

Isolierung, Strukturaufklärung und
Totalsynthese von Alkaloiden aus
Stenus Käfern und der Seeanemone
Heteractis aurora

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für
Biologie, Chemie und Geowissenschaften der
Universität Bayreuth

vorgelegt von

Tobias Müller

Bayreuth 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2007 bis September 2011 unter der Leitung von Prof. Dr. Karlheinz Seifert am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Tag der Einreichung der Dissertation: 07.10.2011

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 20.12.2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Karlheinz Seifert (Erstgutachter)

Prof. Dr. Rainer Schobert (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Peter Strohmriegl (Vorsitz)

Prof. Dr. Konrad Dettner

Willen braucht man. Und Zigaretten.

Bundeskanzler a.D. Helmut Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1 Der Alkaloid-Begriff	1
1.2 Piperidin- und Pyridinalkaloide.....	3
1.3 Das Piperidinalkaloid Stenusin in den Wehrdrüsen von Käfern der Gattung <i>Stenus</i> (Coleoptera: Staphylinidae).....	5
2. Beschreibung der einzelnen Teilprojekte	9
2.1 Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese neuer Pyridinalkaloide aus Käfern der Gattung <i>Stenus</i> (Coleoptera: Staphylinidae)	9
2.1.1 Strukturaufklärung und Synthese der Pyridinalkaloide 9 und 10	9
2.1.2 Untersuchungen zur stereoselektiven Darstellung der Pyridinalkaloide (<i>Z</i>)- und (<i>E</i>)- 9 ..	12
.....	
2.2 Synthese aller Stenusin- und Norstenusin-Isomere durch asymmetrische Hydrierung von Pyridinen.....	16
2.2.1 Syntheseplanung.....	16
2.2.2 Synthese von (<i>2S,3R</i>)-, (<i>2S,3S</i>)-Stenusin und (<i>S</i>)-, (<i>R</i>)-Norstenusin.....	19
2.2.3 Synthese von (<i>2R,3R</i>)- und (<i>2R,3S</i>)-Stenusin.....	21
2.2.4 Untersuchungen zur Deoxygenierung von Keton 39	25
2.2.5 Untersuchungen zur Synthese von (<i>2S,3R</i>)- und (<i>2S,3S</i>)-Stenusin in drei Stufen via KUMADA- und NEGISHI-Kupplung	29
2.3 Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese des Piperideinalkaloids Cicindeloin aus <i>Stenus cicindeloides</i>	31
2.3.1 Strukturaufklärung von Cicindeloin	32
2.3.2 Totalsynthese und Aufklärung der Absolutkonfiguration von Cicindeloin	34
2.3.3 Aufklärung der Absolutkonfiguration von Cicindeloin in <i>Stenus binotatus</i>	46
2.4 Synthese eines neuen marinen Indolalkaloids aus der Seeanemone <i>Heteractis aurora</i> ..	48
.....	
2.5 Attraktive Wirkung des Blütenduftes von <i>Taccarum ulei</i> (Araceae) auf <i>Cyclocephala celata</i> und <i>C. latericia</i>	51
3. Zusammenfassung	56

4. Summary	61
5. Literaturverzeichnis	66
6. Darstellung des Eigenanteils	70
7. Publikationen und Manuskripte	72
8. Danksagung	120
9. Erklärung	122

Verwendete Abkürzungen:

9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
AIBN	2,2'-Azobis(2-methylpropionitril)
Alk	Alkyl
Aux	chirales Auxiliar
BuLi-LiDMAE	Butyllithium-Lithiumdimethylaminoethanolat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cbz-Cl	Chlorameisensäurebenzylester
DC	Dünnschichtchromatographie bzw. Dünnschichtchromatogramm
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan (Methylenchlorid)
DEG	Diethylenglycol
DET	Diethyltartrat (Weinsäurediethylester)
DHP	3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMP	Dess-Martin-Periodinan
dppe	1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan
EI	Electron impact
ESI	Electrospray ionization
GC	Gaschromatographie
Hal	Halogenid
¹ H, ¹ H-COSY	¹ H, ¹ H Correlated Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HV	Hochvakuum 10 ⁻¹ – 10 ⁻³ mbar (physikalisch korrekt: Feinvakuum; dieser Terminus wird jedoch in der Synthesechemie selten verwendet)
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
LDA	Lithiumdiisopropylamid
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure

MEK	Methylethylketon, 2-Butanon
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MS	Massenspektroskopie, Massenspektrum
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NOE	Nuclear Overhauser Effect
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PG	Protecting group (Schutzgruppe)
RAMP	(<i>R</i>)-(+)-1-Amino-2-methoxymethylpyrrolidin
RT	Raumtemperatur
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCDI	Thiocarbonyldiimidazol
TEA	Triethylamin
TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
THP	Tetrahydropyranyl
TIC	Total ion current
TMS	Trimethylsilyl

1. Einführung

1.1 Der Alkaloid-Begriff

Die Substanzklasse der Alkaloide umfasst derzeit schätzungsweise 20000 Naturstoffe¹ mit stark steigender Tendenz. Die Bezeichnung Alkaloid leitet sich von „Alkali“ (arab. *al qualja*, Pflanzenasche) ab. Dies ist nicht verwunderlich, da Mitte des 18. Jahrhunderts sog. Alkali (überwiegend K_2CO_3 , *Pottasche*) durch Eindampfen von verbrannten Laubhölzern in *Pöten* gewonnen wurde. Da die ersten entdeckten Alkaloide ebenfalls basisch reagierten, bzw. erst nach alkalischer Behandlung freigesetzt werden konnten, wurden sie dahingehend benannt.

