

228. Experimente zum kompetitiven Einbau der Stereoisomeren des Farnesols in Cantharidin

6. Mitteilung zur Biosynthese des Cantharidins¹⁾

von Wolf-Dietrich Woggon²⁾, Martin G. Peter³⁾ and Hans Schmid†

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

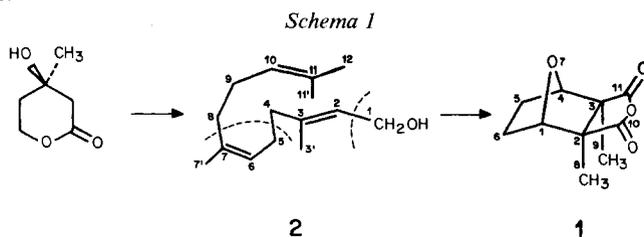
(17. VIII. 77)

Experiments on the competitive incorporation of farnesol-stereoisomers into cantharidin

Summary

Farnesol (**2**) has been demonstrated to be an efficient precursor for cantharidin (**1**), into which it is transformed by elimination of C(1), C(5), C(6), C(7) and C(7') [1]. The following incorporation experiments with doubly labelled (³H and ¹⁴C) stereoisomers of farnesol present strong evidence that (*E,E*)-farnesol ((*E,E*)-**2**) in fact is the precursor for cantharidin, whereas (*2E,6Z*)-**2** and (*Z,Z*)-**2** are not utilized for the biosynthesis of cantharidin. A possible mechanism for the incorporation of (*2Z,6E*)-farnesol ((*2Z,6E*)-**2**) to an extent of 56,8% relative to (*E,E*)-**2** is discussed.

1. Einleitung. – Frühere Untersuchungen zur Biosynthese des Cantharidins (**1**), dem toxischen Inhaltsstoff von Käfern der Familie *Meloidae* (*Coleoptera*) hatten nach Einbauversuchen mit radioaktiv markiertem Acetat, Mevalonat [2] und Farnesol (**2**) [1] [3] zur Formulierung des in *Schema 1* dargestellten Modells für die Biosynthese von **1** geführt.



Experimente mit Stereoisomerenmischungen mehrfach ¹⁴C-markierter Farnesole hatten ferner den Hinweis ergeben, dass die Stereoisomeren des Farnesols mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten von *Lytta vesicatoria* L. (*Meloidae*) in Cantharidin

¹⁾ 5. Mitt.: siehe [1].

²⁾ Teil der Dissertation *W.-D. W.*, Universität Zürich, 1975.

³⁾ Neue Adresse: Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Max-Planck-Strasse 1, D-5300 Bonn.

umgewandelt werden [4]. Zum Zweck einer genaueren Untersuchung wurden die an C(2) ¹⁴C-markierten Verbindungen (*E,E*)-**2**, (*2E,6Z*)-**2**, (*2Z,6E*)-**2**, (*Z,Z*)-**2** und (*E,E*)-4-¹⁴C-**2** in Mischungen mit (*E,E*)-11', 12-³H-**2** oder mit (*2E,6Z*)-11', 12-³H-**2** den Insekten injiziert (siehe *Tabelle 2*). Die relativen Einbauraten der verschiedenen stereoisomeren Farnesole lassen sich mit Hilfe der Quotienten ³H/¹⁴C (im Cantharidin): ³H/¹⁴C (im Farnesol) ermitteln.

2. Herstellung und Applikation der radioaktiven Injektionspräparate. – Die zur Herstellung der Injektionspräparate zur Verfügung stehenden radioaktiven Verbindungen sind in der *Tabelle 1* angegeben.

