

## 124. Einbauversuche mit ( $^3\text{H}$ und $^{14}\text{C}$ )-doppelmarkiertem Farnesol in Cantharidin

5. Mitteilung zur Biosynthese des Cantharidins<sup>1)2)</sup>

von Martin G. Peter<sup>3)4)</sup>, Hans-Rudolf Waespe<sup>5)6)</sup>,  
Wolf-Dietrich Woggon und Hans Schmid<sup>†</sup>

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

(24.III.77)

---

### Incorporation experiments with ( $^3\text{H}$ and $^{14}\text{C}$ ) doubly labelled farnesols into cantharidin

#### Summary

After injection of 11',12- $^3\text{H}$ -7- $^{14}\text{C}$ -farnesol or 11',12- $^3\text{H}$ -5,6- $^{14}\text{C}$ -farnesol, the  $^3\text{H}$ -label is located specifically in the C(9)-methyl-group of cantharidin, whereas the  $^{14}\text{C}$ -labelling pattern follows an incorporation *via* acetic acid (*Scheme 4*). C-Atoms 5, 6 and 7 from the middle part of the farnesol molecule are utilized for cantharidin biosynthesis to an extent that is about 2.1–11% of the incorporation rate of the methyl groups C(11') and C(12), depending on the position of the  $^{14}\text{C}$ -label in farnesol. These results confirm our earlier hypothesis [1] that the  $\text{C}_{10}$ -molecule cantharidin is biosynthesized from the  $\text{C}_{15}$ -precursor farnesol which is cleaved between C(1)–C(2), C(4)–C(5), and C(7)–C(8). The synthesis of 7- $^{14}\text{C}$ -farnesol and of 5,6- $^{14}\text{C}$ -farnesol is described.

---

**1. Einleitung.** - In vorangehenden Mitteilungen [1–3] wurde aus den Resultaten von Einbauversuchen mit radioaktiv markiertem Acetat, Mevalonat und Farnesol (**1**) in Insekten der Familie *Meloidae* (*Coleoptera*) das in *Schema 1* formulierte Modell für die Biosynthese des Cantharidins abgeleitet, wonach Farnesol (**1**) unter Abspaltung der C-Atome 1, 5, 6, 7 und 7' in Cantharidin (**2**) umgewandelt wird. (Die Bezifferungen der Verbindungen **1** und **2** im *Schema 1* sind voneinander unabhängig.)

Im Zusammenhang mit einer Betrachtung über den möglichen Verlauf der Umwandlung von **1** in **2** stellte sich die Frage nach dem Verbleib der C-Atome 5, 6, 7 und 7' des Farnesols. Aus diesem Grunde war es erforderlich, entsprechende mittel-

---

1) 4. Mitt.: siehe [1].

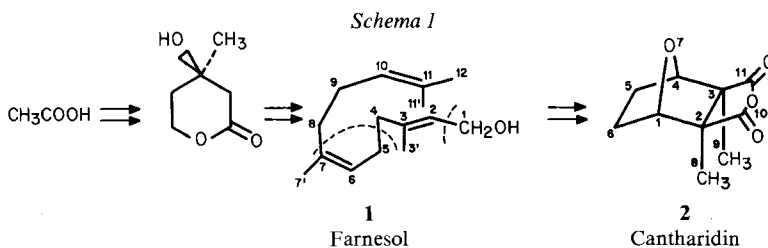
2) Korrespondenzautor: W.-D. Woggon.

3) Teil der Dissertation, Universität Zürich, 1973.

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

5) Teil der Dissertation, Universität Zürich, 1974.

6) Neue Adresse: *Ciba-Geigy AG*, 4002 Basel.

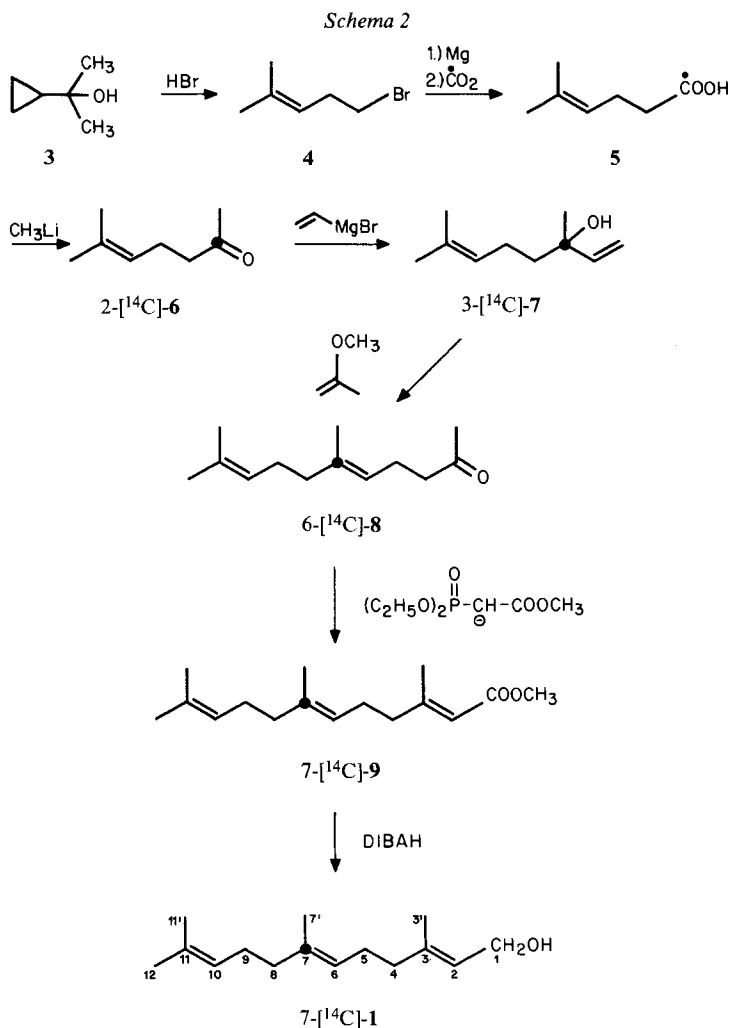


ständig  $^{14}\text{C}$ -markierte Farnesole zu synthetisieren und deren Einbau mit  $11',12\text{-}[^3\text{H}]\text{-Farnesol}$  ( $11',12\text{-}[^3\text{H}]\text{-1}$ ) zu vergleichen, dessen radioaktive Markierung mit Sicherheit in Cantharidin inkorporiert wird (vgl. [1]). Im folgenden wird über die Synthesen von  $7\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Farnesol}$  ( $7\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-1}$ ) und  $5,6\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Farnesol}$  ( $5,6\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-1}$ ) berichtet sowie über die nach Zumischen von  $11',12\text{-}[^3\text{H}]\text{-Farnesol}$  ( $11',12\text{-}[^3\text{H}]\text{-1}$ ) als internem Standard ausgeführten Einbauversuche.

