

## 269. Identifizierung von Farnesol als Zwischenstufe in der Biosynthese des Cantharidins aus Mevalonsäurelacton

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

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

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

(5.X.77)

Identification of farnesol as an intermediate in the biosynthesis of cantharidin from mevalonolactone

### Summary

Simultaneous injection of 2-[<sup>14</sup>C]-mevalonolactone (2-[<sup>14</sup>C]-**1**) and (*E,E*)-11',12-[<sup>3</sup>H]-farnesol (11',12-[<sup>3</sup>H]-**2**) into *Lytta vesicatoria* L. (*Coleoptera, Meloidae*) yields doubly labelled cantharidin (**3**). The remainder of the precursor farnesol, re-isolated from the insects after the incubation period, has incorporated <sup>14</sup>C-radioactivity. The labelling pattern in this farnesol, as determined by two independent degradative reaction sequences, is in agreement with the isoprene rule. Since specific incorporation of farnesol (**2**) into cantharidin (**3**), and of mevalonolactone (**1**) into both, farnesol (**2**) and cantharidin (**3**) is observed, the sesquiterpene alcohol **2** acts as an intermediate in the biosynthesis of the C<sub>10</sub>-compound **3** (*Scheme 1*).

**1. Einleitung.** - In früheren Mitteilungen wurde gezeigt, dass sowohl Mevalonsäurelacton (**1**) [2] als auch (*E,E*)-Farnesol (**2**) [1] [3] in spezifischer Weise in Cantharidin (**3**), den toxischen Inhaltsstoff von Käfern aus der Familie *Meloidae* (*Coleoptera*), eingebaut werden. Ferner führte die simultane Applikation von 2-[<sup>14</sup>C]-Mevalonsäurelacton (2-[<sup>14</sup>C]-**1**) und 11',12-[<sup>3</sup>H]-Farnesol (11',12-[<sup>3</sup>H]-**2**) zu (<sup>3</sup>H und <sup>14</sup>C)-doppelmarkiertem Cantharidin [3a].

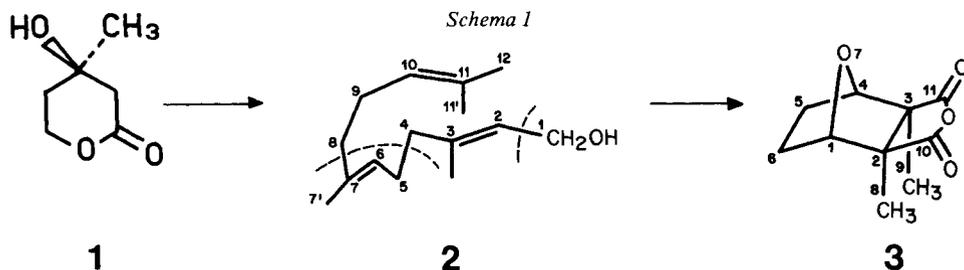
Die Verteilung der Radioaktivität im Cantharidin nach Injektion der Vorläufer **1** und **2** legt zwar die Formulierung eines Biosyntheseweges gemäss *Schema 1* nahe, ist aber kein ausreichendes Kriterium dafür, dass Farnesol ein reales Zwischenprodukt in der Biosynthese des Cantharidins (**3**) aus Mevalonsäurelacton (**1**) darstellt. Die geeignete Methode, einen eindeutigen Beweis zu erbringen, besteht in der Anwendung der von *Cornforth* diskutierten «hot trap» [4], wonach das Auftreten von (*E,E*)-Farnesol (**2**) als Zwischenstufe dann als gesichert angesehen werden kann,

<sup>1)</sup> 6. Mitt.: siehe [1].

<sup>2)</sup> Korrespondenzautor: *W.-D. Woggon*.

<sup>3)</sup> Neue Adresse: Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Max-Planck-Strasse 1, D-53 Bonn.

<sup>4)</sup> Teil der Dissertation, Universität Zürich 1975.