Tabelle 1. Radioaktive Verbindungen zur Herstellung der Injektionspräparate

	Spezifische Aktivität (mCi/mmol)		Spezifische Aktivität (mCi/mmol)
<i>(E,E)</i> -11', 12- ³ H- 3	{ 32,0 77,6	<i>(2E,6Z)</i> -2- ¹⁴ C- 3	5,2
		<i>(2Z,6E)</i> -2- ¹⁴ C- 3	5,2
<i>(2E,6Z)</i> -11', 12- ³ H- 3	32,0	<i>(Z,Z)</i> -2- ¹⁴ C- 3	5,2
<i>(E,E)</i> -2- ¹⁴ C- 3	5,2	<i>(E,E)</i> -4- ¹⁴ C- 2	1,9

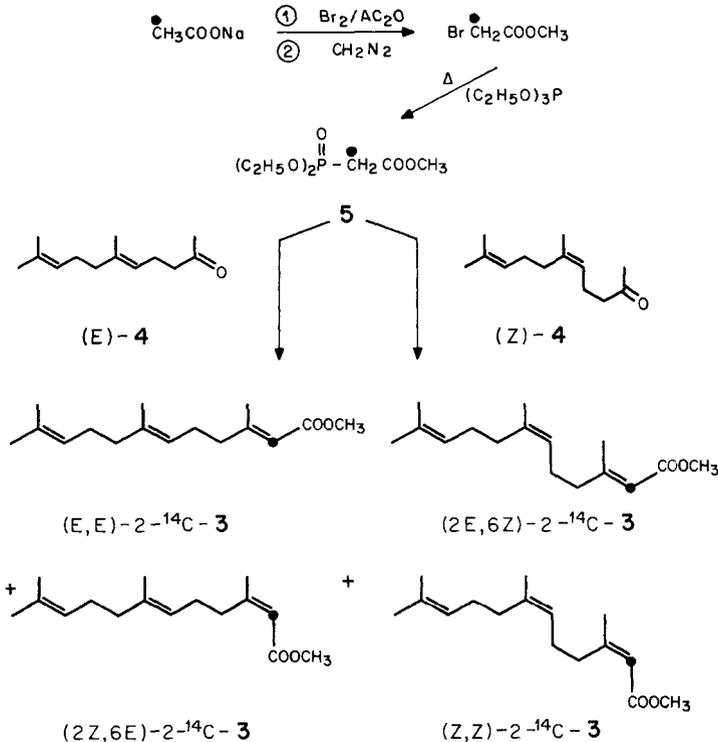
Zur Synthese von 11', 12-³H-Farnesylessigsäuremethylester (11', 12-³H-**3**) vgl. [1] [4] [6], zur Synthese von (*E,E*)-4-¹⁴C-Farnesol ((*E,E*)-4-¹⁴C-**2**) vgl. [5]. Die reinen stereoisomeren Ester 2-¹⁴C-**3** wurden gemäss [6] ausgehend von (*E*)- bzw. (*Z*)-Geranylaceton **4** und 2-¹⁴C-(Diäthoxyphosphono)-essigsäuremethylester (**5**) hergestellt. Das Phosphonat **5** wurde entsprechend [6] aus 2-¹⁴C-Bromessigsäuremethylester erhalten, der aus 2-¹⁴C-Acetat analog zu [7] hergestellt wurde (siehe *Schema 2*).

Die aus den Synthesen (siehe *Schema 2*) erhaltenen Stereoisomerenmischungen, bestehend aus (*E,E*)-2-¹⁴C-**3** und (*2Z,6E*)-2-¹⁴C-**3** bzw. (*2E,6Z*)-2-¹⁴C-**3** und (*Z,Z*)-2-¹⁴C-**3**, wurden gemäss [1] mittels präp. DC. in die ≥89% reinen Stereoisomeren aufgetrennt, mit (*E,E*)-11', 12-³H-**3** gemischt und anschliessend nach [1] mit DIBAH zu den korrespondierenden doppelmarkierten Farnesolen reduziert (vgl. *Tabelle 2*). Nach Bestimmung der ³H/¹⁴C-Verhältnisse injizierte man die doppelmarkierten Farnesole entweder männlichen adulten *Lytta vesicatoria* L., die in Sizilien gesammelt worden waren oder männlichen adulten *Mylabris variabilis* PALL. (*Meloidae*), die aus dem Wallis (Schweiz) stammten. Nach einer Versuchsdauer von 18–58 Std. wurden die Insekten getötet, das radioaktive Cantharidin extrahiert und bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt (vgl. [6]). Die Resultate der Einbauversuche sind in *Tabelle 2* zusammengefasst.