Das erste rein isolierte Alkaloid war das von SERTÜRNAER 1805 aus dem Schlafmohn *Papaver somniferum* (Papaveraceae) erhaltene (-)-Morphin (Abbildung 1).² Dies ist das Hauptalkaloid des Opiums, was durch Anritzen der Porenkapseln und anschließendes Trocknen des ausgetretenen Milchsafte gewonnen wird. Weitere Alkaloide des Opiums sind: (-)-Codein, (-)-Narcotin, Papaverin und (-)-Thebain. SERTÜRNAER erkannte bereits in Selbstversuchen die schmerzstillende Wirkung des Morphins und seine Bedeutung als potentiell es Medikament. Wegen der sedierenden und schlaffördernden Wirkung stand MORPHEUS, der griechische Gott des Traumes, Pate bei der Namensgebung der neu entdeckten Substanz.

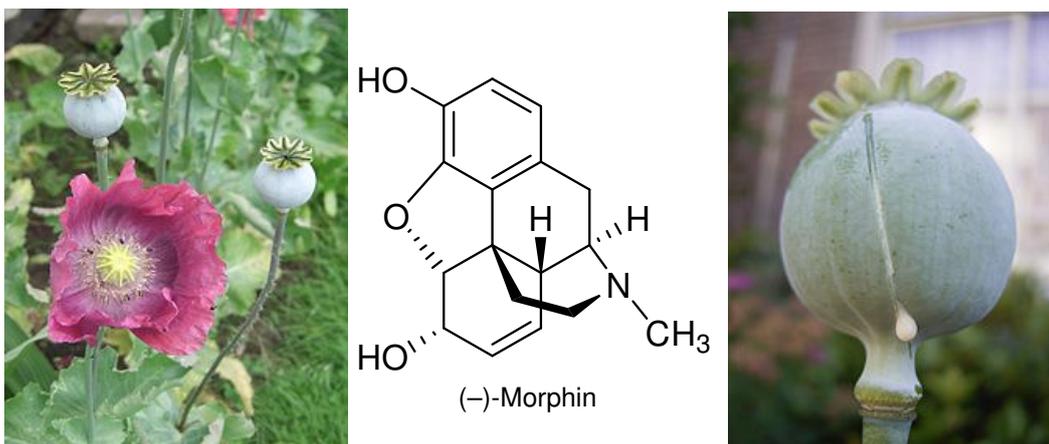


Abbildung 1: *Papaver somniferum* (Schlafmohn) und dessen Hauptalkaloid (-)-Morphin. Angeritzte Porenkapseln (rechts) mit austretendem Milchsaft (Latex) zur Opiumgewinnung. Foto: www.wikipedia.org.

Die Struktur von Morphin wurde im Jahr 1925 durch GULLAND & ROBINSON³ und die Absolutkonfiguration erst 1955, d.h. 150 Jahre nach der Entdeckung, von MACKAY & HODGIN durch Einkristallstrukturanalyse aufgeklärt.⁴ Die erste Totalsynthese gelang 1952

2 Einführung

TSCHUDI & GATES⁵ und lieferte Morphin in einer Ausbeute von 0.0014% über 28 Stufen. Sie gilt heute als Klassiker und Meilenstein der Totalsynthese.⁶

Der Alkaloid-Begriff wurde seit seiner Einführung durch den Hallenser Apotheker MEISSNER⁷ im Jahr 1819 mehrmals geändert und ist beinahe so vielfältig wie die Substanzklasse selbst. Die heute gültige Definition lautet: Die organische Substanz muss pflanzlichen oder tierischen Ursprungs und stickstoffhaltig sein. Je nach Strenge der Definition, werden oft weitere Einschränkungen gemacht:

- Das Alkaloid muss eine gewisse Basizität aufweisen.
- Der Stickstoff muss Teil eines Heterocyclus sein.
- Die Biosynthese muss von einer Aminosäure ausgehen.