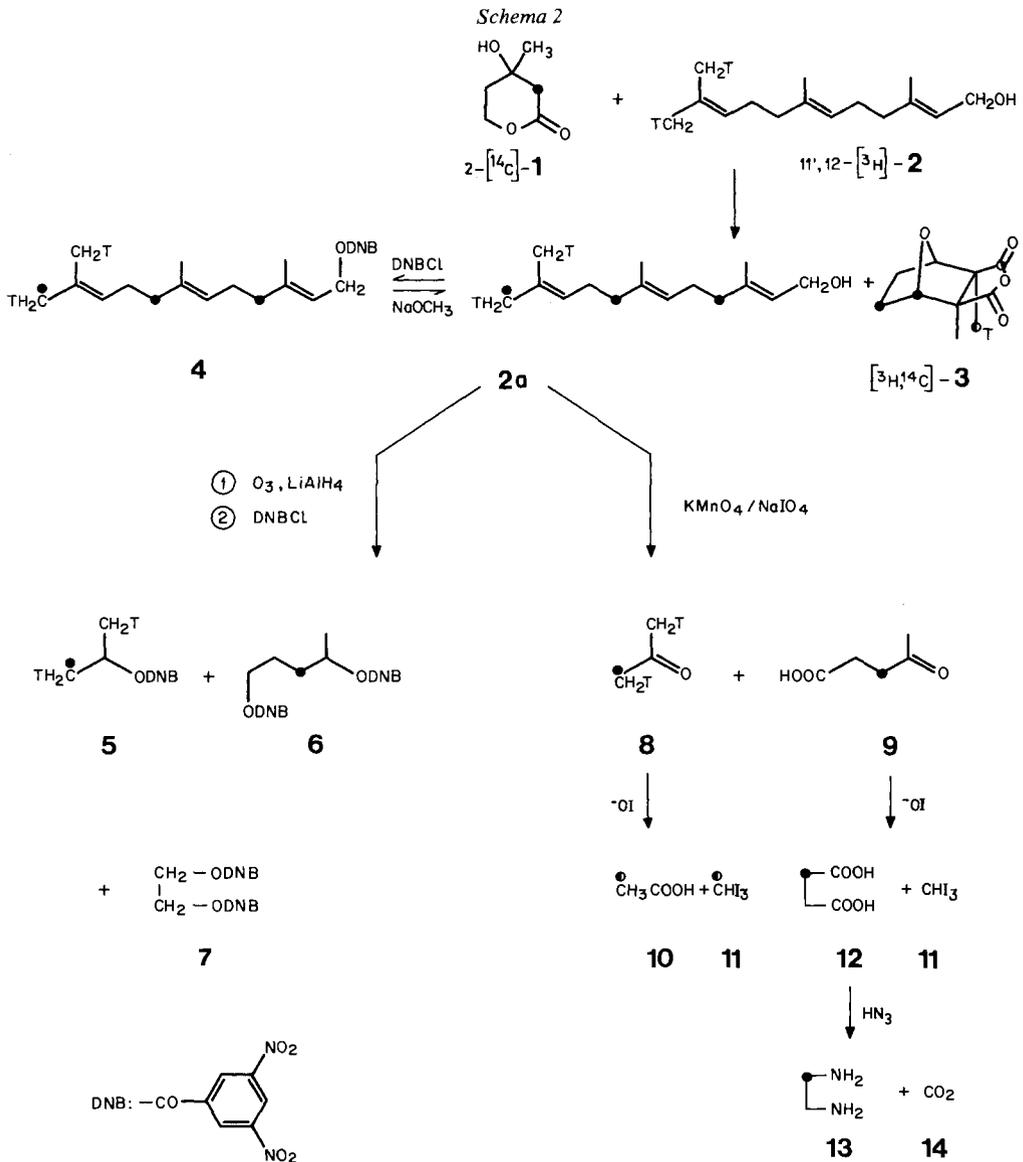


wenn nach simultaner Applikation von z. B. 2-[ $^{14}\text{C}$ ]-Mevalonsäurelacton (2-[ $^{14}\text{C}$ ]-**1**) und (*E,E*)-11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-Farnesol (11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-**2**) sowohl das Cantharidin (**3**) als auch zurückisoliertes Farnesol (**2**) in spezifischer Weise doppelmarkiert sind.