3. Diskussion. – Wie aus den in *Tabelle 2* dargestellten Resultaten ersichtlich ist (siehe Experiment 2.1, 2.5 und 2.6), beobachtete man nach Injektion von (*E,E*)-11', 12-³H-**2** in einer Mischung mit (*E,E*)-2-¹⁴C-**2** bzw. (*E,E*)-4-¹⁴C-**2** eine ³H-Retention von 53,6±6,8% bei der Bildung des Cantharidins⁴). Der Mittelwert der «normierten Quotienten» dieser Experimente beträgt 1,07±0,13, d.h. liegt innerhalb der Fehlergrenze bei 1, was bedeutet, dass die C-Atome 2,4,11' und 12 des Farnesols mit

⁴) Aus diesem Grunde ist zur Beurteilung der wahren Einbauraten von C(11') und C(12) der Quotient ³H/¹⁴C (im Cantharidin):³H/¹⁴C (im Farnesol) mit einem statistischen Faktor von 2 zu multiplizieren (siehe *Tabelle 2* und [1]).

Schema 2



gleichen Raten in Cantharidin eingebaut werden. Dieses Resultat kann als Hinweis dafür angesehen werden, dass die Verknüpfung der Molekelfragmente C(2)–C(4) und C(8)–C(12) des Farnesols im enzymgebundenen Zustand intramolekular erfolgt⁵⁾.

Im Gegensatz zu diesen Experimenten, bei denen sowohl die ¹⁴C- als auch die ³H-Markierung in Form des (*E,E*)-Farnesols ((*E,E*)-2) appliziert wurde, traten nach Injektion von (*E,E*)-11',12-³H-2 in Mischungen mit den anderen 2-¹⁴C-markierten Farnesolisomeren wesentlich grössere «normierte Quotienten» auf (siehe *Tabelle 2*, Experimente 2.2, 2.3 und 2.4). Bei einer angenommenen normierten Einbaurrate von 100% für (*E,E*)-11',12-³H-2 lässt sich berechnen, dass (2*Z*,6*E*)-2-¹⁴C-2 mit 56,8%, (2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-2 mit 4,5% und (2*Z*,6*Z*)-2-¹⁴C-2 mit 3,5% in Cantharidin eingebaut wurde. Die Resultate von Experiment 2.7 zeigen einen bevorzugten Einbau von (*E,E*)-4-¹⁴C-Farnesol ((*E,E*)-4-¹⁴C-2) gegenüber (2*E*,6*Z*)-11',12-³H-2 und zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Experimente 2.2. Bildet man die reziproken Werte für das Verhältnis ³H/¹⁴C (im Cantharidin): ³H/¹⁴C (im Farnesol) und berechnet die «normierten Quotienten», so erhält man als Mittelwert 18,9±0,2, d.h. im Experiment 2.7 eine normierte Einbaurrate von 5,3% des (2*Z*,6*E*)-Farnesols relativ zu (*E,E*)-Farnesol (100%). Die voranstehend beschriebenen Experimente las-

⁵⁾ Diese Annahme wird durch Einbauversuche mit (*E,E*)-11'-³H-2,11'-¹⁴C-Farnesol ((*E,E*)-11'-³H-2,11'-¹⁴C-2) bestätigt [8].

