

Isolation of 1. The alkaloid fraction (2.56 g) obtained from the 75% EtOH extracts of the fresh aerial parts of *E. koreensis* (600 g), collected in September, was chromatographed, essentially as described in refs. [1–3], on a Si gel column (Merck, type 60) using CH_2Cl_2 –MeOH–conc NH_4OH (1000:30:3) to CH_2Cl_2 –MeOH–conc NH_4OH (90:9:1). 1 appeared in the early eluates under the above chromatographic conditions and was obtained as crystals, mp 118° (C_6H_6 –petrol); $[\alpha]_D^{21} -211.6$ (EtOH, c 0.219); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 232 (3.81), 306 (3.89); found: C, 69.26; H, 7.78; N, 10.67. $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_2$ requires: C, 69.20; H, 7.74; N, 10.76. IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 2700–2800 (*trans*-quinolizidine), 1700 (C=O), 1650 (α -pyridone C=O). MS (70 eV): m/e 260 (M^+ , 12), 217 (15), 203 (16), 160 (12), 147 (9), 146 (20), 114 (100), 58 (28), 43 (54). PMR (C_6D_6): δ 1.05 (m , 2H, C-8 CH_2), 1.4–2.3 (m , 11H containing a s, 3H at 1.52 (—CO—Me) and an A_2B_2 m , ca 4H at 2 (—CO— $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}<$)), 2.4 (bd , 2H, J = 10 Hz, equatorial H at C-11 and C-13), 3.65 (q , 1H, J = 15.5, 7 Hz, C-10 H), 3.99 (d , 1H, J = 15.5 Hz, C-10 H), 5.37 (q , 1H, J = 6.5, 1.5 Hz, C-5 H), 6.52 (q , 1H, J = 9, 1.5 Hz, C-3 H), 6.8 (q , 1H, J = 9, 6.5 Hz, C-4 H).

Synthesis of 1. A mixture of cytosine (60 mg, 0.32 mmol), isolated from *Sophora* and *Thermopsis* sp., and methylvinylketone (76 μl , 0.96 mmol) in C_6H_6 (3 ml) was heated at 60° for 3 hr. After evaporating the solvent *in vacuo*, the residue was purified by Si gel column chromatography, developed with MeOH– CH_2Cl_2 (49:1). 1 was recrystallized from C_6H_6 –petrol to give colourless plates, mp 118°, $[\alpha]_D^{21} -210^\circ$ (EtOH, c 0.31). The synthetic product was found to be completely identical with those of the natural product by IR, MS, PMR, and chromatographic comparisons.

REFERENCES

1. Ohmiya, S., Otomasu, H., Murakoshi, I. and Haginiwa, J. (1974) *Phytochemistry* 13, 1016.
2. Ohmiya, S., Otomasu, H., Murakoshi, I. and Haginiwa, J. (1974) *Phytochemistry* 13, 643.
3. Murakoshi, I., Sugimoto, K., Haginiwa, J., Ohmiya, S. and Otomasu, H. (1975) *Phytochemistry* 14, 2714.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1461–1462. Pergamon Press. Printed in England

METABOLISM OF VINDOLINE, CATHARANTHINE HCl, AND VINCALEUKOBLASTINE SULFATE BY SUSPENSION CULTURES OF *CATHARANTHUS ROSEUS*

DAVID P. CAREW* and ROBERT J. KRUEGER†

* Division of Medicinal Chemistry and Natural Products, College of Pharmacy, University of Iowa, Iowa City, IA 52242 U.S.A. † Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ferris State College, Big Rapids, Michigan, 49307 U.S.A.

(Received 7 February 1977)

Key Word Index—*Catharanthus roseus*; Apocynaceae; suspension culture; alkaloids; vindoline; catharantine HCl; vincaleukoblastine sulphate; metabolites.

Callus tissue of *Catharanthus roseus* (L.) G. (Don.), culture line Wc13S, [1] continuously subcultured since 1961, was subcultured onto a chemically defined agar medium (PRL1) [2] in the fall of 1972. Suspension cultures were initiated as needed from three week old subcultures of this PRL1 callus line and grown in PRL1 liquid medium. Suspension cultures were grown in 100 ml of medium in 500 ml flasks. The cultures were shaken at 135 rpm in the dark at $24 \pm 1^\circ$. Cultures were incubated for 14 to 21 days prior to addition of the alkaloid substrate for metabolism studies. Alkaloids were added aseptically to the cultures as separate 70% ethanol solutions. Each alkaloid was added separately at a concentration of 10 mg per 100 ml for vindoline and catharantine HCl and 9.4 mg for vincaleukoblastine sulphate ($\text{VLB}\cdot\text{SO}_4$). Each metabolism experiment consisted of 10 replicate flasks. In an additional experiment, vindoline and catharantine HCl were added simultaneously, each to a final concentration of 100 mg/l. to 10 replicate flasks. Alkaloid containing cultures were incubated for 1, 3, or 7 days prior to harvest. Suspension tissue plus medium was extracted [3] and examined

using multiple TLC and PLC chromatographic systems for expected metabolites. Metabolites were visualized using Dragendorff's and ceric ammonium sulfate spray reagents [4]. Identification of metabolites was based on TLC (five solvent systems), and MS comparison to reference compounds. The solvent systems utilized were EtOAc, EtOAc–EtOH (1:1), EtOAc–EtOH (3:1), *n*-BuOH–HOAc– H_2O (4:4:1), and MeOH dried over Na_2SO_4 . Appropriate control experiments were conducted to ensure that isolated compounds were not artifacts.

