmol) sowie 62,0 mg (24,3%) Jodoform (15) mit einer spezifischen Aktivität von 3,7 dpm/mg ($1,46 \cdot 10^3$ dpm/mmol, berechnet 0 dpm/mmol) isoliert. Vom Lävulinsäure-*p*-bromphenacyl-ester (13) wurden 145 mg (71,5%) mit einer spezifischen Aktivität von 29 dpm/mg ($9,081 \cdot 10^3$ dpm/mmol, berechnet 0 dpm/mmol) erhalten.

1.2.4. 7,8- ^{14}C -Geraniol (7,8- ^{14}C -2). 18,0 mg 1,3- ^{14}C -Aceton (1,3- ^{14}C -4) (8,0 mCi, 26,8 mCi/mmol, Radiochemische Reinheit 99%, chemische Reinheit 98%¹³) wurden mit 329 mg Aceton in 25 ml Tetrahydrofuran verdünnt (Gesamtmenge 5,97 mmol 1,3- ^{14}C -4) und gemäss 1.1.1 zum 1,2- ^{14}C -5 und nachfolgend gemäss 1.1.2 zu 6',7- ^{14}C -6 umgesetzt. Übliche Aufarbeitung (vgl. 1.1.2) und Abdestillieren des Lösungsmittels ergab einen Rückstand von 2,480 g mit einer Gesamtaktivität von 3,52 mCi (44% der eingesetzten Aktivität). 530 mg des 6',7-Di- ^{14}C -6 enthaltenden Rückstandes wurden gemäss 1.1.3 mit 428,7 mg (2,04 mmol) (Diäthoxyphosphono)essigsäure-methylester (7) zu 7',8- ^{14}C -8 umgesetzt. Aufarbeitung, Säulenchromatographie und Destillation entsprechend 1.1.3. ergab 82,0 mg (35,2% bezogen auf 1,3- ^{14}C -4) (*E,Z*)-7',8- ^{14}C -8. Mittels Säulenchromatographie wurden aus dem Stereoisomerenmischung 49,9 mg (*E*)-7',8- ^{14}C -8 abgetrennt, welches mit Lithiumaluminiumhydrid bei 0° entsprechend 1.2.3. zum 7,8- ^{14}C -Geraniol reduziert wurde. Letzteres bestand gemäss GC. aus 83% 7,8- ^{14}C -2, 10% 7,8- ^{14}C -Citronellol und 7% 7,8- ^{14}C -Nerol und wies eine spezifische Aktivität von 1,26 mCi/mmol (berechnet: 1,33 mCi/mmol) auf.

1.2.5. 2- ^{14}C -Geraniol (2- ^{14}C -2). 2,19 mg 2- ^{14}C -Bromessigsäure (0,88 mCi, 55 mCi/mmol, radiochemische Reinheit 98-99%¹³) wurden mit 20,1 mg Bromessigsäure verdünnt (Gesamtmenge 22,32 mg (0,16 mmol)). Die ätherische Lösung der radioaktiven Bromessigsäure wurde mit einem geringen Überschuss an Diazomethan in Äther versetzt, danach das Lösungsmittel abdestilliert und zum Rückstand 50 mg (0,30 mmol) Triäthylphosphit gegeben. Die weitere Verarbeitung zum radioaktiven (Diäthoxyphosphono)essigsäure-methylester (2- ^{14}C -7) und dessen Umsetzung mit 25,0 mg (0,198 mmol) 6 erfolgte wie unter 1.1.3. angegeben. Nach üblicher Aufarbeitung wurde 2- ^{14}C -8 mittels präp. DC. gereinigt und bei 85°/0,01 Torr destilliert. 16,8 mg (57,4%). Durch Reduktion von 2- ^{14}C -8 mit überschüssigem Lithiumaluminiumhydrid in abs. Äther entsprechend 1.2.2. wurden nach Destillation bei 100°/0,01 Torr 12,4 mg (87%) 2- ^{14}C -2 mit einer spezifischen Aktivität von 5,2 mCi/mmol (berechnet 5,5 mCi/mmol) erhalten.

1.2.6. 11',12- ^3H -Farnesol (11',12- ^3H -3). 189,0 mg (1,5 mmol, 0,64 Ci) des unter 1.2.1. beschriebenen 6',7- ^3H -6 wurden wie in 1.1.4. zum Linalool (9) umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung und Destillation bei 100°/0,01 Torr wurden 150,3 mg (64,9%) 7,8- ^3H -9 mit einer Aktivität von 0,39 Ci (400 mCi/mmol) erhalten. Die nachfolgende Saucy-Marbet Reaktion [20] lieferte gemäss 1.1.5 10',11- ^3H -10, das ohne weitere Reinigung in die Wittig-Reaktion analog 1.1.6 zu 11',12- ^3H -11 eingesetzt wurde. Üblicher Aufarbeitung, präp. DC. und Destillation bei 120°/0,01 Torr ergab 97,4 mg (40%) 11',12- ^3H -11 mit einer Gesamtaktivität von 0,156 Ci (401 mCi/mmol). 11',12- ^3H -11 wurde mit einem 2molaren Überschuss an Lithiumaluminiumhydrid in abs. Äther bei 0° reduziert und der gebildete Alkohol entsprechend 1.1.7 aufgearbeitet und gereinigt.