**2. Synthesen radioaktiv markierter Verbindungen.** - Zur Synthese von  $7\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Farnesol}$  ( $7\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-1}$ ), s. *Schema 2*, wurde zunächst nach der von *Julia et al.* [4] beschriebenen Methode 2-Cyclopropyl-2-propanol (**3**) hergestellt, das mit Bromwasserstoffsäure in 4-Methyl-3-penten-1-bromid (**4**) übergeführt wurde. Durch Carboxylierung der *Grignard*-Verbindung von **4** mit  $^{14}\text{C}$ -Kohlendioxid [5] gelangte man in 83% Ausbeute zu  $1\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-5-Methyl-4-hexensäure}$  (**5**), die durch Behandeln mit 2 mol Methyl-lithium in 81% Ausbeute in  $2\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-6-Methyl-5-hepten-2-on}$  ( $2\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-6}$ ) umgewandelt wurde. Die weiteren Syntheseschritte führten nach den in [1] beschriebenen Reaktionen über die Verbindungen  $3\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-7}$ ,  $6\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-8}$  und  $7\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-9}$  schliesslich zu ( $7\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-1}$ ), das sich bei gas-chromatographischer Prüfung als ein Gemisch aus 40% (*E,E*)-**1**, 34% (*2E,6Z*)-**1**, 11% (*2Z,6E*)-**1**, 10% (*Z,Z*)-**1** sowie 5% nicht identifizierter Beimengungen erwies. Die Gesamtausbeute betrug 44% der als  $^{14}\text{C}$ -Bariumcarbonat ursprünglich eingesetzten Aktivität. Die spezifische Aktivität wurde zu 4,72 mCi/mmol bestimmt.

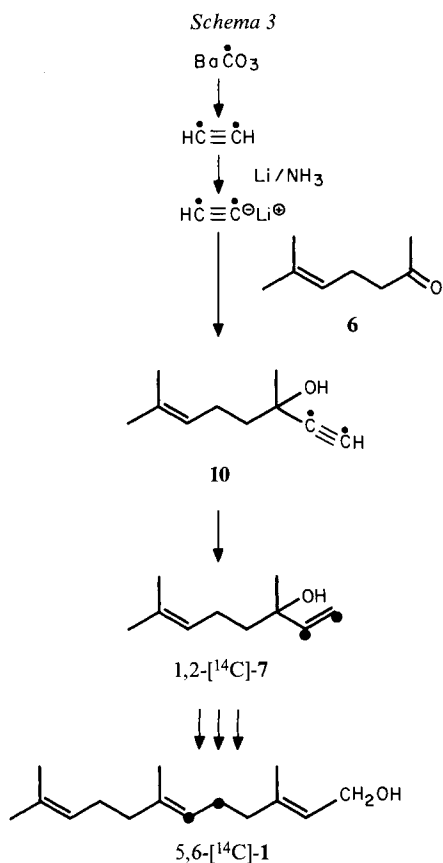
$5,6\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Farnesol}$  ( $5,6\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-1}$ ) wurde nach dem in *Schema 3* beschriebenen Weg hergestellt. Aus  $^{14}\text{C}$ -Bariumcarbonat erhielt man durch Verschmelzen mit Barium und anschliessende Zersetzung des Carbids mit Wasser  $^{14}\text{C}$ -Acetylen, das nach der von *Würsch* [6] entwickelten Methode im Mikroautoklaven über das  $^{14}\text{C}$ -Lithium-acetylid an 6-Methyl-5-hepten-2-on (**6**) in 53% Ausbeute angelagert wurde. Durch Hydrieren des radioaktiven Propargylalkohols **10** in Gegenwart von mit Äthyl-disulfid vergiftetem *Lindlar*-Katalysator gelangte man in quantitativer Ausbeute zu  $1,2\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Linalool}$  ( $1,2\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-7}$ ). Die weiteren Umsetzungen folgten den in [1] gegebenen Vorschriften (vgl. *Schema 2*) und führten schliesslich in 42,2% Ausbeute (bezogen auf radioaktives Acetylen) zu  $5,6\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-Farnesylsäuremethylester}$  ( $5,6\text{-}[^{14}\text{C}]\text{-9}$ ) der spezifischen Aktivität 10,47 mCi/mmol, der im Gemisch mit  $11',12\text{-}[^3\text{H}]\text{-9}$  zu den entsprechenden doppelmarkierten Farnesolen  $11',12\text{-}[^3\text{H}]\text{-5,6-}[^{14}\text{C}]\text{-1}$ <sup>7)</sup> reduziert wurde (vgl. 3.2).

<sup>7)</sup> Wie üblich bedeuten diese und ähnliche Ausdrücke Gemische, die stochastisch  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -markierte (Farnesol- bzw. andere) Molekeln enthalten.



**3. Herstellung der Injektionspräparate.** - 3.1. *11',12-<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-Farnesol* (*11',12-<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-1*). Das für die Einbauversuche 3.1-3.3 verwendete radioaktive Farnesol *11',12-<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-1* wurde durch Mischen von *7-[<sup>14</sup>C]-1* mit *11',12-<sup>3</sup>H]-1* der spezifischen Aktivität 400 mCi/mmol hergestellt, anschliessend wurde chromatographiert und bei 0,01 Torr destilliert. Die Stereoisomerenzusammensetzung von *7-[<sup>14</sup>C]-1* und *11',12-<sup>3</sup>H]-1* ist aufgrund des gemeinsamen Syntheseweges [1] als gleich anzusehen.