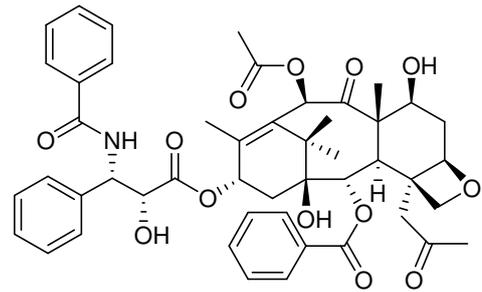
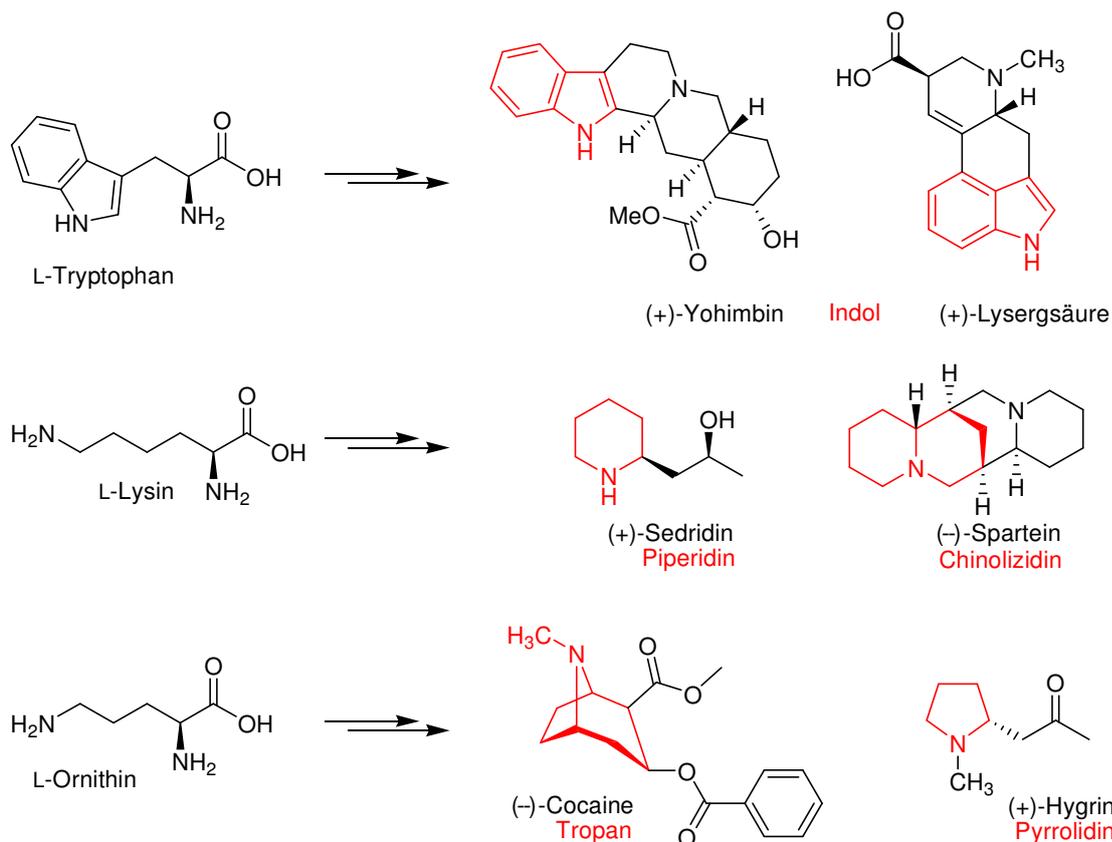


Abbildung 2: Das Diterpen-Alkaloid Taxol (Paclitaxel).

Beispielsweise wird der aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isolierte und in der Chemotherapie weit verbreitete Mitosehemmer Taxol (Abbildung 2) meist als Alkaloid bezeichnet, obwohl die Substanz nicht basisch ist, keinen *N*-Heterocyclus enthält und als Diterpen nicht aus einer Aminosäure biosynthetisiert wird. Von den Alkaloiden streng zu trennen sind jedoch die biogenen Amine, Aminosäuren, Peptide und Nukleinsäuren.

Eine Klassifizierung der Alkaloide untereinander ist aufgrund der Diversität und der unscharfen Definition der Substanzklasse ebenfalls schwierig. Die Einteilung erfolgt entweder nach der Herkunft (z.B. Mutterkorn-, Curare-, Mohnalkaloide), nach der Biogenese, d.h. nach der Aminosäure, aus der das Alkaloid gebildet wird (Schema 1), oder nach dem Stammheterocyclus, der im Alkaloid enthalten ist. Diese Klassifizierungen sind nicht immer vollständig und eindeutig. Das Alkaloid Coniin (Abbildung 3) wird aus Acetateinheiten über den Polyketidweg aufgebaut und kann somit keiner Aminosäure zugeordnet werden. Der Stickstoff im Piperidinring von Coniin wird durch Transaminierung aus L-Alanin eingefügt. Der für ein Alkaloid experimentell untersuchte Biosyntheseweg gilt streng nur für den jeweiligen Organismus. Das Tabak-Alkaloid Nicotin wird aus Nicotinsäure biosynthetisiert. Diese kann je nach Organismus aus Tryptophan, oder Asparaginsäure und Glycerin aufgebaut werden.¹ Die Einteilung nach Stammheterocyclus ist ebenfalls nicht vollständig, da viele Alkaloide, wie z.B. das Ephedra-Alkaloid (–)-Ephedrin, keinen *N*-Heterocyclus besitzen. Diese Verbindungen werden oft unter dem Begriff Protoalkaloide (Alkaloide mit exocyclischem *N*-Atom) zusammengefasst.



Schema 1: Beispiele für die Klassifikation von Alkaloiden nach ihrer Biogenese oder ihrem Stammheterocyclus (rot).^{1,8}

1.2 Piperidin- und Pyridinalkaloide

Die wahrscheinlich bekanntesten Vertreter dieser Klasse sind das in *Nicotiana tabacum* vorkommende, extrem toxische Alkaloid Nicotin und das Hauptalkaloid des Schierlings (*Conium maculatum*) Coniin (Abbildung 3). Die letale Dosis von Nicotin beim Menschen liegt bereits bei ca. 1 mg/kg Körpergewicht. Es besitzt neben der stets viel diskutierten, problembehafteten Verwendung als abhängig machendes Stimulans im Tabakrauch, auch eine gewisse Bedeutung als Insektizid.¹ Das Alkaloid Coniin hat doppelte historische Bedeutung: In der Antike wurde es als grausames Gift eingesetzt, um missliebige Personen zu Tode zu bringen (SOKRATES, 399 v. CHR.). Da Coniin paralyisierend u. a. auf das Atmungszentrum wirkt, erstickt der Vergiftete bei vollem Bewusstsein.⁸ Mit der Darstellung dieser Substanz durch LADENBURG im Jahr 1886 gelang außerdem die erste Totalsynthese eines Alkaloids (Schema 2).⁹ 2-Picolin (**2**) wurde mit Acetaldehyd zu 2-Allylpyridin (**2**) kondensiert. Die Hydrierung von **3** durch naszierenden Wasserstoff lieferte quantitativ das Racemat des

4 Einführung

Alkaloids. Die Spaltung der Enantiomere mittels Kristallisation des L-Tartrates führte schließlich zu (+)-Coniin.