Destillation bei 130°/0,001 Torr ergab 77,8 mg (90%) radiodünnschichtchromatographisch reines 11',12'-[³H]-3 mit einer Gesamtaktivität von 0,140 Ci und einer molaren Aktivität von 400 mCi/mmol.

2. Versuche zum Einbau von radioaktiven Vorläufern in Cantharidin. 2.1. *Allgemeine Bemerkungen zur Applikationstechnik.* Die verwendeten männlichen *Lytta vesicatoria* L. entstammten, wenn nicht anders angegeben, der eigenen Zucht; die Larven befanden sich im 5. Entwicklungsstadium.

Die radioaktiven Vorläufer gelangten als reine Substanzen (bei nicht-wasserlöslichen Verbindungen) oder als wässrige Lösung zur Anwendung. 2,7-[¹⁴C]-Geraniol wurde in einigen Fällen als ca. 4proz. Lösung in Leinöl verwendet. Die Injektion erfolgte in das Abdomen der mit Kohlendioxid narkotisierten Insekten mittels einer fein ausgezogenen Schmelzpunktskapillare, welche zwischen dem 3. und 4. Segment eingeführt wurde. In einigen Fällen wurden nicht-wasserlösliche Verbindungen auch auf die dorsale Seite des Abdomens aufgetragen. Die Insekten erholten sich rasch von der Narkose und wurden während der Dauer des Experimentes in Kristallisierschalen (Ø10-20 cm) gehalten, welche feuchte Erde und Eschenzweige enthielten und mit feuchtem Koliertuch abgedeckt wurden. Die Angaben über die Dauer der einzelnen Experimente und die Beobachtungen über ihren Verlauf (Zustand der Insekten) sind in den Tabellen in Kap. 2.4 enthalten. Beim Abbruch der Experimente wurden die Insekten mit Äther getötet und, falls sie nicht sofort aufgearbeitet wurden, bei -20° aufbewahrt.

2.2. Die Isolierung von radioaktivem Cantharidin. Aufarbeitung mit Säure. Die Insekten wurden nach dem Auswägen und einer zur Kontrolle durchgeführten Geschlechtsbestimmung (Identifizierung der primären Geschlechtsmerkmale unter dem Mikroskop) mit 10-15 mg inaktivem Cantharidin pro Insekt in einer Achatschale zerrieben und unter Nachspülen mit 1N Salzsäure in einen Rundkolben überführt. Der Aufschluss erfolgte durch 1 Std. Kochen in 20-50 ml 1N Salzsäure unter Rückfluss. Nach dem Abkühlen wurde mit Kaliumchlorid gesättigt und 6mal mit Methylchlorid extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am RV. abgezogen und der Rückstand 2mal mit je 10 ml Pentan ausgezogen. Der pentan-unlösliche Rückstand, der hauptsächlich Cantharidin enthielt, wurde aus Aceton/Pentan umkristallisiert und bei 120-130°/0,01 Torr sublimiert. Die Präparate wurden als radiokonstant betrachtet, wenn die spezifischen Aktivitäten nach 3 aufeinanderfolgenden Reinigungsoperationen nicht mehr als 10% voneinander abwichen. Eine Aktivitätsbilanz liess sich durch Auszählen von Aliquoten der Wasserphase und der Methylchloridphase erstellen (geschätzte Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode: ±20%).

Aufarbeiten mit Lauge. Der Aufschluss der Insekten erfolgte durch 1 Std. Kochen in 20-50 ml 20proz. alkoholischer Kaliumhydroxidlösung. Nach dem Abkühlen wurde der grösste Teil des Alkohols am RV. entfernt und der Rückstand in 30-50 ml Wasser aufgenommen. Nach dem Ansäuern mit konz. Salzsäure wurde nach 2 Std. Stehen bei 20° mit festem Kaliumcarbonat auf pH 7-8 gestellt und das Cantharidin sowie nicht-verseifbare Anteile mit Methylchlorid extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Aufarbeitung mit Säure.

Die Angabe der Einbaurate. Bei der Injektion der Vorläufer trat nach dem Zurückziehen der Injektionskapillare stets ein Tropfen Hämolymphe aus. Die dem Insekt *de facto* applizierte Aktivität war daher nicht genau bestimmbar. Die Einbaurate für Cantharidin kann entweder auf die bei der Applikation eingesetzte Aktivität (d.h. mg Vorläufer multipliziert mit dessen spezifischer Aktivität¹¹), oder aber auf die Aktivität, die in der Wasser- und Methylchloridphase enthalten ist⁷), bezogen werden. Die Berechnung der im Cantharidin vorhandenen Totalaktivität erfolgte durch Multiplikation der spezifischen Aktivität mit der Menge an zugesetztem inaktivem Cantharidin. Der Cantharidin-Eigengehalt der männlichen Insekten (1,8% des Trockengewichtes [1]) wurde dabei nicht berücksichtigt, da der Fehler höchstens 7% ausmachen würde.