3.2. *11',12-<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesol* (*11',12-<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1*). Zur Herstellung des Injektionspräparates *11',12-<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1* für die Experimente 3.4.1-3.4.4 (siehe *Tabelle 1*) mischte man *5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesyssäuremethylester* (*5,6-[<sup>14</sup>C]-9*, Stereoisomerenmischung) mit (*E,E*)-*11',12-<sup>3</sup>H]-9* (vgl. [1], [7]), der spezifischen Aktivität 32,0 mCi/mmol bzw. für die Versuche 3.5.1-3.5.2 (*E,E*)-*5,6-[<sup>14</sup>C]-9* mit (*E,E*)-*11',12-*



$^3\text{H}$ -**9** der spezifischen Aktivität 77,6 mCi/mmol [7]. Eine Anreicherung des (*E,E*)-Stereoisomeren auf  $91 \pm 1\%$  (*E,E*)-11',12- $^3\text{H}$ -**9** gelang mittels präp. DC. an mit Silbernitrat imprägnierten Kieselgelplatten. Anschliessend wurden die doppelmarkierten Ester 11',12- $^3\text{H}$ -5,6- $^{14}\text{C}$ -**9** mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH) zu den entsprechenden 11',12- $^3\text{H}$ -5,6- $^{14}\text{C}$ -Farnesolen (11',12- $^3\text{H}$ -5,6- $^{14}\text{C}$ -**1**) umgesetzt, chromatografiert und bei 0,01 Torr destilliert.

**4. Einbauversuche.** - Die Methodik der Injektion von radioaktiv markierten Farnesolen **1**, der Isolierung des Cantharidins (**2**) und der Abbaureaktionen zur Bestimmung der Isotopenverteilung in **2** wurden bereits in [1] beschrieben.

Gemäss dem in *Schema 1* dargestellten Biosynthesemodell sollte nach Injektion von 11',12- $^3\text{H}$ -7- $^{14}\text{C}$ -Farnesol (11',12- $^3\text{H}$ -7- $^{14}\text{C}$ -**1**) oder von 11',12- $^3\text{H}$ -5,6- $^{14}\text{C}$ -Farnesol (11',12- $^3\text{H}$ -5,6- $^{14}\text{C}$ -**1**) ein Anstieg des  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses im isolierten Cantharidin (**2**) auftreten. Im Extremfall erwartet man in **2**  $^3\text{H}/^{14}\text{C} \rightarrow \infty$ . Die Resultate in *Tabelle 1* zeigen, dass *de facto* die  $^3\text{H}$ -Aktivität im Vergleich zur  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in **2** bevorzugt eingebaut wird. Das  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis im Cantharidin ist nach Applikation von 11',12- $^3\text{H}$ -7- $^{14}\text{C}$ -**1** um den Faktor  $15,1 \pm 2,4$  grösser als im

Tabelle 1. Einbauversuche mit doppelmarkierten Farnesolen in Cantharidin

Vorläufer	Experiment	Farnesol $^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Cantharidin (dpm/mmol) $\times 10^{-4}$ $^{14}\text{C}$	Einbauraten <sup>a)</sup> $^3\text{H}$ $^{14}\text{C}$	Cantharidin $^3\text{H}/^{14}\text{C}$	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (in Cantharidin) $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (in Farnesol)	Normierter Quotient <sup>b)</sup>
11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-7-[ $^{14}\text{C}$ ]- <b>1</b> (Stereoisomergemisch, gemäss Synthese, vgl. Schema 2)	3.1	3,30	125,4	0,037	0,0030	12,27	24,54
	3.2	3,30	104,5	0,101	0,0062	16,48	32,96
	3.3	5,16	96,8	0,043	0,0026	16,51	33,02
11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-5, 6-[ $^{14}\text{C}$ ]- <b>1</b> (90% (E, E)-11', 12-[ $^3\text{H}$ ]- <b>1</b> ; 3.4.2 5, 6-[ $^{14}\text{C}$ ]- <b>1</b> (als Stereoisomergemisch gemäss Synthese, vgl. Schema 3)	3.4.1	2,42	167,2	0,56	0,065	21,0	17,36
	3.4.2	2,42	324,7	1,09	0,196	13,4	11,08
	3.4.3	2,42	473,6	1,59	0,337	11,4	9,42
	3.4.4	2,42	276,4	21,81	0,93	12,7	10,50
(E, E)-11', 12-[ $^3\text{H}$ ]- 5, 6-[ $^{14}\text{C}$ ]- <b>1</b> (91 $\pm$ 1% (E, E)- <b>1</b> )	3.5.1	3,47	106,0	0,19	0,030	22,3	12,86
	3.5.2	3,47	98,4	0,18	0,012	50,2	28,94

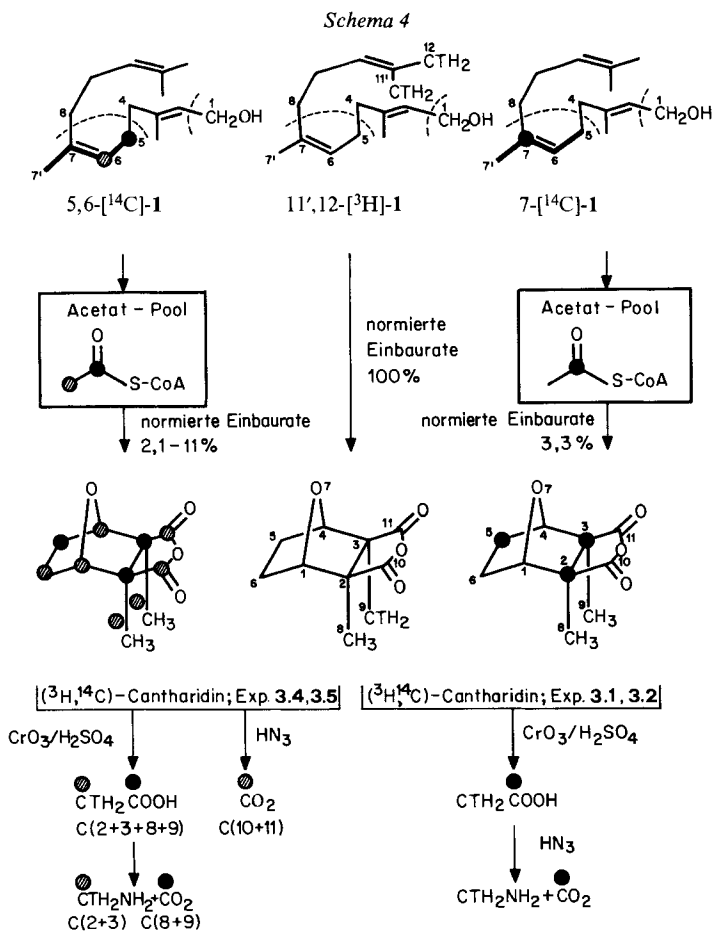
<sup>a)</sup> Bezogen auf die applizierte Aktivität.