Tabelle 2. Einbauversuche mit (^3H und ^{14}C)-doppelmarkierten Farnesol-Stereoisomeren

Vorläufer	Ex-periment	Farnesol $^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Anzahl der Insekten	Cantharidin		$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (im Cantharidin)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (im Farnesol)	Normier-ter Quo-tient ^{c)}
				dpm/mg ^3H	^{14}C				
(E,E) -11',12- ^3H - 2- ^{14}C -2	2.1.1	3,90 ± 0,03	3 ^{a)}	5434	2610	2,08 ± 0,19	0,533	1,07	
	2.1.2	9,53 ± 0,62	3 ^{b)}	13417	3166	4,24 ± 0,05	0,445	0,889	
	2.1.3	9,53 ± 0,62	2 ^{b)}	2188	513	4,27 ± 0,36	0,448	0,896	
(E,E) -11',12- ^3H - (2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-2- ^{14}C -2	2.2.1	5,07 ± 0,59	5 ^{a)}	11584	139	83,3 ± 7,8	16,4	32,9	
	2.2.2	11,33 ± 0,89	2 ^{b)}	2331	24,4	95,5 ± 5,7	8,43	16,9	
(E,E) -11',12- ^3H - (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-2- ^{14}C -2	2.3.1	6,20 ± 0,04	2 ^{b)}	12528	2161	5,80 ± 0,23	0,935	1,87	
	2.3.2	6,20 ± 0,04	3 ^{b)}	730	153	4,77 ± 0,01	0,769	1,54	
	2.3.3	6,20 ± 0,04	2 ^{b)}	6832	1230	5,55 ± 0,19	0,895	1,79	
	2.3.4	6,20 ± 0,04	3 ^{b)}	1677	293	5,72 ± 0,22	0,922	1,84	
(E,E) -11',12- ^3H - (<i>Z,Z</i>)-2- ^{14}C -2	2.4.1	6,80 ± 0,20	5 ^{b)}	2528	34,7	72,9 ± 0,4	10,7	21,4	
	2.4.2	6,80 ± 0,20	5 ^{b)}	6087	43,3	141 ± 4	20,7	41,5	
(E,E) -11',12- ^3H - 4- ^{14}C -2	2.5.1	9,70 ± 0,10	4 ^{a)}	1010	165	6,12 ± 0,20	0,631	1,26	
	2.5.2	9,70 ± 0,10	4 ^{a)}	34322	5720	6,00 ± 0,30	0,618	1,24	
(E,E) -11',12- ^3H - 2,4- ^{14}C -2	2.6.1	3,13 ± 0,15	3 ^{a)}	613	358	1,71 ± 0,02	0,546	1,09	
	2.6.2	3,13 ± 0,15	4 ^{a)}	10525	6939	1,52 ± 0,06	0,486	0,972	
$(2E,6Z)$ -11',12- ^3H - (<i>E,E</i>)-4- ^{14}C -2	2.7.1	23,7 ± 0,3	3 ^{a)}	7304	2949	2,48 ± 0,13	0,105	0,210	
	2.7.2	23,7 ± 0,3	4 ^{a)}	7181	2851	2,52 ± 0,10	0,106	0,212	
	2.7.3	23,7 ± 0,3	8 ^{a)}	11900	4715	2,54 ± 0,10	0,107	0,214	

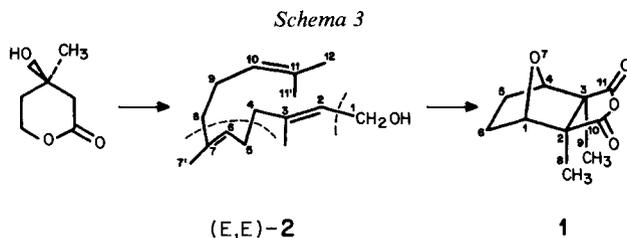
^{a)} *Lytta vesicatoria* L.

^{b)} *Mylabris variabilis* PALL.

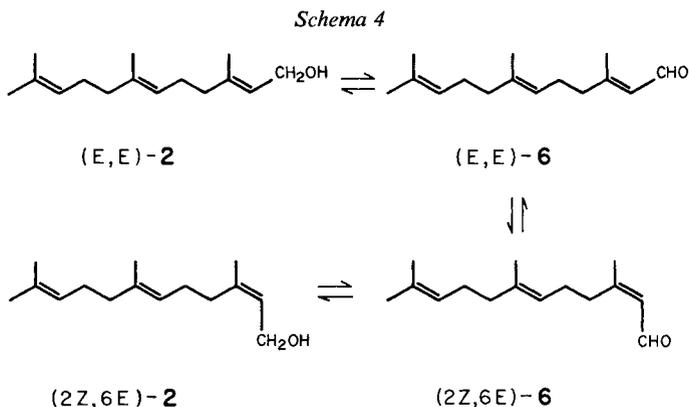
^{c)} Normierter Quotient = $\times 2 \frac{^3\text{H}/^{14}\text{C} \text{ (im Cantharidin)}}{^3\text{H}/^{14}\text{C} \text{ (im Farnesol)}}$, vgl. [1].