2.3. Der Abbau von Cantharidin. 2.3.1. *Kuhn-Roth-Oxydation.* 0,1 mmol Cantharidin wurden in 25 ml Säuregemisch nach *Kuhn-Roth* (vgl. [21]) 14 Std. unter Rückfluss gekocht (Metallbad, 125°). Nach dem Abdestillieren der Essigsäure wurde diese mit 0,1N Natriumhydroxid gegen Phenolphthalein titriert. Ausbeute: 90%. Zu dieser Lösung von Natriumacetat wurden noch einige Tropfen 0,1N Natriumhydroxid getropft und die Lösung im RV. zur Trockne eingedampft. Alle Operationen wurden unter Reinstickstoff durchgeführt.

2.3.2. Essigsäure-p-bromphenacyl-ester (14). Das in 2.3.1. erhaltene Natriumacetat wurde in Methanol gelöst, die Hälfte der Lösung eingedampft, der Rückstand in 0,5 ml Wasser gelöst und mit stark verdünnter Salzsäure auf pH 7,5-8,0 titriert. Dann wurden 10 ml Dimethylformamid und ein 1,4facher Überschuss an *p*-Bromphenacylbromid hinzugegeben. Unter gelegentlichem Umschütteln wurde 2 Std. bei 20° stehengelassen, dann das Dimethylformamid bei 0,01 Torr abgezogen und das restliche Lösungsmittel durch 2mal Nachdestillieren mit je 5 ml Methanol entfernt. Der Rückstand wurde an

Silicagel (präp. DC.) in Benzol chromatographiert. Essigsäure-*p*-bromphenacyl-ester wurde aus Hexan/Aceton 98:2 umkristallisiert bei 75–80°/0,01 Torr destilliert: 80% **14** vom Smp. 84–85°.

2.3.3. *Bariumcarbonat aus Essigsäure (Schmidt-Abbau)*. Die zweite Hälfte der Lösung von Natriumacetat in Methanol aus 2.3.2 wurde in einen Schenkel der von Britz [11] beschriebenen Doppelschenkelampulle A (s. Fig. 1) gebracht. Das Lösungsmittel wurde mit Reinstickstoff abgeblasen und der Rückstand kurz bei 20°/11 Torr getrocknet. Nach der Zugabe eines 1,1–1,4fachen Überschusses an Natriumazid und Beschicken des anderen Schenkels von A mit 0,5–0,8 g Polyphosphorsäure wurde über Hahn C auf 11 Torr evakuiert. Hahn D wurde dann geschlossen und die Polyphosphorsäure zu den Salzen fließen gelassen. Es wurde 1 Std. im Wasserbad bei 80° unter gelegentlichem Umschwenken erwärmt. Die Vorlage B wurde nun mit 20 ml einer Lösung von Bariumhydroxid und Bariumchlorid in Wasser (1 l einer über eine G4-Fritte abgesaugten gesättigten Lösung von Bariumhydroxid gemischt mit 200 ml einer 10,75proz. Lösung von Bariumchlorid in destilliertem Wasser) beschickt. Nach dem Evakuieren über Hahn C wurde Hahn D geöffnet und das System 1 Std. bei 20° stehengelassen. Das ausgefallene Bariumcarbonat wurde abzentrifugiert, 5mal mit heissem bidestilliertem Wasser und je 2mal mit Methanol und Äther gewaschen und dann 6 Std. bei 60°/0,01 Torr getrocknet. Ausbeute: 80%.

2.3.4. *Methylammoniumpikrat aus Essigsäure*. In den nach den Operationen von 2.3.3. freien Schenkel der Doppelschenkelampulle A (Fig. 1) wurde ein bezüglich des polyphosphorsäuren Rückstandes aus 2.3.3 starker Überschuss von 30proz. Natriumhydroxidlösung gefüllt. Nachdem A an eine Mikro-Destillationsbrücke angeschlossen worden war, liess man die Natronlauge zum polyphosphorsäuren Rückstand fließen und destillierte das Methylamin in eine mit einem 1,4fachen Überschuss an Pikrinsäure in Äthanol beschickte Vorlage. Nach dem Abdampfen des Äthanols wurde die überschüssige Pikrinsäure grösstenteils durch 2mal Digerieren mit abs. Benzol bei 60° entfernt und der Methylammoniumpikrat enthaltende Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Unter Lichtausschluss wurde 6 Std. bei 20°/0,01 Torr getrocknet. Ausbeute: 70%.

2.3.5. *Schmidt-Abbau von Cantharidin*. 0,1 mmol Cantharidin wurden mit 0,25 mmol Natriumazid und einem Körnchen Aluminiumchlorid (wasserfrei) in der von Britz [11] beschriebenen Apparatur (Fig. 1) während 2 Std. bei 150°/11 Torr mit 0,5–0,8 g Polyphosphorsäure erhitzt (vgl. 2.3.3). Die Hauptmenge des dabei teilweise an die kühleren Stellen des Reaktionsgefässes sublimierenden Cantharidins wurde durch vorsichtiges Erwärmen mit fächelnder Flamme wieder der Reaktion zugeführt. Das Kohlendioxid wurde wie unter 2.3.3 beschrieben aufgefangen. Ausbeute: 50%.