<sup>b)</sup> Normierter Quotient =  $2 \times \frac{^3\text{H}/^{14}\text{C} \text{ (in Cantharidin)}}{^3\text{H}/^{14}\text{C} \text{ (in Farnesol)}}$

Vorläufer (Experiment 3.1-3,3, *Tabelle 1*), während man nach Injektion von 11',12-[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1 eine Erhöhung des <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnisses im Cantharidin um den Faktor 6,1 ± 1,8 (Experimente 3.4.1-3.4.4) bzw. 10,5 ± 5,7 (Experimente 3.5.1 und 3.5.2) fand.

Die beträchtlichen Unterschiede der Mittelwerte in den beiden letzten Versuchsreihen können durch die später beobachteten unterschiedlichen Metabolismus-Geschwindigkeiten der verschiedenen Stereoisomeren des Farnesols verursacht sein [7] [8]. Die Ergebnisse der Experimente 3.4.1 und 3.4.4 vermitteln deshalb nur einen qualitativen Eindruck bezüglich des relativen Einbaus der <sup>3</sup>H- und <sup>14</sup>C-Markierung in Cantharidin und werden bei der späteren Diskussion nicht berücksichtigt.

Die Cantharidin-Präparate aus den Experimenten 3.1 und 3.2 wurden vereinigt, von einem Teil das Cantharidin-*N*-phenylimid durch Erhitzen mit Anilin im Bombenrohr [9] hergestellt und das restliche radioaktive Cantharidin dem in *Schema 4* gezeigten Abbau unterworfen. Aus den in *Tabelle 2* dargestellten Resultaten lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die <sup>3</sup>H-Aktivität aus dem 11',12-[<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-



Farnesol spezifisch an C(9) des Cantharidins lokalisiert ist<sup>8)</sup>. Die geringe <sup>14</sup>C-Aktivität des Cantharidins ist zu etwa  $\frac{2}{3}$  in C(2+3) enthalten. Diese <sup>14</sup>C-Isotopenverteilung lässt sich mit einem Einbau der <sup>14</sup>C-Aktivität von 7-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (7-[<sup>14</sup>C]-1) via 1-[<sup>14</sup>C]-Essigsäure interpretieren [2], die aus den mittleren vier C-Atomen des Farnesols gebildet worden sein könnte (vgl. [12]).

Auch nach Einbauversuchen mit 11',12-[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1) fand man die <sup>3</sup>H-Aktivität spezifisch in der Methylgruppe C(9) des Cantharidins lokalisiert<sup>8)</sup>, siehe *Tabelle 3* und *Schema 4*. Die C-Atome 2, 3, 8 und 9 enthielten zusammen 42,4% bzw. 45,9% der molaren <sup>14</sup>C-Aktivität des Cantharidins, davon war etwas weniger als die Hälfte in C(2) und C(3) lokalisiert. Die Carboxylgruppen des Cantharidins C(10) und C(11) schliesslich wiesen zusammen 18,2 bzw. 20,9% der Gesamtaktivität auf. Aus dieser Isotopenverteilung von etwa 10% <sup>14</sup>C pro C-Atom des Cantharidins ist ersichtlich, dass im Falle der Applikation von 11',12-

Tabelle 2. *Abbau von Cantharidin aus Einbauversuchen mit 11',12-[<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-[<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-1) (vereinigte Präparate aus den Experimenten 3.1 und 3.2)*

Derivat	(dpm/mmol) × 10 <sup>-4</sup>		rel. %	
	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
Cantharidin	112,0	2,37	100	100
Cantharidin- <i>N</i> -phenylimid	115,0	2,42	103	102
C(2+3+8+9) <sup>a)</sup>	51,5	0,743	91	62
C(2+3) <sup>b)</sup>	-	0,542	-	45
C(8+9) <sup>c)</sup>	45,8	0,042	81	3,5

a) Als Essigsäure-*p*-bromphenacylester.

b) Als Bariumcarbonat.

c) Als Methylammoniumpikrat.

Tabelle 3. *Abbau von Cantharidin aus Einbauversuchen mit 11',12-[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1)*

Experiment	Derivat	(dpm/mmol) × 10 <sup>-4</sup>		rel. %	
		<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
3.4.2	Cantharidin	324,7	24,17	100	100
	C(2+3+8+9) <sup>a)</sup>	166,5	5,12	103	42,4
	C(2 und 3) <sup>b)</sup>	-	2,19	-	18,1
3.5.2	Cantharidin	98,5	1,96	100	100
	C(2+3+8+9) <sup>a)</sup>	42,8	0,45	86,9	45,9
3.4.4	Cantharidin	276,4	21,81	100	100
	C(10+11) <sup>b)</sup>	-	1,99	-	18,2
3.5.1	Cantharidin	106,0	4,78	100	100
	C(10+11) <sup>b)</sup>	-	0,50	-	20,9

a) Als Essigsäure-*p*-bromphenacylester.

b) Als Bariumcarbonat.

<sup>8)</sup> Durch Abbaureaktionen, die über chirale Derivate bekannter absoluter Konfiguration [9] des Cantharidins geführt wurden, das man nach Applikation von 2-[<sup>3</sup>H,<sup>14</sup>C]-Mevalonat [10] bzw. 2-[<sup>14</sup>C]-Farnesyssäuremethylester (2-[<sup>14</sup>C]-9) [11] erhielt, ist sichergestellt, dass C(11') und C(12) des Farnesols die C-Atome 9 und 11 des Cantharidins markieren.

[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1 spezifisch <sup>3</sup>H-markiertes, aber uniform <sup>14</sup>C-markiertes Cantharidin entsteht, wobei angenommen werden kann, dass der abgespaltene C<sub>4</sub>-Mittelteil des Farnesols (C-Atome 5, 6, 7 und 7') zu Essigsäure metabolisiert wird. Die Einbaurate der <sup>14</sup>C-Aktivität in Cantharidin ist auch in diesem Falle signifikant niedriger als die der <sup>3</sup>H-Aktivität.