**2. Ergebnisse.** - Eine bei 110–120°/0,01 Torr codestillierte Mischung aus (*E,E*)-11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-Farnesol (11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-**2**; 0,243 mmol; 4,16 mCi) und 2-[ $^{14}\text{C}$ ]-Mevalonsäurelacton (2-[ $^{14}\text{C}$ ]-**1**; 0,252 mmol; 1,15 mCi) mit  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 3,62$  wurde als Acetonlösung 105 adulten männlichen *Lytta vesicatoria* L. injiziert. 37 Insekten wurden nach 26 Std. getötet, homogenisiert und einem alkalischen Aufschlussverfahren durch Erhitzen in 0,1 M Phosphatpuffer vom pH 11 unterworfen. Nach Behandeln des auf pH 9,6 gestellten Hydrolysates mit alkalischer Phosphatase (E. C. 3.1.3.1.) [5] wurde mit Dichlormethan extrahiert<sup>5)</sup> und die Farnesol-Fraktion (8,8 mg) nach dem Versetzen mit 0,431 mmol radio-inaktivem **2** der Chromatographie an Kieselgel unterworfen. Die weitere Reinigung erfolgte durch Herstellung des 3,5-Dinitrobenzoesäureesters **4** und dessen Umkristallisieren bis zur Konstanz der Radioaktivität. Aus den gefundenen spezifischen Aktivitäten ( $^3\text{H}$ :  $(1,178 \pm 0,065) \cdot 10^8$  dpm/mmol und  $^{14}\text{C}$ :  $(1,017 \pm 0,028) \cdot 10^6$  dpm/mmol;  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 115,8$ ) wurde berechnet, dass 1,56% des den 37 aufgearbeiteten Insekten applizierten (*E,E*)-11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-Farnesols (11', 12-[ $^3\text{H}$ ]-**2**) zurückisoliert wurden, und dieses Farnesol 0,049% der in Form von 2-[ $^{14}\text{C}$ ]-Mevalonsäurelacton (2-[ $^{14}\text{C}$ ]-**1**) applizierten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität enthielt. Die Menge des aus 2-[ $^{14}\text{C}$ ]-**1** (spezifische Aktivität: 4,56 mCi/mmol) *de novo* biosynthetisierten [ $^{14}\text{C}$ ]-Farnesols ([ $^{14}\text{C}$ ]-**2**), oder möglicherweise seines Pyrophosphates, betrug also mindestens (d.h. vorausgesetzt, dass keine Verdünnung der spezifischen Aktivität im Verlaufe der Umwandlung von **1** in **2** aufgetreten war)  $1,44 \cdot 10^{-5}$  mmol, entsprechend 86,6 ng Farnesol pro Insekt, bzw. bei deren Durchschnittsgewicht von 0,11 g [3 a] approx. 0,8  $\mu\text{g/g}$ .

Zur Bestimmung der Isotopenverteilung wurde das durch Methanolyse von **4** erhaltene, doppelmarkierte Farnesol **2a** nach Verdünnen mit radio-inaktivem **2** den in *Schema 2* gezeigten Abbaureaktionen unterworfen. Ozonolyse von **2a** ergab nach reduktiver Aufarbeitung mit Lithiumaluminiumhydrid [6], erschöpfender Extraktion der gebildeten Alkohole und Umsetzung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid die Ester **5–7**, die nach wiederholter präp. DC. und Kristallisation Präparate konstanter Aktivität ergaben (*Schema 2* und *Tabelle 1*). Oxydative Spaltung von **2a** mittels

<sup>5)</sup> Bei diesem Verfahren wurde das gesamthaft vorhandene Farnesol isoliert, unabhängig davon, ob es in freier Form oder möglicherweise als Pyrophosphat vorlag.