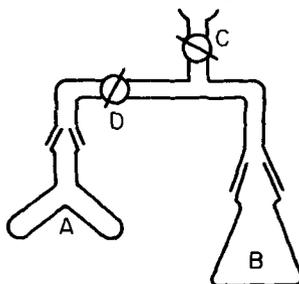


Fig. 1⁴⁾

2.4. *Einbauversuche mit radioaktiven Substanzen*. Die ausgeführten Experimente zum Einbau von radioaktiven Vorläufern in Cantharidin sind in den in 2.4.1–2.4.11 erwähnten Tabellen beschrieben.

2.4.1. *Einbauversuche mit 2,7-[¹⁴C]-Geraniol*. 3,2 mg 2-[¹⁴C]-Geraniol aus 1.2.5., 7,0 mg 7-[¹⁴C]-Geraniol aus 1.1.3 und 261,5 mg Leinöl wurden bis zur Homogenität vermischt. Aktivität: Ber. $13,1 \cdot 10^7$ dpm, Gef. $12,5 \cdot 10^7$ dpm (0,21 μ Ci/mg). Vgl. Tab. 5.

2.4.2. *Einbauversuche mit 7-[¹⁴C]-Geraniol*. Für diese Experimente wurde 7-[¹⁴C]-Geraniol aus 1.1.3 verwendet. Spezifische Aktivität: 5,7 μ Ci/mg. Vgl. Tab. 6.

2.4.3. *Einbauversuche mit 7,8-[³H]-2,7,8-[¹⁴C]-Geraniol*. 9,4 mg 7,8-[¹⁴C]-Geraniol aus 1.2.4, 1,1 mg 2-[¹⁴C]-Geraniol aus 1.2.5. und 0,9 mg 7,8-[³H]-Geraniol aus 1.2.2 wurden in ätherischer Lösung gemischt und nach dem Abdampfen des Lösungsmittels bei 100°/0,01 Torr destilliert. Ber. $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 20,7$, Gef. $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 18,1$. Spezifische Aktivität: ^3H : 181 μ Ci/mg, ^{14}C : 10,0 μ Ci/mg. Vgl. Tab. 7.

2.4.5. *Einbauversuche mit einer Mischung von 7,8-[³H]-Geraniol und (S,R)-2-[¹⁴C]-Mevalolacton*. 4,0 mg Geraniol, 0,9 mg 7,8-[³H]-Geraniol aus 1.2.2 und 8,9 mg 2-[¹⁴C]-Mevalolacton wurden bei

¹⁴⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. D. Arigoni (ETH Zürich) für ergänzende Angaben.

Tabelle 5. Einbauversuche mit 2,7-[¹⁴C]-Geraniol

Experiment Nr.	Spezies	Anzahl	Gewicht g	Applikationsart	Applizierte Aktivität μCi	Versuchsdauer Std.	Zustand der Insekten
1	<i>Alosimus</i>	12	2,4	Injektion	18,5	24	nach 2 Std. 2 tot, nach 24 Std. 4 tot alle überlebten
2	<i>Lytta</i>	3	0,4	Injektion	2,5	24	nach 48 Std. 1 tot, nach 71 Std. 3 tot
3	<i>Lytta</i>	9	2,2	Injektion	16,2	71	nach 18 Std. 5 tot, nach 46 Std. 2 tot
4	<i>Lytta</i> Larven	10	1,83	Injektion	8,8	46	

Experiment Nr.	Aufarbeitung	Aktivität der Wasserphase (W) μCi	Aktivität der Methylenchloridphase (Me) μCi	Gesamt W + Me μCi	Cantharidin		Einbaureate berechnet aus applizierter Aktivität %	W + Me Aktivität %
					dpm/mg	Gesamt dpm		
1	sauer	2,3	5,0	7,3	19	1 520	0,0037	0,0094
2	sauer	1,5	1,4	2,9	9	470	0,0084	0,0073
3	sauer	2,8	1,3	4,1	22	1 080	0,0030	0,012
4	alkalisch	5,0	0,5	5,5	60	3 000	0,015	0,025

Abbau von Cantharidin aus Experiment Nr. 1		dpm/mmol	rel. %
Derivat			
Cantharidin		3 740	100
C(2), C(3), C(8) und C(9)			
als Essigsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester	19	874	46,7
C(2) und C(3)	3,4		
als Bariumcarbonat	1,0	197	10,5
C(8) und C(9)	3,0	780	41,7
als Methylammoniumpikrat			

Zählstatistik: Für eine Probe, welche eine Zählrate von 10 ipm über dem Blindwert (34 ipm) aufweist, berechnet sich bei einer Zählzeit von 1200 Min. der Fehler zu $\pm 0,4$ ipm (Vertrauensbereich: 95%). Die Zählraten für die in der Tabelle aufgeführten Derivate aus dem Cantharidin-Abbau lagen um 6-10 ipm über dem Blindwert (34 ipm).