Zur Beurteilung der wahren Einbauraten der Methylgruppe C(11') bzw. C(12) des Farnesols und der mittleren vier C-Atome muss noch eine Korrektur angebracht werden. Wir beobachteten bei Einbauversuchen mit (*E,E*)-11',12-[<sup>3</sup>H]-2-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-[<sup>3</sup>H]-2-[<sup>14</sup>C]-1), dass von der <sup>3</sup>H-Aktivität des Vorläufers noch 50 ± 12% im isolierten Cantharidin auftraten [8]. Mithin sind zur Normierung des internen Standards die Werte für die <sup>3</sup>H-Inkorporation mit einem statistischen Faktor von 2 zu multiplizieren. Wie aus dem «normierten Quotienten» <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C im Cantharidin zu <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C im Farnesol (Tabelle 1, letzte Spalte) ersichtlich ist, wurde bei Applikation von 11',12-[<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-[<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-1) <sup>3</sup>H- um den Faktor 30,2 ± 4,9 häufiger als <sup>14</sup>C-Aktivität in Cantharidin inkorporiert. Das entspricht einer normierten Einbaurate von 3,3% der <sup>14</sup>C-Aktivität des 7-[<sup>14</sup>C]-1 bezogen auf einen normierten Einbau des 11',12-[<sup>3</sup>H]-1 von 100%.

Die Beobachtungen eines kleineren «normierten Quotienten» nach Applikation von 11',12-[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1 (12,1 ± 3,6 in den Experimenten 3.4.1-3.4.4 bzw. 20,9 ± 11,4 in den Experimenten 3.5.1 und 3.5.2) entspricht der Erwartung, wenn der Farnesol-Mittelteil zu Essigsäure metabolisiert wird, vgl. Schema 4. In diesem Fall entsteht uniform <sup>14</sup>C-markiertes Acetat, dessen Carboxylgruppe die C-Atome 2, 3 und 5, während die Methylgruppe die C-Atome 1, 4, 6, 8, 9, 10 und 11 des Cantharidins markiert. Somit entstammen 30% der molaren <sup>14</sup>C-Aktivität des Cantharidins der Markierung an C(5) des injizierten Farnesols, während die restlichen 70% aus der Markierung an C(6) des Terpenalkohols 5,6-[<sup>14</sup>C]-1 hervorgehen.

Berechnet man mit Hilfe der Resultate aus 3.5.1 und 3.5.2 separat die normierten Einbauraten der C-Atome 5 und 6 von 5-[<sup>14</sup>C]-1 bzw. 6-[<sup>14</sup>C]-1 in bezug auf die normierten Inkorporationsraten (= 100%) der beiden Methylgruppen von 11',12-[<sup>3</sup>H]-1 in Cantharidin (2), so erhält man Werte von 2,1-4,7% für 5-[<sup>14</sup>C]-1 und 4,9-11% für 6-[<sup>14</sup>C]-1. Man erkennt, dass die normierte Einbaurate für 5-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (5-[<sup>14</sup>C]-1) relativ zu 11',12-[<sup>3</sup>H]-1 entsprechend einer Inkorporation dieser <sup>14</sup>C-Markierung in Cantharidin *via* 1-[<sup>14</sup>C]-Acetat in der gleichen Grössenordnung liegt wie jene für 7-[<sup>14</sup>C]-1.

Die Frage, ob die Essigsäure aus dem biologischen Abbau des Farnesols entsteht, bevor dieses in die zum Cantharidin führenden enzymatischen Reaktionen eingeschleust wird, oder ob sie während der Umwandlung von Farnesol in Cantharidin aus dem abgespaltenen C<sub>4</sub>-Fragment entsteht, kann hier nicht beantwortet werden. Es ist jedoch erwiesen, dass, in Abhängigkeit von der markierten Stellung, der Mittelteil des Farnesols *via* Acetat mit 2-11% der Inkorporationsrate beider Methylgruppen C(11') und C(12) des Farnesols (C(11') und C(12)) an der Biosynthese von Cantharidin beteiligt ist.

Die voranstehend beschriebenen Experimente sind eine Bestätigung der im Schema 1 formulierten Hypothese, wonach der Sesquiterpenalkohol Farnesol (1) unter Verlust seiner C-Atome 1, 5, 6, 7 und 7' in Cantharidin umgewandelt wird.



Die Frage, inwieweit die Annahme einer (2*E*,6*Z*)-Konfiguration des Farnesols (**1**) berechtigt ist (vgl. *Schema 1*), wurde durch Einbauversuche mit allen vier Stereoisomeren des Farnesols (**1**) untersucht. Darüber wird in einer nächsten Mitteilung [8] berichtet.

Die vorliegende Arbeit wurde in dankenswerter Weise vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* unterstützt. Ferner danken wir den Herren Dr. J. Würsch und Dr. R. Barner (*Hoffmann-La Roche AG.*, Basel) für die grosszügige Unterstützung bei der Darstellung von 1,2-<sup>14</sup>C]-Linalool (1,2-<sup>14</sup>C]-**7**), Prof. K. Grob (*EAWAG*, Dübendorf) für seine Hilfe bei gas-chromatographischen Problemen, Prof. W. von Philipsborn und seinen Mitarbeitern (Universität Zürich) für NMR.-Untersuchungen sowie H. Frohofer (mikroanalytische Abteilung der Universität Zürich) für Radioaktivitätsmessungen.

### Experimenteller Teil

**Allgemeine Bemerkungen.** - Abweichungen von der in [1] angegebenen Methodik sind im folgenden aufgeführt. Die Bestimmungen der spezifischen Aktivität hochradioaktiver Verbindungen erfolgte in einigen Fällen nach Lösen der Substanzprobe in einer bekannten Menge Diphenyläther und anschließender Verbrennungsanalyse. - Silbernitrat-impregnierter präparative Dünnschichtplatten (20×20 cm) wurden durch Beschichten mit einer Aufschlammung von 31 g Kieselgel PF<sub>254</sub> (*Merck*) in 80 ml einer 5-10proz. wässrigen Silbernitratlösung bereitet. Die Platten wurden unter Lichtausschluss bei 110° aktiviert.

**1. Synthesen isotope markierter Verbindungen.** - 1.1. 7-<sup>14</sup>C]-Farnesol (7-<sup>14</sup>C]-**1**). - 1.1.1. 4-Methyl-3-penten-1-bromid (**4**) erhielt man nach [4] durch Einwirkung von 48proz. Bromwasserstoffsäure auf das aus Cyclopropan-carbonsäureäthylester und Methylmagnesiumjodid hergestellte 2-Cyclopropyl-2-propional (**3**). Sdp.: 81-83°/82 Torr. - NMR. (100 MHz; CCl<sub>4</sub>): 5,08 (*t* mit Feinaufspaltung; *J*=7,5 Hz; H-C(3)); 3,24 (*t*; *J*=7,5 Hz; 2H-C(1)); 2,48 (*qa*; *J*=7,0 Hz; 2H-C(2)); 1,68 (*s*; 3H-C(5)); 1,60 (*s*; 3H-C(4')).