sen sich folgendermassen interpretieren. Die Isomeren (2*E*,6*Z*)-2 und (*Z,Z*)-2 sind offenbar keine Vorläufer für Cantharidin. Ihre normierten Einbauraten (3,5–5,3%) relativ zu (*E,E*)-2 (100%) liegen in der gleichen Grössenordnung wie die der C-Atome 5, 6 und 7 des Farnesols (vgl. [1]), die bei der Bildung des Cantharidins eliminiert werden und für die eine geringfügige Beteiligung an der Cantharidin-Biosynthese via ^{14}C -Acetat diskutiert worden war [1]. Dagegen werden (*E,E*)- und (2*Z*,6*E*)-Farnesol gut eingebaut, wobei das letztere um den Faktor 1,8 langsamer als (*E,E*)-2 in Cantharidin umgewandelt wird. Demnach muss das in *Schema 1* dargestellte Modell der Biosynthese des Cantharidins gemäss *Schema 3* modifiziert werden.

Für den Einbau von (2*Z*,6*E*)-2 können zwei Ursachen verantwortlich sein: entweder eine mangelnde Substratspezifität der in der Cantharidin-Biosynthese wirk-samen Enzyme bezüglich der Konfiguration der C(2)-Doppelbindung des Farnesols oder eine Isomerisierung von (2*Z*,6*E*)-2 via (2*Z*,6*E*)-Farnesal ((2*Z*,6*E*)-6) zu (*E,E*)-6 bzw. (*E,E*)-2. Derartige reversible Isomerisierungen können über die im *Schema 4* dargestellten Gleichgewichtsreaktionen ablaufen, wie sie von *Jommi* [9] mit Leber-



alkoholdehydrogenase, Overton [10] mit Enzymfraktionen von *Androgyryphus paniculata* und von *Ursprung* [11] mit Octanoldehydrogenase aus Mutanten von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen wurden.



Experimente zum Nachweis einer Isomerisierung bei der Umwandlung von (2Z,6E)-Farnesol in Cantharidin werden zur Zeit in unserem Laboratorium ausgeführt [12].

Die vorliegende Arbeit wurde in dankenswerter Weise vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* unterstützt. Ferner danken wir Herrn Dr. J. Würsch (*Hoffmann-La-Roche & Co. AG, Basel*) für die grosszügige Unterstützung bei der Darstellung von 2-¹⁴C-Bromessigsäure-methylester und Herrn H. Frohofer (mikroanalytische Abteilung der Universität Zürich) für Radioaktivitätsmessungen.

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Vgl. [1] [6]. 1. Zur Synthese von 2-¹⁴C-Farnesylsäuremethylester (2-¹⁴C-3). 1.1. 2-¹⁴C-Bromessigsäure. 298,3 mg (4,97 mmol, 25 mCi, 5,03 mCi/mmol) 2-¹⁴C-Essigsäure wurden gemäss [7] mit 290 μ l Brom in 12,5 μ l Acetanhydrid bei 110° während 1 Std. zu 598,0 mg (4,30 mmol, 21,2 mCi, 86,6%) 2-¹⁴C-Bromessigsäure umgesetzt.