Tabelle 6. *Einbauversuche mit 7-[¹⁴C]-Geraniol*

Experiment Nr.	Spezies	Anzahl	Gewicht g	Applikationsart	Applizierte Aktivität μCi	Versuchsdauer Std.	Zustand der Insekten	Experiment Nr. 5-10						
								Aktivität der Wasserphase (W) μCi	Aktivität der Methylchloridphase (Me) μCi	Gesamt W + Me μCi	Cantharidin $\frac{\text{gesamt dpm}}{\text{dpm/mg}}$	Einbaureate berechnet aus applizierter Aktivität (%)	W + Me Aktivität (%)	
5	<i>Lytta</i>	10	1,12	Injektion	31,5	56	nach 21 Std. 1 tot, nach 45 Std. 5 tot, nach 56 Std. 1 tot							
6	<i>Lytta</i>	7	0,8	Injektion	31,5	43	nach 30 Std. 4 tot, nach 43 Std. 2 tot, nach 18 Std. 3 tot, nach 46 Std. 5 tot							
7	<i>Lytta</i> Larven	10	2,1	Injektion	50,5	46	nach 4 Std. starke Vergiftung							
8	<i>Lytta</i>	1	0,08	Anstreichen	5,7	47	nach 28 Std. 3 tot, nach 50 Std. 1 tot, nach 61 Std. 2 tot							
9	<i>Lytta</i> Larven	10	1,73	Injektion	37,6	50								
10	<i>Lytta</i> Larven	10	1,88	Injektion	14,2	61								

Experiment Nr.	Aufarbeitung	Aktivität der Wasserphase (W) μCi	Aktivität der Methylchloridphase (Me) μCi	Gesamt W + Me μCi	Cantharidin $\frac{\text{gesamt dpm}}{\text{dpm/mg}}$	Einbaureate berechnet aus applizierter Aktivität (%)	Experiment Nr. 9		Experiment Nr. 10	
							dpm/mg	rel. %	dpm/mg	rel. %
5	sauer	3,56	5,88	9,44	35	1 730	95	100	82	100
6	sauer	5,42	2,70	8,12	39	2 004	13	35,8	9	29,8
7	alkalisch	11,25	9,05	20,30	197	9 929	5,3	11,2	7,5	25,1
8	sauer	0,06	0,24	0,30	2	9 540	8,9	24,8	82	20,2
9	alkalisch	9,50	3,52	13,02	95	8 340	9,6	20,2		
10	alkalisch	8,59	1,44	10,03	82					

Derivat	Experiment Nr. 6		Experiment Nr. 9		Experiment Nr. 10	
	dpm/mg	rel. %	dpm/mg	rel. %	dpm/mg	rel. %
Cantharidin	39	100	95	100	82	100
C(2), C(3), C(8) und C(9)			13	35,8	9	29,8
als Essigsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester C(2) und C(3)			5,3	11,2	7,5	25,1
als Bariumcarbonat C(8) und C(9)	2,1	10,7	8,9	24,8	82	20,2
als Methylammoniumpikrat C(10) und C(11)	6,8	46,3	9,6	20,2		
als Bariumcarbonat						

Tabelle 7. Einbauversuche mit 7, 8-³H]-2,7, 8-[¹⁴C]-Geraniol

Experiment Nr.	Spezies	Anzahl	Applikationsart	Applizierte Aktivität μCi	Versuchsdauer Std.	Zustand der Insekten
11	<i>Lytta</i>	10	Injektion	³ H: 1 130 ¹⁴ C: 62	26	nach 26 Std. 6 stark vergiftet alle überlebten
12	<i>Lytta</i>	10	Anstreichen	³ H: 548 ¹⁴ C: 30	48	

Experiment Nr.	Aufarbeitung	Aktivität der Wasserphase (W)		Aktivität der Methylchloridphase (Me)		Gesamt W + Me				
		$\frac{^3\text{H}}{^14\text{C}}$	$\frac{^3\text{H}/^{14}\text{C}}$	$\frac{\mu\text{Ci}}{^3\text{H}}$	$\frac{^14\text{C}}{^3\text{H}}$	$\frac{\mu\text{Ci}}{^3\text{H}}$	$\frac{^14\text{C}}{^3\text{H}}$	$\frac{^3\text{H}/^{14}\text{C}}$		
11	alkalisch	340	41	8,3	810	20	40,5	1 150	61	18,9
12	sauer	3,2	0,8	4,0	0,4	< 0,1	-	-	-	-

Experiment Nr.	Cantharidin		Einbaureate berechnet aus applizierter Aktivität (%)		W + Me-Aktivität (%)	
	dpm/mg	gesamt	dpm	Aktivität (%)	$\frac{^3\text{H}}{^14\text{C}}$	$\frac{^14\text{C}}{^3\text{H}}$
11	431	39	2 230	0,00097	0,00095	0,0017
12	173	11	1 240	0,00016	0,00019	0,24

Tabelle 8. Einbauversuche mit 7', 8-[³H]-Geraniol und (S, R)-2-[¹⁴C]-Mevalolacton

Experiment Nr.	Spezies	Anzahl	Applikationsart	Applizierte Aktivität μCi	Versuchsdauer Std.	Zustand der Insekten	Aktivität der Wasserphase (W)			Aktivität der Methylchloridphase (Me)			Gesamt W + Me			
							^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	
13	<i>Lytta</i>	3	Injektion	-	43	nach 43 Std. 2 in schlechtem Zustand alle überlebten										
14	<i>Lytta</i>	3	Anstreichen	-	43											
15	<i>Lytta</i>	1	Injektion	^3H : 152 ^{14}C : 15,8	40	überlebte										
16	Larve	1	Injektion	^3H : 152 ^{14}C : 15,8	40	nach 40 Std. tot										
17	<i>Lytta</i>	1	Injektion	^3H : 216 ^{14}C : 22,6	40	nach 40 Std. tot										
18	Larve	1	Anstreichen	^3H : 130 ^{14}C : 13,6	40	nach 40 Std. tot										
19	<i>Lytta</i>	1	Anstreichen	^3H : 194 ^{14}C : 20,3	40	überlebte										
20	Larve	1	Anstreichen	^3H : 260 ^{14}C : 27,0	40	überlebte										