1.1.2. 7-<sup>14</sup>C]-Farnesol (7-<sup>14</sup>C]-**1**). 48,5 mg (5,0 mCi) <sup>14</sup>C-Bariumcarbonat (spezifische Aktivität: 20,0 mCi/mmol)<sup>9)</sup> wurden mit 160 mg Bariumcarbonat in einem Rundkölbchen vermischt (Gesamtmenge: 1,06 mmol Bariumcarbonat) und mit 5 g Glasperlen (2 mm Ø) überschichtet. Nach dem Evakuieren auf 0,001 Torr liess man 20 ml entgaste konz. Schwefelsäure zufließen. Das entweichende <sup>14</sup>C-Kohlendioxid kondensierte über eine zwischengeschaltete, aussen mit Trockeneis gekühlte Falle in das mit einem aus 307 mg (1,88 mmol) 4-Methyl-3-pentenbromid (**5**) und 57,2 mg (2,38 mmol) Magnesiumspänen in 10 ml Äther bereiteten *Grignard*-Reagens beschickte und auf -192° gekühlte Reaktionsgefäss. Nach 30 Min. entfernte man die Kühlung, belüftete mit trockenem Stickstoff und rührte 30 Min. bei 20°. Dann zersetzte man mit 25 ml gesättigter wässriger Ammoniumchlorid-Lösung, säuerte mit 2 ml konz. Salzsäure an und arbeitete wie in [5] beschrieben auf. Die 1-<sup>14</sup>C]-5-Methyl-4-hexensäure (**5**)<sup>10)</sup> (Ausbeute: 4,13 mCi; 83%) wurde nach dem Destillieren bei 100-110°/11 Torr in 10 ml Äther gelöst und bei 0° mit 2 ml einer 2*M* Lösung von Methylithium in Äther (*Fluka*) versetzt. Nach 2 Std. Rühren bei 20° pipettierte man die leicht trübe Mischung auf eine kräftig gerührte Mischung aus 20 g Eis und 20 ml 1*N* HCl, extrahierte die wässrige Phase erschöpfend mit Äther und arbeitete wie üblich auf [1]. Die weiteren Umsetzungen des 2-<sup>14</sup>C]-Methylheptenons (2-<sup>14</sup>C]-**6**) (Ausbeute: 3,33 mCi; 81%) wurden wie in [1] beschrieben durchgeführt: Umsetzung mit Vinylmagnesiumbromid in Tetrahydrofuran lieferte 3-<sup>14</sup>C]-Linalool (3-<sup>14</sup>C]-**7**), das nach Filtration über 5 g Kieselgel (Eluierung mit Pentan/Äther 9:1) mit 2-Methoxypropen in 6-<sup>14</sup>C]-Geranylaceton (6-<sup>14</sup>C]-**8**) umgewandelt wurde. Der hieraus mit (Diäthoxyphosphono)essigsäuremethylester erhaltene 7-<sup>14</sup>C]-Farnesylsäuremethylester (7-<sup>14</sup>C]-**9**) wurde durch präp. DC. mit Pentan/Äther 8:2 und Destillation bei 120°/0,01 Torr gereinigt. Ausbeute: 108,3 mg (41%). Die Reduktion des 7-<sup>14</sup>C]-**9** zu 7-<sup>14</sup>C]-Farnesol (7-<sup>14</sup>C]-**1**) erfolgte mit Diisobutylaluminiumhydrid in Äther. Radiochemische Ausbeute an bei 115-120°/0,01 Torr destilliertem 7-<sup>14</sup>C]-**1**: 2,18 mCi (44%). - GC.: (*E,E*): 40%, (2*E*,6*Z*): 34%, (2*Z*,6*E*): 11%, (*Z,Z*): 10%, sowie 5% nicht identifizierter Beimengungen. Radiodünnschicht-Scanning zeigte ca. 2% radioaktiver Begleitstoffe in der Startzone des DC.

<sup>9)</sup> Angabe der Herstellerfirma «The Radiochemical Centre», Amersham, Buckinghamshire, England.

<sup>10)</sup> NMR.-Spektrum einer analog hergestellten Vergleichsprobe von 5-Methyl-4-hexensäure (**5**) (100 MHz; CCl<sub>4</sub>): 12,20 (*s*; HOOC-); 5,08 (*m*; H-C(4)); 2,29 (*d*; *J*=1,5 Hz; 2H-C(2) und 2H-C(3)); 1,67 (*s*; 3H-C(6)); 1,61 (*s*; 3H-C(5')).

1.1.3. *Herstellung der Injektionspräparate 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-7-[<sup>14</sup>C]-1).* - 1.1.3.1. Für die Experimente 3.1 und 3.2 wurden 11 mg des 7-[<sup>14</sup>C]-1 nach dem Mischen mit etwa 1 mg des in [1] beschriebenen 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-Farnesols (11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-1) (Stereoisomeren-Gemisch; spezifische Aktivität: 400 mCi/mmol) der präp. DC. unterworfen und anschliessend bei 120°/0,01 Torr destilliert. Man bestimmte: <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C = 3,30 ± 0,20.

1.1.3.2. 15 mg des 7-[<sup>14</sup>C]-1 wurden für das Experiment 3.3 mit etwa 1 mg 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-1 wie unter 1.1.3.1 beschrieben vermischt. Man bestimmte: <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C = 5,16 ± 0,30.