Permanganat/Perjodat (vgl. [7]) führte zu radioaktiver Lävulinsäure (9) und Aceton (8), die separat der Umsetzung mit Natriumhydroxid/Jod/Kaliumjodid unterworfen wurden, wobei sich Jodoform (11) sowie die Säuren 10 und 12 bildeten. Die radioaktive Bernsteinsäure (12) lieferte bei Anwendung der *Schmidt*-Reaktion (vgl. [8]) radioaktives Äthylendiamin (13) und inaktives Kohlendioxid (14). Die Resultate dieses Abbaus sind in *Tabelle 2* wiedergegeben.

Das Cantharidin (3) wurde aus der nach Abtrennen der Farnesol-Fraktion zu-

Tabelle 1. Abbau von [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (**2a**) durch Ozonolyse

	Spezifische Aktivität		
	Isotop	(dpm/mmol)	rel. Aktivität (%)
[ $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol ( <b>2a</b> )	$^3\text{H}$	$(2,24 \pm 0,09) \cdot 10^7$	100
	$^{14}\text{C}$	$(1,92 \pm 0,04) \cdot 10^5$	100
<b>5</b>	$^3\text{H}$	$(2,04 \pm 0,05) \cdot 10^7$	90,8
	$^{14}\text{C}$	$(6,66 \pm 0,32) \cdot 10^4$	34,6
<b>6</b>	$^3\text{H}$	$3,74 \cdot 10^4$	0,4
	$^{14}\text{C}$	$(6,47 \pm 0,25) \cdot 10^4$	67,3
<b>7</b>	$^3\text{H}$	$< 4,5 \cdot 10^2$	$\leq 0,1$
	$^{14}\text{C}$	$\leq 4,5 \cdot 10^2$	$\leq 0,2$

Tabelle 2. Permanganat/Perjodat-Abbau von [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (**2a**)

		Spezifische Aktivität	
		(dpm/mmol)	rel. Aktivität (%)
[ $^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol	( <b>2a</b> )	$(2,938 \pm 0,066) \cdot 10^5$	100
$\text{CH}_3\text{COOH}^a$ C(11) und C(11')/C(12)	( <b>10</b> )	$(5,07 \pm 0,07) \cdot 10^4$	17,3
$\text{CHI}_3$ C(11')/C(12)	( <b>11</b> )	$(4,98 \pm 0,31) \cdot 10^4$	16,7
$\text{CHI}_3$ C(3') und C(7')	( <b>11</b> )	$(1,60 \pm 0,04) \cdot 10^4$	10,7
$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ C(3), C(4), C(5), C(6), C(7), C(8), C(9) und C(10)	( <b>12</b> )	$8,53 \cdot 10^4$	57,1
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2^b$ C(4), C(5), C(8) und C(9)	( <b>13</b> )	$(9,36 \pm 0,02) \cdot 10^4$	62,7
$\text{CO}_2^c$ C(3), C(6), C(7) und C(10)	( <b>14</b> )	$(4,64 \pm 2,65) \cdot 10^2$	0,3

a) Isoliert als Essigsäure-*p*-bromphenacylester.  
b) Isoliert als Dipikrat.  
c) Isoliert als Bariumcarbonat.

rückbleibenden wässrigen Phase (pH 9,6) ohne Zusatz von radio-inaktivem Cantharidin isoliert. Nach Ansäuern mit 6N Salzsäure wurde mit Dichlormethan extrahiert. Waschen des Eindampfrückstandes mit Pentan und Sublimation ergaben 29,7 mg eines angereicherten Cantharidin-Präparates, das nach dem Verdünnen mit 123,1 mg radio-inaktivem **3** (Gesamtmenge: 0,78 mmol) bis zur konstant bleibenden Radioaktivität umkristallisiert wurde. Die gemessene spezifische Aktivität betrug für  $^3\text{H}$ :  $1,283 \pm 0,038 \cdot 10^7$  dpm/mmol und für  $^{14}\text{C}$ : 2,990

$\pm 0,089 \cdot 10^6$  dpm/mmol mit  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 4,29$ . Aus der den 37 zur Aufarbeitung genommenen Käfern applizierten Radioaktivität liess sich eine Einbaurrate von 0,31% (*E,E*)-11',12- $^3\text{H}$ -Farnesol (11',12- $^3\text{H}$ -2) und 0,26% 2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäurelacton (2- $^{14}\text{C}$ -1) berechnen.