Experiment Nr.	Aufarbeitung	Aktivität der Wasserphase (W)			Aktivität der Methylchloridphase (Me)			Gesamt W + Me		
		^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	^3H	^{14}C	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
13	sauer	90	3,1	29,0	46	9,2	5,0	136	12,3	11,1
14	sauer	45	3,3	13,6	97	2,4	40,5	142	5,7	24,1
15	sauer	24	0,5	48,0	8,3	1,4	5,9	32	1,9	17,0
16	sauer	54	4,2	12,8	22,7	5,9	3,8	77	10,1	7,6
17	sauer	103	8,5	12,1	53	10,0	5,3	156	18,5	8,4
18	sauer	20	0,7	28,8	7,5	1,1	6,8	28	1,8	15,3
19	sauer	14	0,7	20,0	13	1,4	9,3	27	2,1	12,9
20	sauer	22	1,3	16,9	10	1,8	5,5	32	3,1	10,3

Tabelle 8 (Fortsetzung)

Experiment Nr.	Cantharidin dpm/mg		$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Cantharidin gesamt dpm		Einbaure berechnet aus applizierter Aktivität (%)		W + Me- Aktivität (%)	
	^3H	^{14}C		^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
	13	75		8 638	0,0089	4 720	532 000	-	-
14	129	574	0,225	6 660	29 600	-	-	0,0021	0,24
15	26	1 135	0,023	1 352	59 100	0,0004	0,17	0,0019	1,45
16	57	3 346	0,016	2 890	173 000	0,0009	0,49	0,0017	0,77
17	84	2 024	0,045	4 880	110 000	0,0010	0,22	0,0014	0,27
18	17	601	0,028	910	32 400	0,0003	0,11	0,0015	0,80
19	43	348	0,124	2 190	17 700	0,0005	0,04	0,0037	0,38
20	58	393	0,149	3 020	20 300	0,0005	0,03	0,0043	0,29

Tabelle 9. Einbauversuche mit 1',12-[^3H]-Farnesol und (S,R)-2-[^{14}C]-Mevalolacton

Experiment Nr.	Spezies	Anzahl	Applikationsart	Applizierte Aktivität μCi	Versuchsdauer Std.	Zustand der Insekten
21	<i>Lytta</i>	2	Injektion	^3H : 88,0	43	nach 43 Std. tot
22	<i>Lytta</i>	3	Injektion	^{14}C : 21,5	21	alle überlebten
23	<i>Lytta</i>	1	Injektion	^3H : 86,0	40	überlebte
24	Larve	1	Injektion	^{14}C : 21,0	40	überlebte
25	<i>Lytta</i>	1	Injektion	^3H : 33,8	40	überlebte
26	Larve	1	Injektion	^{14}C : 8,3	40	überlebte
27	<i>Lytta</i>	1	Anstreichen	^3H : 20,3	40	überlebte
28	Larve	1	Anstreichen	^{14}C : 5,0	40	überlebte
29	<i>Lytta</i>	1	Anstreichen	^3H : 47,4	40	überlebte
30	Larve	1	Anstreichen	^{14}C : 11,6	40	überlebte
31	<i>Lytta</i>	1	Anstreichen	^3H : 27,0	40	überlebte
32	Larve	1	Anstreichen	^{14}C : 6,6	40	überlebte
33	<i>Lytta</i>	1	Anstreichen	^3H : 54,1	40	überlebte
34	Larve	1	Anstreichen	^{14}C : 13,2	40	überlebte

Experiment Nr.	Aufarbeitung	Aktivität der Wasserphase (W)		Aktivität der Methylenchloridphase (Me)		Gesamt W + Me	
		$\frac{\mu\text{Ci}}{^3\text{H}}$	$\frac{^{14}\text{C}}{^3\text{H}/^{14}\text{C}}$	$\frac{\mu\text{Ci}}{^3\text{H}}$	$\frac{^3\text{H}/^{14}\text{C}}$	$\frac{\mu\text{Ci}}{^3\text{H}}$	$\frac{^{14}\text{C}}{^3\text{H}/^{14}\text{C}}$
21	sauer	37,1	2,3	24,0	4,3	61,1	6,6
22	alkalisch	15,5	0,48	39,6	8,74	55,1	9,2
23	sauer	24,6	2,8	20,5	3,4	45,1	6,2
24	sauer	5,7	0,12	1,9	0,27	7,6	0,39
25	sauer	6,3	0,17	1,9	0,32	8,2	0,49
26	sauer	4,2	0,53	2,7	0,71	6,9	1,24
27	sauer	3,1	0,22	3,1	0,50	6,2	0,72
28	sauer	4,1	0,32	4,6	0,47	8,7	0,79