1.2. (E,E)-2-¹⁴C- und (2Z,6E)-2-¹⁴C-Farnesylsäuremethylester (2-¹⁴C-3). 302,8 mg (2,18 mmol, 10,9 mCi) der unter 1.1 beschriebenen 2-¹⁴C-Bromessigsäure wurde nach Veresterung mit Diazomethan in abs. Äther nach [6] zum 2-¹⁴C-(Diäthoxyphosphono)essigsäure-methylester umgesetzt und anschliessend mit 600,4 mg (3,09 mmol) (E)-Geranylaceton ((E)-4) (gemäss GC. \geq 98% (E)-4) in Gegenwart von Natriummethylat in den 2-¹⁴C-Farnesylsäuremethylester (2-¹⁴C-3) umgewandelt. Man erhielt 380,0 mg (1,52 mmol, 69,7%) 2-¹⁴C-3 als Stereoisomergemisch. Auftrennung der Stereoisomeren mittels präp. DC. gemäss [6] ergab 66,5 mg (0,266 mmol, 5,20 mCi/mmol) (2Z,6E)-

2-¹⁴C-3, das laut GC. folgendermassen zusammengesetzt war: 93,2% (2*Z*,6*E*)-2-¹⁴C-3, 5,3% (*E*,*E*)-2-¹⁴C-3 und 1,5% (2*Z*,2)-2-¹⁴C-3, sowie 142,0 mg (0,567 mmol, 5,20 mCi/mmol) (*E*,*E*)-2-¹⁴C-Farnesyssäuremethylester ((*E*,*E*)-2-¹⁴C-3), das bei gas-chromatographischer Prüfung 92,5% (*E*,*E*)-2-¹⁴C-3, 1% (2*Z*,6*E*)-2-¹⁴C-3, 1% (2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-3 und 5% nicht identifizierter Beimengungen enthielt. In beiden Fraktionen waren mittels Radiodünnschicht keine Begleitstoffe nachzuweisen.

1.3. (2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C- und (2*Z*,2)-2-¹⁴C-Farnesyssäuremethylester (2-¹⁴C-3). 295,2 mg (2,13 mmol, 10,7 mCi) der unter 1.1 beschriebenen 2-¹⁴C-Bromessigsäure wurden nach Veresterung mit überschüssigem Diazomethan gemäss [6] in 2-¹⁴C-(Diäthoxyphosphono)essigsäure-methylester (5) umgewandelt und anschliessend mit 448,9 mg (2,31 mmol) (*Z*)-Geranylaceton ((*Z*)-4) zum 2-¹⁴C-Farnesyssäuremethylester (2-¹⁴C-3) umgesetzt. Das anfallende Stereoisomereengemisch, 428,2 mg (1,71 mmol, 80,7%) (2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-3 und (2*Z*,2)-2-¹⁴C-3, wurde mittels präp. DC. [6] in 356,0 mg (2*E*,6*Z*)-3, laut GC. bestehend aus: 88,5% (2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-3, 4,1% (2*Z*,2)-2-¹⁴C-3, 1,3% (*E*,*E*)-2-¹⁴C-3 und 6% nicht identifizierter Beimengungen, sowie 72,2 mg (2*Z*,2)-2-¹⁴C-3 (GC. \geq 98% (2*Z*,2)-¹⁴C-3) aufgetrennt.

2. Herstellung der Injektionspräparate für die in Tabelle 2 beschriebenen Experimente 2.1–2.7. Experiment 2.1.1. 2,53 mg (0,0101 mmol, 32,0 mCi/mmol) (*E*,*E*)-11', 12-³H-Farnesyssäuremethylester ((*E*,*E*)-11', 12-³H-3, laut GC. bestehend aus: 89,0% (*E*,*E*)-11', 12-³H-3, 6,7% (2*E*,6*Z*)-11', 12-³H-3, 2,7% (2*Z*,6*E*)-11', 12-³H-3 und 1,0% (2*Z*,2)-11', 12-³H-3⁶⁾) wurden in abs. Äther mit 4,00 mg (0,0160 mmol, 5,2 mCi/mmol) (*E*,*E*)-2-¹⁴C-3 (GC. siehe 1.2) gemischt. Anschliessend wurde nach [1] mit überschüssigem DIBAH reduziert und nach üblicher Aufarbeitung [1] und Destillation bei 120°/0,01 Torr 5,39 mg (0,0242 mmol, 93,0%, ³H/¹⁴C: 3,90 \pm 0,03) (*E*,*E*)-11', 12-³H-2-¹⁴C-Farnesol ((*E*,*E*)-11', 12-³H-2-¹⁴C-2) erhalten.