**3. Diskussion.** - Aus den geschilderten Experimenten geht eindeutig hervor, dass innerhalb der Versuchsdauer nach simultaner Applikation von 2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäurelacton (2- $^{14}\text{C}$ -1) und (*E,E*)-11',12- $^3\text{H}$ -Farnesol (11',12- $^3\text{H}$ -2) sowohl Cantharidin aus beiden Vorläufern als auch Farnesol aus Mevalonsäurelacton biosynthetisiert werden. 2- $^{14}\text{C}$ -1 wird dabei in spezifischer Weise der Isoprenregel folgend (siehe *Tabellen 1* und *2*) in Farnesol inkorporiert. Der spezifische Einbau von Mevalonsäurelacton (1) und von Farnesol (2) in Cantharidin (3) folgt aus früheren Experimenten [2] [3].

Infolge des zur Isolierung des Farnesols gewählten Verfahrens bleibt die Frage, ob 2a in freier Form oder als Pyrophosphat in den Insekten vorliegt, zunächst unbeantwortet. Sie scheint jedoch aufgrund der Beobachtungen, dass freies Farnesol in Cantharidin inkorporiert wird und dass Farnesylsäure-methylester ein ebenso guter Vorläufer für 3 ist wie freies Farnesol [9], nicht von Bedeutung zu sein.

Die Konzentration von freiem Farnesol in den Insekten ist offenbar sehr niedrig. Der geringe Prozentsatz von aus den Insekten zurückisoliertem 11',12- $^3\text{H}$ -2 (1,56% der applizierten Menge) lässt auf eine weitgehende Umwandlung in andere Verbindungen schliessen (vgl. [10]). Versuche, freies Farnesol in *Lytta*-Männchen nachzuweisen (GC., Nachweisgrenze 1  $\mu\text{g}$  2 pro g Insekten), verliefen erfolglos [11]. Die nach Applikation von 2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäurelacton (2- $^{14}\text{C}$ -1) in dem als «hot trap» verwendeten 11',12- $^3\text{H}$ -Farnesol (11',12- $^3\text{H}$ -2) aufgefundene  $^{14}\text{C}$ -Aktivität ist jedoch ein Beweis für das Vorkommen von 2 in *Lytta vesicatoria* L., wo es seiner erweisenen Funktion nach eine Zwischenstufe in der Cantharidin-Biosynthese darstellt.

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 2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäurelacton, Herrn Dr. H. Schreier (Sandoz AG, Basel) für die grosszügige Unterstützung bei der Synthese von (*E,E*)-11',12- $^3\text{H}$ -Farnesol und Herrn H. Frohofer (mikroanalytische Abteilung der Universität Zürich) für Radioaktivitätsmessungen.

### Experimenteller Teil

**Allgemeine Bemerkungen.** - Vgl. [3].

**1. Herstellung und Applikation des radioaktiven Injektionspräparates.** - 54,10 mg (0,243 mmol, 17,1 mCi/mmol)<sup>6</sup>) (*E,E*)-11',12- $^3\text{H}$ -Farnesol (11',12- $^3\text{H}$ -2), laut GC. 90,0% (*E,E*)-11',12- $^3\text{H}$ -2 und 10,0% (2*Z,6E*)-11',12- $^3\text{H}$ -2, wurden mit 32,80 mg (0,252 mmol, 4,56 mCi/mmol)<sup>7</sup>) 2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäurelacton (2- $^{14}\text{C}$ -1) gemischt und bei 110-120°/0,01 Torr codestilliert. Im Destillat betrug  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$

<sup>6</sup>) 11',12- $^3\text{H}$ -2 der spezifischen Aktivität 17,1 mCi/mmol wurde durch Verdünnen von 11',12- $^3\text{H}$ -2 der spezifischen Aktivität 1,26 Ci/mmol (zur Synthese vgl. [3]) mit 2 gleicher Stereoisomeren-Zusammensetzung (90% (*E,E*)-2, 10% (2*Z,6E*)-2) erhalten.