Experiment Nr.	Cantharidin dpm/mg		Cantharidin gesamt		Einbaureate berechnet aus applizierter Aktivität (%)		W + Me- Aktivität (%)	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
21	2 241	12 406	115 000	635 000	-	-	0,085	4,3
22	5 313	6 917	265 100	345 200	0,14	0,72	0,22	1,7
23	350	2 963	18 200	155 000	0,0096	0,33	0,018	1,1
24	163	1 053	8 470	54 800	0,011	0,30	0,051	6,3
25	388	592	19 500	29 800	0,044	0,27	0,11	2,7
26	25	612	1 390	34 400	0,0013	0,13	0,0091	1,3
27	38	341	2 090	18 900	0,0035	0,13	0,015	1,2
28	53	328	2 680	17 000	0,0022	0,058	0,014	0,97

Tabelle 10. *Einbauversuche mit 2-[14C]-Glycin*

Experiment Nr.	Spezies	Anzahl	Gewicht g	Applikationsart	Applizierte Aktivität μCi	Versuchsdauer Std.	Zustand der Insekten
29	<i>Lyria</i> Larven	10	2,0	Injektion	35,0	44	nach 44 Std. 2 tot
30	<i>Lyria</i>	5	0,6	Injektion	20,3	74	alle überlebten
31	<i>Lyria</i>	3	0,5	Injektion	19,3	48	alle überlebten
32	<i>Lyria</i> Larven	8		Injektion	12,3	40	alle überlebten

Experiment Nr.	Aufarbeitung	Aktivität der Wasserphase (W) μCi	Aktivität der Methylchloridphase (Me) μCi	Gesamt W + Me μCi	Cantharidin		Einbaureate berechnet aus	
					dpm/mg	gesamt dpm	applizierter Aktivität (%)	W + Me- Aktivität (%)
29	alkalisch	20,3	1,4	21,7	207	20 700	0,027	0,043
30	sauer	11,2	0,5	11,7	15	739	0,002	0,003
31	sauer	17,6	0,03	17,6	2	-	-	-
32	sauer	5,6	0,3	5,9	33	4 650	0,017	0,0036

Abbau von Cantharidin aus Experiment Nr. 29		dpm/mg	dpm/mmol	rel. %
Cantharidin				
C(2), C(3), C(8) und C(9)		207	40 600	100
als Essigsäure- <i>p</i> -bromphenacyl-ester				
C(2) und C(3)		37	9 500	46,7
als Bariumcarbonat				
C(8) und C(9)		26	5 110	25,2
als Methylammoniumpikrat				
Es wurde kein radiokonstantes Produkt erhalten				

Tabelle 11. Abbau von Cantharidin aus den Einbauversuchen mit U-[¹⁴C]-Leucin, U-[¹⁴C]-Isoleucin und 1-[¹⁴C]-Glucose

Einbauversuch mit Derivat	U-[¹⁴ C]-Leucin		U-[¹⁴ C]-Isoleucin		1-[¹⁴ C]-Glucose		
	dpm/mg	dpm/mmol	dpm/mg	dpm/mmol	dpm/mg	dpm/mmol	rel. %
Cantharidin	2 393	470 000	1 172	229 800	798	156 400	100
C(2), C(3), C(8) und C(9) als Essigsäure- <i>p</i> -bromphenacylfester	330	84 800	160	41 200	91	23 400	29,9
C(2) und C(3) als Bariumcarbonat	142	28 000	113	22 300	22	4 300	5,5
C(8) und C(9) als Methylammoniumpikrat	181	47 100	–	–	–	–	–
C(8) und C(9) ^{a)} als Bariumcarbonat	–	–	99	19 500	90	17 750	22,7
C(10) und C(11) als Bariumcarbonat	81	15 950	118	23 290	83	16 340	21,0

^{a)} CH₃NH₂ wurde nach einer Vorschrift von Britt [11] mit KMnO₄ oxidiert.

120°/0,01 Torr zusammendestilliert und anschliessend das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis bestimmt: $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 9.6$. Spezifische Aktivität: ^3H : 216 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, ^{14}C : 22,6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Vgl. Tab. 8.

2.4.6. *Einbauversuche mit einer Mischung von 11',12'-[^3H]-Farnesol und (S,R)-2-[^{14}C]-Mevalolacton.* 8,9 mg Farnesol, 1,1 mg 11',12'-[^3H]-Farnesol aus 1.2.6 und 8,9 mg 2-[^{14}C]-Mevalolacton wurden wie unter 2.4.5 gemischt und das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis wie unter 2.4.5 bestimmt: $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 4,1$. Spezifische Aktivität: ^3H : 67,7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, ^{14}C : 16,5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Vgl. Tab. 9.

2.4.7. *Einbauversuch mit 1-[^{14}C]-Glycin.* 8 *Lytta* Larven (1,5 g) wurden eine wässrige Lösung von insgesamt 46,5 μCi 1-[^{14}C]-Glycin (41,5 $\text{mCi}/\text{mmol}^{13}$), 0,5 mCi/ml) injiziert. Bei Abbruch des Experimentes nach 45 Std. waren 3 Larven tot. Aufarbeitung: alkalisch. Aktivität der Wasserphase: 21,3 μCi . Aktivität der Methylenchloridphase: 0,5 μCi . Cantharidin: 19,5 dpm/mg , gesamt: 1950 dpm . Einbaureate: 0,0018%¹¹⁾ bzw. 0,004%.