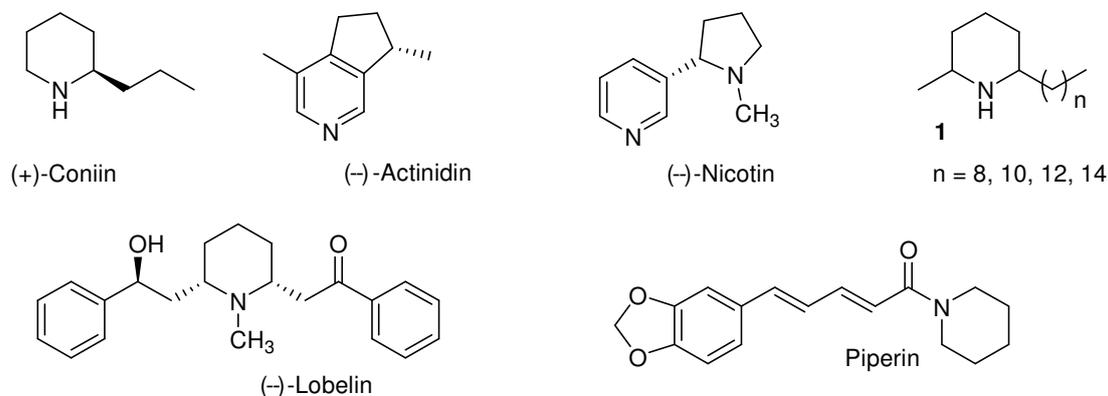
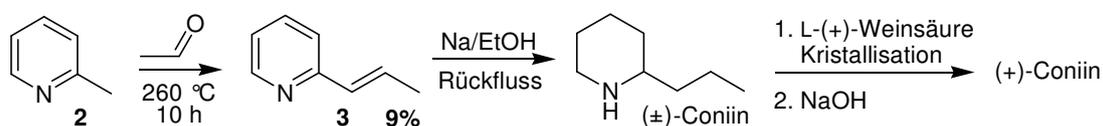


Abbildung 3: Ausgewählte Piperidin- und Pyridinalkaloide.

Das Amid Piperin ist das Hauptalkaloid und zugleich der scharfe Geschmacksstoff des schwarzen Pfeffers (*Piper nigrum*). (-)-Lobelin wird aus dem als Asthmagras oder Brechkraut bezeichneten Indianertabak *Lobelia inflata* isoliert. Es wirkt anregend auf das Atmungszentrum und wurde früher außerdem in Form von Lobelinsulfat zur Nicotinentwöhnung eingesetzt.¹ Piperidin- und Pyridinalkaloide kommen auch in großer Vielfalt in Insekten vor. So werden Alkaloide vom Typ **1** beispielsweise von Feuerameisen (*Solenopsis*) produziert. Diese 2,6-Dialkylpiperidine zeigen meist insektizide, antibakterielle und fungizide Eigenschaften.⁸ Actinidin kommt in den Wehrdrüsen von *Philonthus laminatus* und anderen Kurzflügelkäfern (*Staphylinidae*) vor.¹⁰ Bis auf wenige Ausnahmen lassen sich die Alkaloide mit Pyridin- oder Piperidinstruktur biogenetisch von Lysin und Nicotinsäure ableiten, wobei Nicotinsäure aus Tryptophan biosynthetisiert wird.¹¹



Schema 2: Erste Totalsynthese eines Alkaloids (Coniin) nach LADENBURG.⁹

1.3 Das Piperidinalkaloid Stenusin in den Wehrdrüsen von Käfern der Gattung *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae)

Insekten und insbesondere Land- und Wasserkäfer sind für ihre ausgeprägte Fähigkeit zur „chemischen Kriegsführung“ gegen Angreifer (Vögel, Mäuse, Frösche) und Mikroorganismen bekannt. Hierbei kommt ein beachtliches Portfolio an Naturstoffen u. a. Phenole, Chinone, Carbonsäuren, Terpene, Steroide und Alkaloide zum Einsatz.¹² Der Goldlaufkäfer (*Carabus auratus*) versprüht beispielsweise ein Aerosol aus Methacrylsäure, verunreinigt mit Tiglinsäure (*trans*-2-Methyl-2-butensäure) und einer Paraffinmischung. Die lipophilen Aliphaten erleichtern das Eindringen der beiden Zellgifte in den feindlichen Organismus. Als Meister dieser Disziplin gelten zweifelsohne die Bombardierkäfer (*Brachininae*). Diese beschießen ihre Angreifer mit einem heißen, ätzenden und toxischen Gasmisch aus Benzochinon, Toluchinon, Wasser und Sauerstoff. Dieses wird in speziellen Brennkammern der Pygidialdrüsen durch Mischen von Hydrochinon, einer ca. 28%-igen Wasserstoffperoxidlösung in Gegenwart der Enzyme Katalase und Peroxidase erzeugt und ausgestoßen.^{12,13}



Abbildung 4: *Stenus solutus* (ERICHSON 1840). Foto: Dr. I. Lusebrink, Dissertation, Universität Bayreuth, 2007.