<sup>7</sup>) 2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäurelacton wurde uns von Herrn Dr. J. Würsch (Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel) zur Verfügung gestellt.

= 3,62. Es wurde in 1 ml Aceton gelöst und die Lösung 105 männlichen adulten *Lytta vesicatoria* injiziert, die in Sizilien gesammelt worden waren. Nach 26 Std. wurden die Insekten getötet.

**2. Isolierung von [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (2a) aus *Lytta vesicatoria* L.** - 37 der aus dem oben beschriebenen Einbauversuch stammenden Käfer wurden nach dem Homogenisieren in 180 ml 0,1M Phosphatpuffer bei pH 11 suspendiert und 5 Std. unter Rückfluss erhitzt, am Ende wurde pH 8 gemessen. Durch Zugabe von 0,1N Natriumhydroxyd wurde auf pH 9,6 gestellt und dann 4,5 Std. bei  $35 \pm 1^\circ$  mit einer Lösung von 100 mg alkalischer Phosphatase (E.C. 3.1.3.1., aus Kälberdarm, spezifische Aktivität 1-3 Einheiten/mg, *Fluka*) in 10 ml 0,05M Natriumhydrogencarbonat inkubiert [5]. Danach wurde erschöpfend mit Dichloromethan extrahiert. Der Eindampfrückstand des Dichloromethanextraktes wurde in 50 ml Pentan aufgenommen, 5mal mit je 10 ml 0,2N Salzsäure extrahiert und nach dem Trocknen über Kaliumcarbonat im RV. eingedampft. 5mal Rückstand wurden 4,80 mg (*E,E*)-Farnesol (**2**) gegeben. Nach Chromatographie an einer Kieselgel-Säule mit Pentan/Äther 6:4 und anschließender präp. DC. mit Pentan/Äther 9:1 wurden 8,80 mg einer [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (**2a**) enthaltenden Fraktion erhalten. Nach erneutem Verdünnen mit 90,8 mg inaktivem (*E,E*)-**2** (Gesamtmenge 95,6 mg (0,431 mmol) [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-Farnesol (**2a**)) wurde **2a** in 5 ml abs. Pyridin gelöst und mit 330,1 mg (1,43 mmol) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid versetzt. Nach 18 Std. Rühren bei  $25^\circ$  wurde wie üblich aufgearbeitet. Nach präp. DC. an Kieselgel mit Tetrachlorkohlenstoff/Äthylacetat/Cyclohexan 7,5:1,5:1 wurden in 85,5proz. Ausbeute 159,60 mg (0,383 mmol) 3,5-Dinitrobenzoat **4** erhalten. Wiederholte Umkristallisation aus Pentan ergab **4** von konstanter Radioaktivität (Smp.:  $49,2-50,0^\circ$ ) der folgenden spezifischen Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $(1,178 \pm 0,065) \cdot 10^8$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $(1,017 \pm 0,028) \cdot 10^6$  dpm/mmol;  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 115,8 \pm 3,3$ .

**3. Ozonolyse von 2a** (vgl. [6]). - 48,58 mg (0,117 mmol) des unter 2. beschriebenen Dinitrobenzoates **4** in 10 ml Methanol/Äther 1:1 wurden nach Zugabe von 0,2 ml 2M Natriummethylat in Methanol 2 Std. bei  $25^\circ$  gerührt. Dann wurde eingedampft, der Rückstand in 10 ml Wasser aufgenommen und mit Äther extrahiert. Der Eindampfrückstand der über Natriumsulfat getrockneten Ätherphase wurde mittels präp. DC. an Kieselgel mit Äther/Pentan 1:1 chromatographiert und das Farnesol **2a** bei 110-120 $^\circ$ /0,01 Torr destilliert: 24,90 mg (0,112 mmol, 96,0%) **2a**. Zur Durchführung des Abbaues [6] wurde das radioaktive Farnesol **2a** mit 106,61 mg (0,48 mmol) inaktivem (*E,E*)-**2** verdünnt; Gesamtmenge: 131,51 mg (0,592 mmol) **2a** der folgenden spezifischen Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $2,263 \cdot 10^7$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $1,946 \cdot 10^5$  dpm/mmol;  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 116,3$ .