Experiment 2.1.2 und 2.1.3. 7,18 mg (0,0287 mmol, 77,6 mCi/mmol)⁶⁾ (*E*,*E*)-11', 12-³H-3 (Stereoisomerenzusammensetzung ist identisch mit (*E*,*E*)-11', 12-³H-3 des Experimentes 2.1.1) wurden mit 11,24 mg (0,0449 mmol, 5,2 mCi/mmol) (*E*,*E*)-2-¹⁴C-3 gemischt und gemäss Experiment 2.1.1 zum (*E*,*E*)-11', 12-³H-2-¹⁴C-Farnesol ((*E*,*E*)-11', 12-³H-2-¹⁴C-2) reduziert, man bestimmte ³H/¹⁴C: 9,53 \pm 0,62.

Experiment 2.2.1. 3,30 mg (0,0132 mmol, 32,0 mCi/mmol) (*E*,*E*)-11', 12-³H-3 wurden mit 4,01 mg (0,0160 mmol, 5,2 mCi/mmol) (2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-3 gemischt und entsprechend 2.1.1 zum (*E*,*E*)-11', 12-³H-(2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-2⁸⁾ reduziert, ³H/¹⁴C: 5,07 \pm 0,59.

Experiment 2.2.2. 8,17 mg (0,0326 mmol, 77,6 mCi/mmol) (*E*,*E*)-11', 12-³H-3 wurden mit 10,76 mg (0,0429 mmol, 5,2 mCi/mmol) (2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-3 gemischt und nach Reduktion mit DIBAH (*E*,*E*)-11', 12-³H-(2*E*,6*Z*)-2-¹⁴C-Farnesol⁸⁾ erhalten, ³H/¹⁴C: 11,33 \pm 0,89.

Experiment 2.3.1–2.3.4. 4,88 mg (0,0195 mmol, 77,6 mCi/mmol) (*E*,*E*)-11', 12-³H-3 wurden mit 11,74 mg (0,0469 mmol, 5,2 mCi/mmol) (2*Z*,6*E*)-2-¹⁴C-3 gemischt, mit DIBAH reduziert und (*E*,*E*)-11', 12-³H-(2*Z*,6*E*)-2-¹⁴C-Farnesol⁸⁾ erhalten, ³H/¹⁴C: 6,20 \pm 0,04.

Experiment 2.4.1–2.4.2. 5,28 mg (0,0211 mmol, 77,6 mCi/mmol) (*E*,*E*)-11', 12-³H-3 wurden mit 11,59 mg (0,0463 mmol, 5,2 mCi/mmol) (2*Z*,2)-2-¹⁴C-3 gemischt und mit DIBAH zum (*E*,*E*)-11', 12-³H-(2*Z*,2)-2-¹⁴C-Farnesol⁸⁾ reduziert, ³H/¹⁴C: 6,80 \pm 0,20.

Experiment 2.5.1–2.5.2. 6,51 mg (0,0293 mmol, 32,0 mCi/mmol) (*E*,*E*)-11', 12-³H-2 wurden gemischt mit 11,19 mg (0,0503 mmol, 1,9 mCi/mmol) (*E*,*E*)-4-¹⁴C-2⁷⁾ (nach GC. \geq 98% (*E*,*E*)-4-¹⁴C-2), bei 120°/0,01 Torr destilliert und ³H/¹⁴C: 9,70 \pm 0,10 bestimmt.

Experiment 2.6.1–2.6.2. 4,71 mg (0,0212 mmol, ³H/¹⁴C: 9,70 \pm 0,10) des für die Experimente 2.5.1 und 2.5.2. verwendeten Injektionspräparates (*E*,*E*)-11', 12-³H-4-¹⁴C-2 wurden mit 2,31 mg (0,0104 mmol, 5,2 mCi/mmol) (*E*,*E*)-2-¹⁴C-2 gemischt und nach Destillation bei 120°/0,01 Torr ³H/¹⁴C: 3,13 \pm 0,15 bestimmt.