Ein auf den ersten Blick nicht so spektakuläres, aber nicht weniger raffiniertes Abwehr- und Fluchtverhalten haben sich viele Arten der semiaquatischen Kurzflügelkäfer *Stenus* LATREILLE zu eigen gemacht. Von *Stenus*-Käfern sind derzeit 2377 Arten weltweit und ca. 120 Arten in Mitteleuropa bekannt. Die Jagd nach Collembolen, ihrer Hauptnahrung, die sie mit Hilfe eines Klebfangapparates erbeuten, führt viele *Steninae* auch auf die Wasseroberfläche, auf welcher sie sich mit ihren Gliedmaßen nur mühsam fortbewegen können. Bei drohender Gefahr zeigen sie hier eine besondere Form der Fortbewegung, eine

Fluchtreaktion, die schon im Jahr 1905 von BILLARD und BRUYANT¹⁴ entdeckt und später als Entspannungsschwimmen bezeichnet wurde. Dazu geben die Käfer Substanzen aus ihren Pygidialdrüsen ab, die sich mit hoher Geschwindigkeit auf der Wasseroberfläche ausbreiten und monomolekulare Schichten bilden (Spreiten). Durch den so erzeugten Spreitungsdruck sind die *Steninae* in der Lage, sich mit Geschwindigkeiten bis zu 70 cm/s über das Wasser schieben zu lassen. Da durch das Pygidialdrüsensekret die Oberflächenspannung des Wassers drastisch gesenkt wird, versinken potentielle Verfolger in der Wasseroberfläche. Diese beiden Phänomene haben Wissenschaftler schon lange begeistert. Beispielsweise erschien 1964 im populärwissenschaftlichen Magazin *New Scientist* der Artikel „A water beetle sinks its enemies“ (Abbildung 5).¹⁵ Insbesondere H. SCHILDKNECHT war vom Spreitungsschwimmen so fasziniert, dass er es eingehend untersuchte und die chemische Ursache herausfand.¹⁶

When attacked by other surface-skimming predators, *Stenus* secretes a fluid and shoots forward at a speed of about three feet a second. Moreover, its pursuers promptly find themselves in tension-lowered water and tend to sink under their own weight.

Nachdem er seine Hinterleibsspitze kurz ins Wasser getaucht hat, kann er mit einer Geschwindigkeit von 40–75 cm/s über die Wasseroberfläche flitzen, wobei sein bewegliches Abdomen als Steuerruder dient; bei diesem Tempo geht er natürlich, wie ein Wasserskiläufer, nicht mehr unter.

Abbildung 5: Auszüge von Beschreibungen des Spreitungsschwimmens der *Stenus*-Käfer und des Versinkens von potentiellen Verfolgern im populärwissenschaftlichen Magazin *New Scientist* 1964 (links) und der Fachzeitschrift *Angewandte Chemie* 1976 (rechts).

SCHILDKNECHT et al. untersuchten das Pygidialdrüsensekret des Spreitungsschwimmers *Stenus comma* und identifizierten als spreitungsaktive Substanz das Piperidinalkaloid **4**, welches Stenusin genannt wurde. Dieses Alkaloid repräsentiert mit einem Anteil von ca. 80% in einer Mischung mit anderen Terpenen und Terpenoiden (Abbildung 6) die Hauptkomponente des Drüsensekretes. Stenusin besitzt einen deutlich höheren Spreitungsdruck auf der Wasseroberfläche als 1,8-Cineol (Eucalyptol), welches zuerst fälschlicherweise als Antriebssubstanz vermutet wurde.

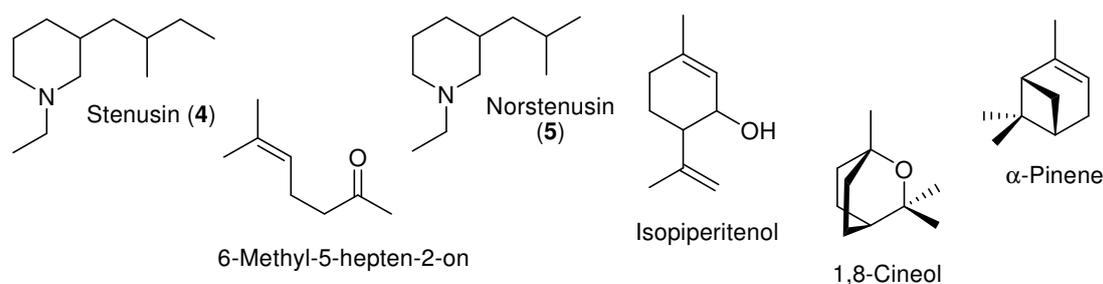


Abbildung 6: Inhaltsstoffe des Pygidialdrüsensekretes von *Stenus comma*.

Die Konfiguration von Stenusin aus *S. comma* wurde 1993 durch die stereoselektive Total-synthese von (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)-**4** durch ENDERS et al. bestimmt.¹⁷ ENDERS verwendete hierfür die von ihm entwickelte SAMP/RAMP-Methode. Entgegen anfänglichen Erwartungen war Stenusin aus *S. comma* keineswegs enantio- und diastereomerenrein, sondern ein Gemisch aus allen 4 Stereoisomeren. Man fand ein Stereoisomerenverhältnis von 43:40:13:4 für (2*S*,3*S*) / (2*S*,3*R*) / (2*R*,3*R*) / (2*R*,3*S*).