1.2. *5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (5,6-[<sup>14</sup>C]-1).* - 1.2.1. *1,2-[<sup>14</sup>C]-1,2-Dehydrolinalool (10).* 2,00 g Barium-Späne wurden mit 198 mg <sup>14</sup>C-Bariumcarbonat (1,0 mmol, spezifische Aktivität: 55,2 mCi/mmol<sup>9</sup>) in einem Pyrex-Zentrifugenglas vermischt und mit 1,00 g Barium-Spänen überschichtet. Unter Argon erhitzte man mit dem Bunsenbrenner bis zur Bildung einer schwarzen Carbid-Schmelze. Das nach dem Abkühlen mit dem Zentrifugenglas im Mörser zerkleinerte Reaktionsgut wurde in einem auf -80° gekühlten 500 ml Rundkolben, in dem sich 10 g Eis befanden, eingebracht. Nach dem Evakuieren des Kolbens auf 0,01 Torr entfernte man die Kühlung und kondensierte das freigesetzte <sup>14</sup>C-Acetylen in eine Gaspipette. Zur Trocknung transferierte man nochmals bei -80°/0,01 Torr Endvacuum in eine zweite, auf -192° gekühlte Gaspipette. Schliesslich wurde das radioaktive Acetylen in einen Mikroautoklaven [6] einkondensiert, in dem man zuvor aus 41,7 mg (6,01 mg-Atom) Lithium und 1,8 ml Ammoniak eine ammoniakalische Lösung von Lithiumamid bereitet hatte. Zur Verdünnung auf eine spezifische Aktivität von etwa 10 mCi/mmol brachte man mit Hilfe manometrischer Dosierung 107,4 mg (4,12 mmol) inaktives, mit konz. Schwefelsäure gereinigtes Acetylen in den Autoklaven ein. Restgase wurden bei -192°/0,01 Torr abgepumpt, der Autoklav auf einen Drehmotor gespannt und 3 Std. bei 22° gedreht. Anschliessend pipettierte man bei -192° unter strömendem Stickstoff 733 mg (5,81 mmol) frisch destilliertes 6-Methyl-5-hepten-2-on (6) in 1 ml Äther in den Autoklaven ein und liess weitere 18 Std. bei 22° reagieren. Danach wurde der Autoklaveneinhalt mit 2 ml 20proz. Salzsäure zersetzt, mit Äther und Wasser in einen Scheidetrichter übergeführt und die Ätherphase mit Wasser neutral gewaschen. Die Reinigung erfolgte durch Chromatographie an Aluminiumoxid (*Woelm*, neutral, Aktivitätsstufe II), wobei zunächst das nicht umgesetzte Methylheptenon 6 mit Pentan/Äther 98:2 und anschliessend der radioaktive Propargylalkohol 10 mit Äther eluiert wurden. Destillation im Kragenkölbchen lieferte 408 mg (2,68 mmol, 58% bezogen auf Acetylen) 1,2-[<sup>14</sup>C]-1,2-Dehydrolinalool (10).

1.2.2. *5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesylessäuremethylester (5,6-[<sup>14</sup>C]-9).* 408 mg (2,68 mmol) 1,2-[<sup>14</sup>C]-1,2-Dehydrolinalool (10) wurden in Gegenwart von 20,4 mg *Lindlar*-Katalysator und 2,04 mg Äthyldisulfid ohne Lösungsmittel bei RT. hydriert. Man filtrierte die Mischung über eine mit Filtrox gefüllte Glasfritte, wusch mit Äther nach und erhielt nach dem Abdampfen des Äthers 398 mg (96,3%) 1,2-[<sup>14</sup>C]-Linalool (1,2-[<sup>14</sup>C]-7), das gemäss GC. 98% 1,2-[<sup>14</sup>C]-7 enthielt. Die spezifische Aktivität bestimmte man zu 10,47 mCi/mmol. Die weiteren Umsetzungen erfolgten wie unter 1.1.2 und in [1] beschrieben. Über das 4,5-[<sup>14</sup>C]-Geranylaceton (4,5-[<sup>14</sup>C]-8) erhielt man 489 mg (1,95 mmol, 42,2% bezogen auf Acetylen) 5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesylessäuremethylester (5,6-[<sup>14</sup>C]-9) mit einer spezifischen Aktivität von 10,47 mCi/mmol. Mittels Radiodünnschicht-Scanning und GC. waren keine Verunreinigungen festzustellen. Die Stereoisomerenzusammensetzung war: (*E,E*): 44,8%, (*2E,6Z*): 34,5%, (*2Z,6E*): 12,4%, (*Z,Z*): 8,3%. 98,0 mg des Stereoisomerenmischungs von 5,6-[<sup>14</sup>C]-9 wurden durch präp. DC. mit Pentan/Äther 9:1 in zwei Fraktionen aufgetrennt, von denen die schneller laufende (*Rf* 0,43) das (*2Z,6E*)- und (*Z,Z*)-5,6-[<sup>14</sup>C]-9 enthielt. Aus der langsamer laufenden Fraktion (*Rf* 0,39) erhielt man (*E,E*)- und (*2E,6Z*)-5,6-[<sup>14</sup>C]-9. Die (*E,E*)/(*2E,6Z*)-Mischung liess sich durch präp. DC. an mit Silbernitrat imprägnierten Platten in Pentan/Äther 8,5:1,5 in die radioaktive (*E,E*)- (*Rf* 0,30) und die (*2E,6Z*)-Verbindung (*Rf* 0,35) 5,6-[<sup>14</sup>C]-9 auftrennen. Man erhielt 20,5 mg 5,6-[<sup>14</sup>C]-10, das gemäss GC. zu 91,5% aus dem (*E,E*)-Isomeren bestand.

1.2.3. *Herstellung der Injektionspräparate 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-1).* - 1.2.3.1. Eine Mischung von 11,6 mg des in 1.2.2 beschriebenen 5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesylessäuremethylesters (5,6-[<sup>14</sup>C]-9) [spezifische Aktivität: 10,47 mCi/mmol; Stereoisomerenzusammensetzung: (*E,E*): 44,8%, (*2E,6Z*): 34,5%, (*2Z,6E*): 12,4%, (*Z,Z*): 8,3%] und von 9,2 mg (*E,E*)-11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-9 [spezifische Aktivität: 32,0 mCi/mmol]<sup>11)</sup> wurde mit DIBAH in Äther zu 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-5,6-[<sup>14</sup>C]-Farnesol (11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-5,6-

<sup>11)</sup> Die spezifische Aktivität von 32,0 mCi/mmol hatte man durch Verdünnen von hochaktivem 7',8-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-Linalool (7',8-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-7) (400 mCi/mmol) aus der in [1] beschriebenen Synthese mit inaktivem Linalool erreicht und aus diesem Präparat den Ester 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-9 gemäss *Schema 2* synthetisiert [1]. Die Stereoisomeren von 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-9 waren wie in 1.1.2 beschrieben mittels präp. DC. aufgetrennt worden, wobei ein 11',12-<sup>β</sup>[<sup>3</sup>H]-9 mit 90% (*E,E*)-Isomerenanteil resultierte.

[ $^{14}\text{C}$ ]-1) reduziert. Ausbeute: 17,1 mg (93%). Mittels DC., GC. und Radiodünnschicht-Scanning waren keine Begleitstoffe nachzuweisen. Man berechnete:  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 2,43$ ; gefunden:  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 2,45 \pm 0,15$ .