Only two metabolites of vindoline were present on the chromatograms. These were identified as desacetyl-vindoline (DAV) and dihydrovindoline (DHV). No metabolite of catharantine HCl was detected. Metabolites isolated from the cultures fed both vindoline and catharantine HCl consisted only of DAV and DHV. Three metabolites were isolated from extracts of tissue which had been fed VLB sulfate (as well as unmetabolized VLB sulfate). Preliminary MS investigations indicate that two of these are dimeric alkaloids (m/e 's greater than 750). The third does not show an m/e

greater than 428. Further feeding experiments are planned to provide more metabolites for identification.

Acknowledgements—The authors acknowledge the contribution of vindoline, catharanthine HCl, VLB.SO₄, DAV and DHV from the Eli Lilly Research Laboratories. The author (RJK) also acknowledges financial support in the form of an Eli Lilly Pre-Doctoral Fellowship.

REFERENCES

1. Babcock, P. and Carew, D. P. (1962) *Lloydia* 25, 209.
2. Gamburg, O. L. (1970) *Plant Physiol.* 45, 372.
3. Leete, E., Admad, A. and Kompis, I. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 4168.
4. Farnsworth, N. R., Blomster, R. N., Damratoski, D. Meer, W. A. and Dammarato, L. V. (1964) *Lloydia* 27, 302.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1462–1463. Pergamon Press. Printed in England.

ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG DES ALKALOIDS FUCHSISENECIONIN AUS *SENECIO FUCHSII**

ERHARD RÖDER und HELMUT WIEDENFELD

Pharmazeutisches Institut, der Universität, 5300 Bonn-Endenich, GFR

(Revised received 1 April 1977)

Key Word Index—*Senecio fuchsii*; Asteraceae; Fuchsisenecionin; O⁹-Senecioplplatynecin; alkaloid.

EINFÜHRUNG

Die Asteracee *Senecio fuchsii* ist eine in Mitteleuropa weit verbreitete Pflanze. Im Mittelalter spielte sie als Wundmittel eine große Rolle und wird heute noch in der Humanmedizin als Antidiabetikum und in der Gynäkologie als Hämostyptikum eingesetzt. Über die Inhaltsstoffe wurde erstmalig 1924 von Müller berichtet [1]. Er isolierte aus der getrockneten Pflanze ein Alkaloid, das er Fuchsisenecionin nannte, und gab eine Summenformel von C₁₂H₂₁NO₃ an. Bei einer neuerlichen Bearbeitung stellten Corcilius [2] und Lemp [3] fest, daß es sich bei Fuchsisenecionin um ein Pyrrolizidinalkaloid der Summenformel C₁₃H₂₁NO₃ handeln müsse, das aus einem gesättigten Aminoalkohol—von Lemp Fuchsinecin genannt—und der Angelikasäure besteht. Nach unseren Untersuchungen ist Fuchsisenecionin O⁹-Senecioplplatynecin, bzw. das Enantiomere des Platynecins.

RESULTATE UND DISKUSSION

Wegen der leichten Zersetzlichkeit des Alkaloids erfolgt die Extraktion und Aufarbeitung der Droge unter schonenden Bedingungen. Nach gaschromatographischer Abtrennung aus dem Rohextrakt wird das Alkaloid als Goldchloridsalz zur Kristallisation gebracht. Eine aliquote Teil wird unter Stickstoff alkalisch verseift, die Karbonsäure (Necinsäure) abgetrennt und der Aminoalkohol (Necin) wiederum als Goldchloridsalz isoliert. Von der Necinsäure (1), den Goldsalzen des Necins (2) und des Alkaloids (3) werden Massen-, ¹H-NMR- und IR-Spektren angefertigt.

Struktur von 1

Im Massenspektrum kann dem Molekülpeak von M⁺ 100 (100%) eine Summenformel von C₅H₈O₂ zugeordnet werden. Die Art der Fragmentierung schließt Angelikasäure als Necinsäure aus; sie ist aber identisch mit einem Spektrum der β-Dimethylacrylsäure (Seneciolsäure). Als zusätzlicher Beweis dient das ¹H-NMR-Spektrum, das übereinstimmt mit dem in der Literatur angegebenen [4].

Struktur von 2

Im Massenspektrum wird ein Molekülpeak von M⁺ 157 (13,4%) erhalten, aus dem die Summenformel C₈H₁₅NO₂ abgeleitet werden kann. Als Schlüsselfragment ist der Peak m/e 82 (79,5%) anzusehen, der bei gesättigten Necinen auftritt. Durch das Fehlen eines Peaks bei m/e 140 (157–17) kann ausgeschlossen werden, daß die Oximethylgruppe des Necins cis-ständig zum C⁸-Wasserstoff steht [5]. Diese stereospezifischen Merkmale treffen nur auf Platynecin, bzw. sein Enantiomeres zu. Die Interpretation des ¹H-NMR-Spektrums gestaltet sich schwierig, da durch vielfältige Kopplung der einzelnen Protonen untereinander Multipletts auftreten, die sich überlagern. Mit D₂O konnte der Austausch von zwei Protonen wahrscheinlich gemacht werden. Im IR-Spektrum treten bei 1070 cm⁻¹ und bei 1125 cm⁻¹ die für einen primären und sekundären Alkohol charakteristischen Streckschwingungen auf.

Struktur von 3

Die bei der Strukturaufklärung von 1 und 2 gefundenen Ergebnisse lassen sich mit den Aussagen der Spektren von 3 in Einklang bringen. Im Massenspektrum wird ein Molekülpeak von M⁺ 239 (2,8%) erhalten, für

*Teil der Dissertation H. Wiedenfeld, Bonn (1976).