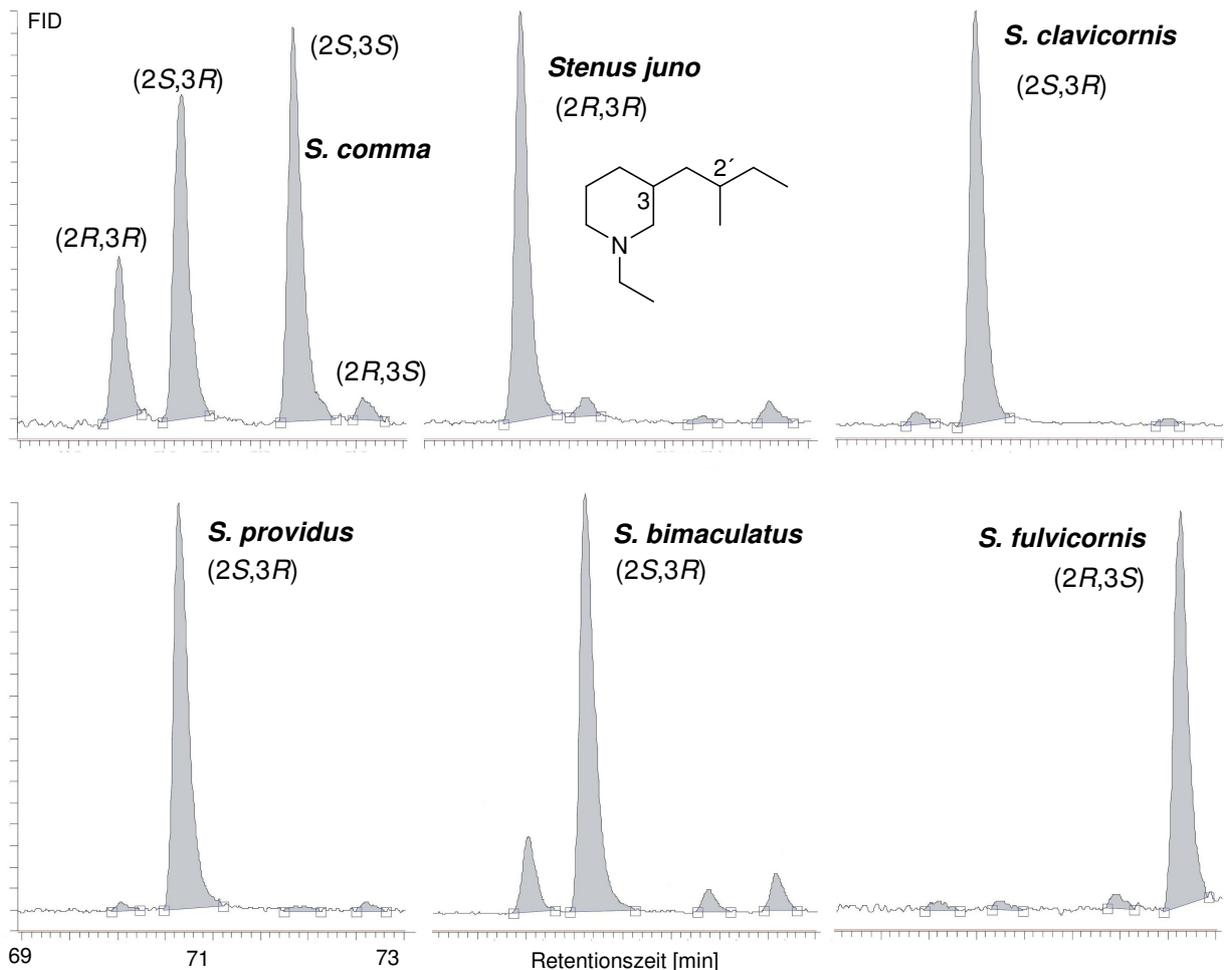
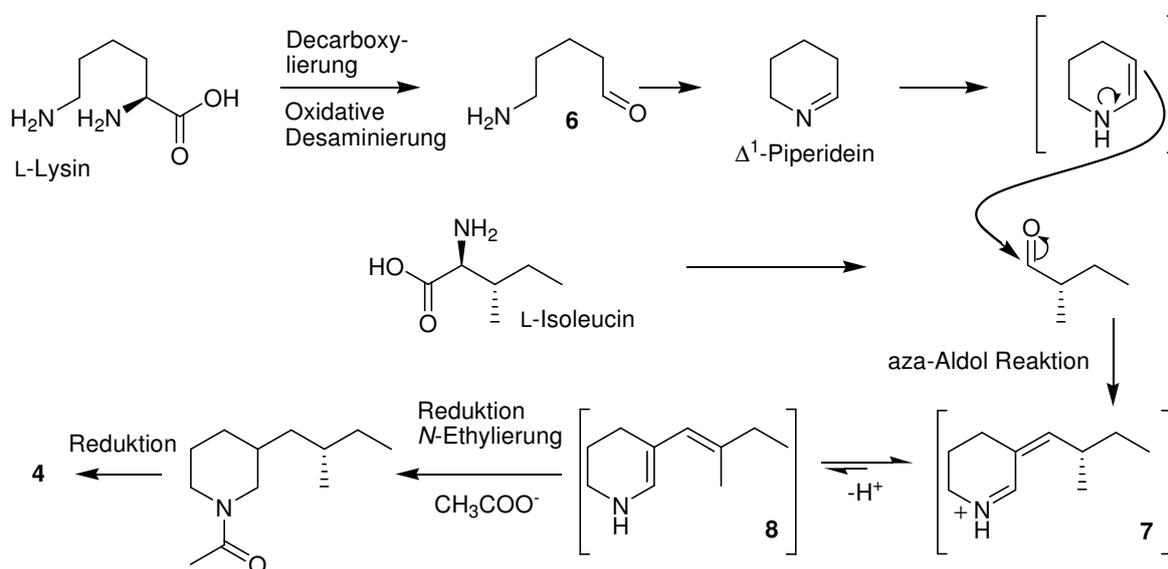


Abbildung 7: Intragenerische Unterschiede einzelner *Stenus*-Arten bezüglich des Stereoisomerenverhältnisses von Stenusin (**4**), bestimmt durch GC an chiraler Phase.