In eine Lösung von 130,50 mg (0,578 mmol) **2a** in 10 ml Dichloromethan/Methanol 6:4 wurde während 1,5 Std. bei  $-75^\circ$  Ozon eingeleitet. Dann wurde das überschüssige Ozon mit Stickstoff ausgetrieben und das Lösungsmittel abgezogen. Der farblose ölige Rückstand wurde in 20 ml abs. Äther mit 67 mg (1,75 mmol) Lithiumaluminiumhydrid versetzt und 12 Std. unter Rückfluss gekocht. Es wurde mit 10 ml ges. wässriger *Seignettesalzlösung* versetzt und 1 Std. gerührt. Dann wurden beide Phasen in einen Flüssig-Flüssig-Extraktor transferiert. Nach 75 Std. Extraktion mit Äther wurde die Ätherphase durch Destillieren über eine 25-cm-*Vigreux*-Kolonnen auf 5 ml eingengt und mit 10 ml abs. Pyridin sowie 1,50 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid versetzt. Nach 24 Std. Rühren bei  $25^\circ$  wurde das Pyridin bei 0,01 Torr abgezogen und der feste Rückstand 5mal mit je 20 ml Dichloromethan digeriert. Der Auszug wurde eingedampft und das Gemisch der 3,5-Dinitrobenzoate **5-7** durch 2malige präp. DC. an Kieselgel mit Tetrachlorkohlenstoff/Äthylacetat/Cyclohexan 7,5:1,5:1 aufgetrennt. Es wurden isoliert: 10,01 mg (0,0394 mmol, 6,7%) **5** vom Smp.  $122,0-122,5^\circ$  (aus Äther) (spezifische Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $(2,037 \pm 0,05) \cdot 10^7$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $(6,66 \pm 0,32) \cdot 10^4$  dpm/mmol), 15,30 mg (0,311 mmol, 2,6%) **6** vom Smp.  $153,0-153,6^\circ$  (aus Benzol/Hexan) (spezifische Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $3,74 \cdot 10^4$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $(6,47 \pm 0,25) \cdot 10^4$  dpm/mmol) und schliesslich 9,71 mg (0,0213 mmol, 3,6%) **7** vom Smp.  $173,0-174,0^\circ$  (aus Benzol), das nicht radioaktiv war ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ :  $\leq 1$  dpm/mg).

**4. Permanganat/Perjodat-Abbau von 2a** (vgl. [7]). - 93,84 mg (0,225 mmol) des unter 2. beschriebenen Dinitrobenzoates **4** wurden wie unter 3. verseift und aufgearbeitet. Es wurden 48,20 mg (0,217 mmol, 96,2%) **2a** erhalten, das mit 115,6 mg (0,52 mmol) inaktivem **2** verdünnt wurde. Bestimmung der spezifischen Aktivität ergab:  $^3\text{H}$ :  $3,517 \cdot 10^7$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $2,938 \cdot 10^5$  dpm/mmol;  $^3\text{H}/^{14}\text{C} = 119,7$ .