1.2.3.2. Eine Mischung von 9,15 mg 5,6-[ $^{14}\text{C}$ ]-9 [spezifische Aktivität: 10,47 mCi/mmol; 91,5% (*E,E*)-9 vgl. 1.2.2] und 4,29 mg (*E,E*)-11',12-[ $^3\text{H}$ ]-9 [spezifische Aktivität: 77,6 mCi/mmol]<sup>12</sup> wurde wie üblich mit DIBAH reduziert. Ausbeute an *E,E*-11',12-[ $^3\text{H}$ ]-5,6-[ $^{14}\text{C}$ ]-Farnesyssäuremethylester: 10,79 mg (90,5%). Mittels DC., GC. und Radiodünnschicht-Scanning waren keine radiochemischen Verunreinigungen festzustellen. Man berechnete:  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 3,47$ ; gefunden:  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 3,99 \pm 0,3$  mittels Überführung von (*E,E*)-11',12-[ $^3\text{H}$ ]-5,6-[ $^{14}\text{C}$ ]-1 in sein 3,5-Dinitrobenzoesäurederivat und Umkristallisation bis zur Radiokonstanz.

**3. Einbauversuche.** - Die Methodik der Vorläuferapplikation und der Isolierung des Cantharidins sowie der Abbaureaktionen von Cantharidin wurde bereits in [1] beschrieben.

*Experiment 3.1.* 5,71 mg (371  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ ; 112,5  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ ) 11',12-[ $^3\text{H}$ ]-7-[ $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (Stereoisomerenmischung) (siehe 1.1.3.1) wurden 6  $\delta$  *Lytta vesicatoria* L. (*Meloidae, Coleoptera*) injiziert. Die Insekten stammten aus einer Labor-Zucht<sup>13</sup>). Nach 14 Std. war ein Käfer tot. Nach 22 Std. wurden die restlichen eingefloren und alle zusammen mit 47,0 mg inaktivem Cantharidin aufgearbeitet.

*Experiment 3.2.* 2,17 mg (141  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ ; 42,8  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ ) 11',12-[ $^3\text{H}$ ]-7-[ $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (Stereoisomerenmischung) aus 1.1.3.1 wurden 5  $\delta$  *Lytta vesicatoria* L. injiziert, die aus einer Labor-Zucht<sup>13</sup>) stammten. Alle Käfer befanden sich am Ende der Versuchsdauer von 21,5 Std. in gutem Zustand. Sie wurden mit 59,6 mg inaktivem Cantharidin aufgearbeitet.

*Experiment 3.3.* 2,64 mg (272  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ ; 52,8  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ ) 11',12-[ $^3\text{H}$ ]-7-[ $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (Stereoisomerenmischung), siehe 1.1.3.2, wurden 5  $\delta$  *Lytta vesicatoria* L. injiziert, die aus einer Labor-Zucht<sup>13</sup>) stammten. Alle Käfer befanden sich bei Ende der Versuchsdauer von 22 Std. in gutem Zustand. Sie wurden mit 53,3 mg inaktivem Cantharidin aufgearbeitet.

*Experiment 3.4.1.-3.4.4.* 4,34 mg (246  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ ; 102  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ ) 11',12-[ $^3\text{H}$ ]-5,6-[ $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (11',12-[ $^3\text{H}$ ]-1: 90% (*E,E*)-1; 5,6-[ $^{14}\text{C}$ ]-1: Stereoisomerenmischung), siehe 1.2.3.1, wurden 24  $\delta$  *Lytta vesicatoria* L. injiziert, die in der Provinz Palermo, Sizilien, gesammelt worden waren. Nach einer Versuchsdauer von 24 Std. waren zwei Käfer tot. Die Tiere wurden in Gruppen von 6 Exemplaren mit jeweils 90,0 mg inaktivem Cantharidin aufgearbeitet.

*Experimente 3.5.1. und 3.5.2.* 2,33 mg (231  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ ; 66  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ ) (*E,E*)-11',12-[ $^3\text{H}$ ]-5,6-[ $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol, siehe 1.2.3.2, wurden 12  $\delta$  *Mylabris variabilis* Pall. (*Meloidae, Coleoptera*) injiziert, die im Kanton Wallis gesammelt worden waren. Nach 26 Std. waren zwei Käfer tot; die übrigen Tiere wurden in zwei Gruppen von je 5 Exemplaren mit jeweils 90,0 mg inaktivem Cantharidin aufgearbeitet.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. G. Peter, W.-D. Woggon, Ch. Schlatter & H. Schmid, *Helv.* 60, 844 (1977).
- [2] Ch. Schlatter, E. E. Waldner & H. Schmid, *Experientia* 24, 994 (1968).
- [3] Ch. Schlatter & A. Dürsteler-Meier, *Chimia* 24, 33 (1970).
- [4] M. Julia, S. Julia & R. Guégan, *Bull. Soc. chim. France* 1960, 1072.
- [5] E. Leete & J. N. Wemple, *J. Amer. chem. Soc.* 91, 2698 (1969).
- [6] J. Würsch, *Atompraxis* 7, 463 (1961).
- [7] W.-D. Woggon, *Dissertation Universität Zürich*, 1975.
- [8] W.-D. Woggon, M. G. Peter & H. Schmid, in Vorbereitung.
- [9] M. G. Peter, G. Snatzke, F. Snatzke, K. N. Nagarajan & H. Schmid, *Helv.* 57, 32 (1974).
- [10] J. R. Sierra, W.-D. Woggon & H. Schmid, in Vorbereitung.
- [11] J. R. Sierra, M. G. Peter, W.-D. Woggon & H. Schmid, in Vorbereitung.
- [12] W. Seubert & E. Fass, *Biochem. Z.* 341, 23 (1964); *idem*, *ibid.* 341, 35 (1964).
- [13] D. Meyer, Ch. Schlatter, I. Schlatter-Lanz, H. Schmid & P. Bovey, *Experientia* 24, 995 (1968).

<sup>12</sup>) Die spezifische Aktivität von 77,6 mCi/mmol hatte man durch Verdünnen von hochaktivem 6',7-[ $^3\text{H}$ ]-6-Methyl-5-hepten-2-on (6',7-[ $^3\text{H}$ ]-6) (429 mCi/mmol) aus der in [1] beschriebenen Synthese mit inaktivem 6 erreicht und aus diesem Präparat den Ester 11',12-[ $^3\text{H}$ ]-9 gemäss *Schema 2* synthetisiert; die Stereoisomeren waren wie in 1.1.2 beschrieben aufgetrennt worden, es resultierte 11',12-[ $^3\text{H}$ ]-9 mit 89% (*E,E*)-9.

<sup>13</sup>) Vgl. Fussnote 3 und [13].