Die Arbeitsgruppen DETTNER und SEIFERT untersuchten die Stenusin-Isomerenverhältnisse weiterer *Steninae* und kamen zu folgendem Ergebnis: Jede einzelne Art zeigt einen charakteristischen „Fingerabdruck“ bezüglich der Isomerenzusammensetzung (Abbildung 7).¹⁸ Ob es sich hierbei um eine unbedeutende „Laune der Natur“ oder ein dem natürlichen Habitat angepasstes Isomerenverhältnis von **4** gegenüber entomopathogenen Mikroorganismen oder Prädatoren handelt, ist derzeit unklar. Eine synthetische Stenusinmischung,

ähnlich der von *S. comma*, zeigte in Agardiffusionstests eine signifikante Wachstumshemmung gegenüber Bakterien (*Serratia entomophila*) und Pilzen (*Beauveria bassiana*).¹⁹

Biosynthetisch wird Stenusin aus L-Lysin, L-Isoleucin und Acetat aufgebaut. Es entstammt somit der klassischen Biosynthese für Piperidinalkaloide und ist nicht, wie anfangs von SCHILDKNECHT et al. vermutet, ein Alkaloid terpenoiden Ursprungs. Dies konnte eindeutig durch Fütterungsexperimente mit deuterierten Aminosäuren an *S. bimaculatus* gezeigt werden.²⁰ Schema 3 zeigt den wahrscheinlichen Biosyntheseweg: Die Decarboxylierung und oxidative Desaminierung von L-Lysin führt über Intermediat **6** zu Δ^1 -Piperidein. Dieses reagiert mit dem analog zu **6** gebildeten Abbauprodukt von L-Isoleucin (*S*)-2-Methylbutanal im Zuge einer aza-Aldol Reaktion zum Kondensationsprodukt **7**, welches sich mit **8** im Gleichgewicht befindet. Dieses Gleichgewicht kann das Auftreten der beiden Konfigurationen in der Seitenkette erklären. Je nachdem wie stark die Gleichgewichtsverteilung ausgeprägt ist und von welcher Seite der enantiotopen Doppelbindungen in Verbindung **8** hydriert (reduziert) wird, kann es zu einer teilweisen Racemisierung oder sogar zur Umkehrung der ursprünglichen Konfiguration in der Seitenkette kommen. Anschließende *N*-Acetylierung mit Acetat, gefolgt von einer erneuten Reduktion, führt zum Piperidinalkaloid Stenusin (**4**).



Schema 3: Wahrscheinlicher Biosyntheseweg für Stenusin (**4**) ausgehend von L-Lysin und L-Isoleucin in *Stenus bimaculatus*.

2. Beschreibung der einzelnen Teilprojekte

Die vorliegende Dissertation umfasst zwei Publikationen und drei Manuskripte, die in Kapitel 7 angefügt sind. In diesem Abschnitt werden die von mir durchgeführten Arbeiten der Teilprojekte nochmals detailliert dargestellt.

2.1 Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese neuer Pyridinalkaloide aus Käfern der Gattung *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae)

Von I. LUSEBRINK (AK DETTNER, Universität Bayreuth) wurden die Pygidialdrüseninhalte vieler *Stenus*-Arten mittels GC-MS untersucht.²¹ Die meisten Arten enthielten Stenusin (**4**) als Hauptkomponente. *S. solutus* und *S. similis* beinhalten jeweils eine Substanz, die nahezu identische EI-MS zeigten, die dem bekannten Alkaloid Actinidin (**11**) zugeordnet wurden. Die Retentionszeiten der beiden Verbindungen unterschieden sich jedoch. Eine Coinjektion der Pygidialdrüsenextrakte von *S. solutus* und *S. similis* und zusätzlich einer natürlichen Quelle von Actinidin (*Philonthus laminatus*) schloss das Vorhandensein von Actinidin aus, da es bei einer dritten Retentionszeit eluierte (Abbildung 8). Demnach schien es naheliegend, dass es sich bei den Verbindungen mit den GC-Retentionszeiten 9.21 und 9.38 min um bislang noch unbekannte Naturstoffe handelte.