⁶⁾ Zur Synthese von (*E*,*E*)-11', 12-³H-3 vgl. [4] [6].

⁷⁾ Zur Synthese von (*E*,*E*)-4-¹⁴C-2 vgl. [5].

⁸⁾ Es handelt sich um ein Gemisch von zwei stereoisomeren Farnesolen (2), die mit verschiedenen Nucliden (³H, ¹⁴C) markiert sind. Die Angabe der Stellung der radioaktiven Markierung folgt jeweils auf die zugehörige Konfiguration des markierten Stereoisomeren.

Experiment 2.7.1–2.7.3. 16,81 mg (0,0756 mmol, 32,0 mCi/mmol) (2*E*,6*Z*)-11',12-³H-**2** wurden gemischt mit 11,80 mg (0,0532 mmol, 1,9 mCi/mmol) (*E*,*E*)-4-¹⁴C-**2**⁷), bei 120°/0,01 Torr destilliert und ³H/¹⁴C: 23,7 ± 0,3 bestimmt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. G. Peter, H.-R. Waespe, W.-D. Woggon & H. Schmid, *Helv.* 60, 1262 (1977).
 [2] Ch. Schlatter, E. E. Waldner & H. Schmid, *Experientia* 24, 994 (1968).
 [3] Ch. Schlatter & A. Dürsteler-Meier, *Chimia* 24, 33 (1970).
 [4] W.-D. Woggon, Dissertation Universität Zürich 1975.
 [5] W.-D. Woggon & H. Schmid, in Vorbereitung.
 [6] M. G. Peter, W.-D. Woggon, Ch. Schlatter & H. Schmid, *Helv.* 60, 844 (1977).
 [7] B. D. Shaw, *J. chem. Soc.* 1923, 2239.
 [8] S. A. Hauffe, W.-D. Woggon & H. Schmid, in Vorbereitung.
 [9] C. Capellini, A. Corbella, P. Gariboldi & G. Jommi, *Bioorganic Chemistry* 5, 129 (1976).
 [10] K. H. Overton & F. M. Roberts, *J. chem. Soc. Chem. Commun.* 1974, 378, 385.
 [11] K. Madhavan, M. Conscience-Egli, F. Sieber & H. Ursprung, *J. Insect. Physiol.* 19, 235 (1973).
 [12] W.-D. Woggon, in Vorbereitung.

229. A New Synthetic Route to (±)-Perhydrohistrionicotoxin¹⁾

by E. J. Corey, Martin Petrzilka and Yoichiro Ueda

Department of Chemistry, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, USA

(22. VIII. 77)

Summary

Starting from ethyl 2-cyclohexen-1-carboxylate (**3**) the total synthesis of the perhydrohistrionicotoxin intermediate **23** was achieved in 25% overall-yield. The two key steps involve a positionally specific addition of HOBr to the oxime-olefin **7** and the alkylation of bromooxime **17** with 1-lithio-1-butyne. The latter represents a novel method for stereospecific and position-specific introduction of a nucleophilic butyl equivalent in α -position to a ketonic carbonyl group.

The perhydro derivative **1** of histrionicotoxin (**2**) known to exhibit unique neurotoxic properties [2] was first synthesized in these laboratories [3] [4] and in this publication we now wish to present a new route to (±)-perhydrohistrionicotoxin (**1**) via the intermediate **23** of our original synthesis (*Scheme 1*). To build up the basic spirocyclic skeleton of the molecule ethyl 2-cyclohexen-1-carboxylate (**3**)²⁾ was

¹⁾ For a preliminary account of this work see [1].

²⁾ Reduction of benzoic acid by lithium in liquid ammonia gave the 1,4-dihydro derivative which was converted to cyclohexadien-1,3-carboxylic acid during isolation. Further reduction by liquid ammonia and esterification furnished **3**. For similar transformations see [5].