2.4.8. *Einbauversuche mit 2-[^{14}C]-Glycin.* Es wurde eine wässrige Lösung von 2-[^{14}C]-Glycin (22,8 $\text{mCi}/\text{mmol}^{13}$), 0,5 mCi/ml) verwendet. Vgl. Tab. 10.

2.4.9. *Einbauversuch mit U-[^{14}C]-Leucin.* Applikation von U-[^{14}C]-Leucin: 5 *Lytta*¹⁵⁾ (0,66 g) wurden jeweils 15–45 mg einer Lösung von U-[^{14}C]-Leucin in 0,001N Salzsäure injiziert (spezifische Aktivität: 8,0 $\text{mCi}/\text{mmol}^{13}$); insgesamt wurden 0,1 mCi appliziert). Beim Abbruch des Experimentes nach 24 Std. war ein Insekt tot. Einbaureate: 1,13%. Vgl. Tab. 11.

2.4.10. *Einbauversuch mit U-[^{14}C]-Isoleucin.* Applikation von U-[^{14}C]-Isoleucin: 3 *Lytta*¹⁵⁾ (0,45 g) wurden jeweils 15–45 mg einer Lösung von U-[^{14}C]-Isoleucin in 0,01N Salzsäure injiziert (spezifische Aktivität: 8,4 $\text{mCi}/\text{mmol}^{13}$); insgesamt wurden 0,05 mCi appliziert). Beim Abbruch des Experimentes nach 24 Std. befanden sich die Insekten in gutem Zustand. Einbaureate: 1,26%. Vgl. Tab. 11.

2.4.11. *Einbauversuch mit 1-[^{14}C]-Glucose.* Applikation von 1-[^{14}C]-Glucose: 6 *Lytta*¹⁵⁾ (0,95 g) wurden jeweils 15–45 mg einer Lösung von 1-[^{14}C]-Glucose in Wasser injiziert (spezifische Aktivität: 2,9 $\text{mCi}/\text{mmol}^{13}$); insgesamt wurden 0,05 mCi appliziert). Beim Abbruch des Experimentes nach 24 Std. befanden sich die Insekten in gutem Zustand. Einbaureate: 0,14%. Vgl. Tab. 11.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. R. Sierra, W.-D. Woggon & H. Schmid, *Experientia* 32, 142 (1976).
- [2] Ch. Schlatter, E. E. Waldner & H. Schmid, *Experientia* 24, 994 (1968).
- [3] H. Günther, E. Ramstad & H. G. Floss, *J. pharm. Sci.* 58, 1274 (1969).
- [4] J. R. Sierra, W.-D. Woggon & H. Schmid, in Vorbereitung.
- [5] Ch. Schlatter & A. Dürsteler-Meier, *Chimia* 24, 33 (1970).
- [6] L. Horner, H. Hoffmann & H. G. Wippel, *Chem. Ber.* 91, 61 (1958).
- [7] F. A. Hochstein & W. G. Brown, *J. Amer. chem. Soc.* 70, 3484 (1948); R. S. Davidson, W. H. H. Günther, S. M. Waddington-Feather & B. Lythgo, *J. chem. Soc.* 1964, 4907.
- [8] H. D. Durst & E. Leete, *J. Labelled Comp.* 7, 52 (1971).
- [9] E. E. Waldner, Ch. Schlatter & H. Schmid, *Helv.* 52, 15 (1969).
- [10] R. B. Bates & D. M. Gale, *J. Amer. chem. Soc.* 82, 5749 (1960); J. B. Siddall, M. Bishop & J. H. Fried, *ibid.* 91, 1953 (1969).
- [11] J. J. Britt, Dissertation ETH No. 2948, Zürich 1959.
- [12] F. Cramer & W. Böhm, *Angew. Chem.* 71, 775 (1959).
- [13] F. Lynen, B. W. Agranoff, H. Eggerer, H. Henning & E. M. Möslein, *Angew. Chem.* 71, 738 (1958).
- [14] R. Kühn, F. Köhler & L. Köhler, *Z. physiol. Chem.* 242, 171 (1936).
- [15] J. P. Kutney, A. K. Verna & R. N. Young, *Tetrahedron* 29, 2661 (1973).
- [16] H. Schildknecht, U. Maschwitz & H. Winkler, *Naturwissenschaften* 55, 112 (1968); H. Schildknecht, K. Winkler & U. Maschwitz, *Z. Naturforsch.* 23b, 637 (1968).
- [17] K. Grob, *Helv.* 48, 1362 (1965); *idem*, *ibid.* 51, 718 (1968).
- [18] H. Frohofer, *Z. Anal. Chem.* 253, 97 (1971).
- [19] H. Normant, *C. r. hébd. séances Acad. Sci.* 240, 314 (1955).
- [20] G. Saucy & R. Marbet, *Helv.* 50, 2091 (1967).
- [21] C. F. Garbers, H. Schmid & P. Karrer, *Helv.* 37, 1336 (1954).

¹⁵⁾ Diese Insekten stammten aus der Gegend von Contessa-Entinella, Provinz Palermo, Sizilien.