160,40 mg (0,721 mmol) **2a** wurden 5 Std. bei  $20^\circ$  unter Lichtausschluss mit 4,160 g (19,45 mmol) Natriumperjodat, 80,0 mg (0,506 mmol) Kaliumpermanganat und 640,2 mg (4,63 mmol) Kaliumcarbonat in 320 ml Wasser geschüttelt. Dann wurde wie in [7] beschrieben aufgearbeitet und das gebildete radioaktive Aceton **8** abdestilliert. Das hieraus erhaltene Jodoform ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-**11**) (193,2 mg, 0,491 mmol,

68,1%) hatte die folgende spezifische Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $(9,98 \pm 3,87) \cdot 10^3$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $(4,98 \pm 0,31) \cdot 10^4$  dpm/mmol. Aus der wässrigen, alkalischen, nach Abdestillieren des Acetons **8** zurückgebliebenen Lösung wurde die Essigsäure **10** gewonnen, die als *p*-Bromphenacylester isoliert wurde. Dessen Reinigung mittels präp. DC. und Destillation [3a] lieferte 84,80 mg (0,330 mmol, 45,7%) Essigsäure-*p*-bromphenacylester der spezifischen Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $(1,82 \pm 0,06) \cdot 10^7$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $(5,17 \pm 0,07) \cdot 10^4$  dpm/mmol. Die gleichfalls nach der in [7] beschriebenen Arbeitsweise erhaltene Lävulinsäure (**9**) wurde der Jodoformreaktion unterworfen und ergab 259,0 mg (0,658 mmol, 45,6%) Jodoform (**11**; spezifische Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $(4,57 \pm 0,11) \cdot 10^4$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $(1,60 \pm 0,04) \cdot 10^4$  dpm/mmol). Aus der nach dem Jodoformabbau der Lävulinsäure zurückbleibenden alkalischen Wasserphase wurde nach dem Ansäuern die radioaktive Bernsteinsäure (**12**) extrahiert. Ausbeute 32,70 mg (0,277 mmol, 19,2%); spezifische Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $5,38 \cdot 10^4$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $8,53 \cdot 10^4$  dpm/mmol. 12,70 mg (0,108 mmol) Bernsteinsäure (**12**) wurden wie in [8] beschrieben zu Kohlendioxid (**14**, isoliert als Bariumcarbonat) und Äthylendiamin (**13**, isoliert als Dipikrat) abgebaut. Es wurden 20,3 mg (0,103 mmol, 47,7%) Bariumcarbonat (spezifische Aktivität:  $^{14}\text{C}$ :  $464 \pm 265$  dpm/mmol) sowie 20,2 mg (0,039 mmol, 36,3%) Äthylendiamin-Dipikrat (spezifische Aktivität:  $^3\text{H}$ :  $(4,07 \pm 0,11) \cdot 10^4$  dpm/mmol,  $^{14}\text{C}$ :  $(9,36 \pm 0,02) \cdot 10^4$  dpm/mmol) erhalten.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *W.-D. Woggon, M. G. Peter & H. Schmid*, *Helv.* **60**, 2288 (1977).
- [2] a) *Ch. Schlatter, E. E. Waldner & H. Schmid*, *Experientia* **24**, 994 (1968); b) *H. Günther, E. Ramstad & H. G. Floss*, *J. pharm. Sci.* **58**, 1274 (1969).
- [3] a) *M. G. Peter, W.-D. Woggon, Ch. Schlatter & H. Schmid*, *Helv.* **60**, 844 (1977); b) *M. G. Peter, H. R. Waespe, W.-D. Woggon & H. Schmid*, *ibid.* **60**, 1262 (1977).
- [4] *J. W. Cornforth*, *Chem. Soc. Rev.* **2**, 1 (1973).
- [5] *G. Popjak*, 'Methods Enzymol. XV', R. B. Clayton (Ed.), Academic Press, New York 1969, S. 393.
- [6] *C. R. Childs & K. Bloch*, *J. biol. Chemistry* **237**, 62 (1962).
- [7] *E. E. Waldner, Ch. Schlatter & H. Schmid*, *Helv.* **52**, 15 (1969).
- [8] *H. Handschin, H. P. Sigg & Ch. Tamm*, *Helv.* **51**, 1943 (1968).
- [9] *J. Sierra, M. G. Peter, W.-D. Woggon & H. Schmid*, in Vorbereitung.
- [10] *W. Seubert & E. Fass*, *Biochem. Z.* **341**, 23 (1964); *idem* *ibid.* **341**, 35 (1964).
- [11] *S. A. Hauffe*, geplante Dissertation, Universität Zürich.