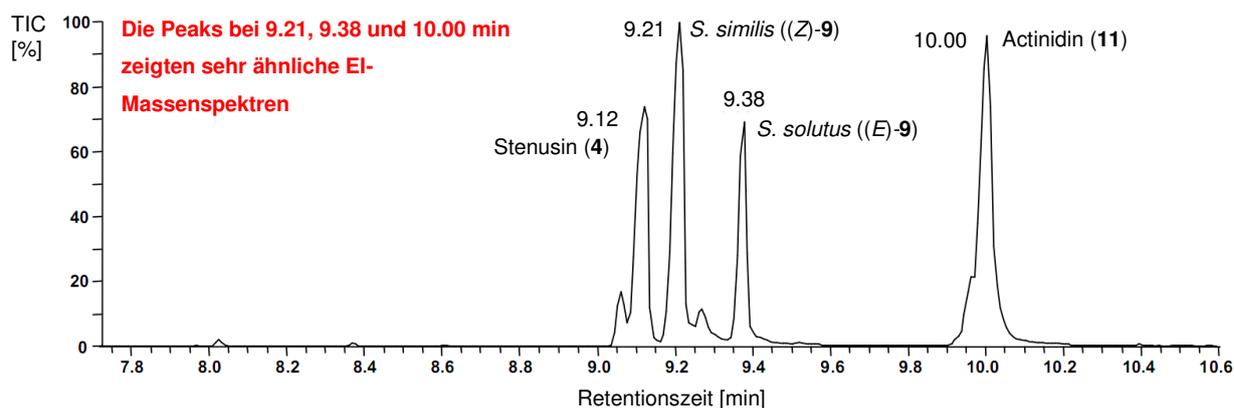


Abbildung 8: Totalionenstrom einer Mischung aus Pygidialdrüsenextrakten von *S. similis*, *S. solutus* und *Philonthus laminatus*.

2.1.1 Strukturaufklärung und Synthese der Pyridinalkaloide **9** und **10**

Mittels LC-ESI-HRMS konnte eine Summenformel für die Verbindung **9** aus *S. solutus* von $C_{10}H_{13}N$ ermittelt werden. Der Rohextrakt der Pygidialdrüsen von 80 *S. solutus* Käfern

10 Beschreibung der einzelnen Teilprojekte

wurde NMR-spektroskopisch durch Einsatz eines Tieftemperatur-Probenkopfes vermessen (AK SCHNEIDER, MPI Jena). Es wurden ^1H - (Abbildung 9), $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-, HSQC- und HMBC-Datensätze erhalten. Eine direkte Messung der ^{13}C -Resonanzen gelang aufgrund der extrem niedrigen Substanzmenge nicht. Die Auswertung aller NMR-Daten führte zur Struktur (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin ((*E*)-**9**). Da sich die Zuordnung der (*E*)-Doppelbindungs-konfiguration bei (*E*)-**9** nur auf den Vergleich der erhaltenen ^{13}C -Signale von C-1', C-3' und C-5' mit den berechneten Werten (ACD/CNMR Version 4.07) von (*E*)- und (*Z*)-Verbindung stützte, sollten (*E*)- und (*Z*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin dargestellt werden.

Weiterhin wurde in den Pygidialdrüsenextrakten von *S. solutus*, *S. cincinneloides*, *S. binotatus* und *S. pubescens* eine Substanz mit Hilfe von GC-MS (t_{R} 8.41 min) detektiert, welche einen um 14 Masseneinheiten kleineren Molekülionenpeak $[\text{M}]^+ = 133$ gegenüber (*E*)-**9** zeigte. Die Auswertung des EI-Massenspektrums führte zum Strukturvorschlag **10** (Abbildung 10).

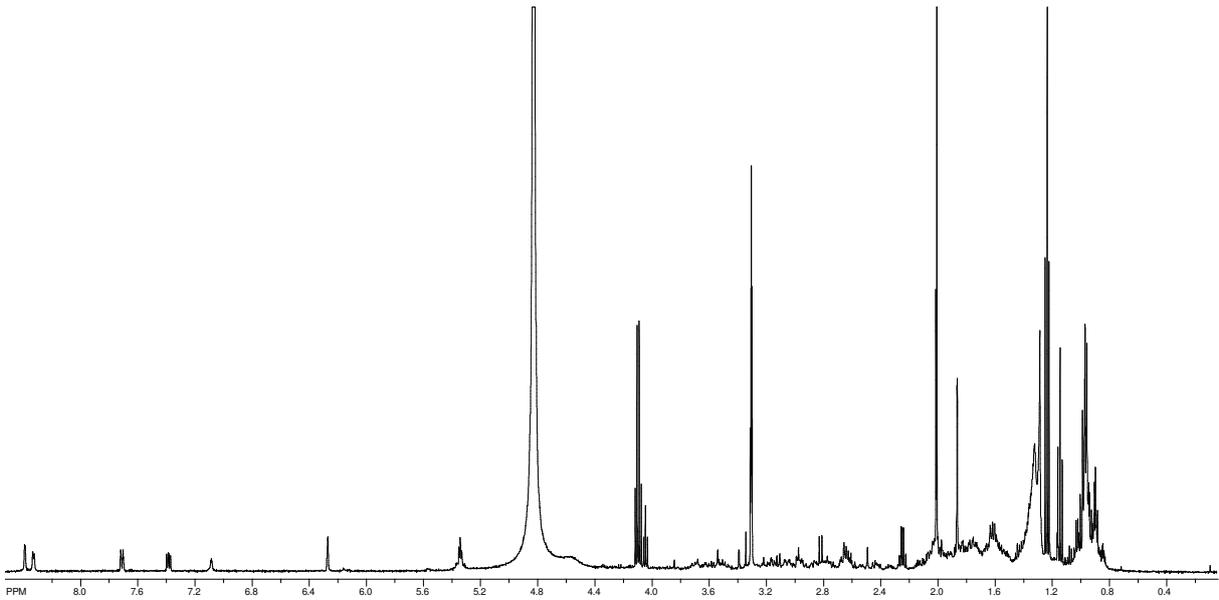


Abbildung 9: ^1H -NMR-Spektrum des Pygidialdrüsenextraktes von 80 *S. solutus* Käfern (gemessen bei 500 MHz an einem Tieftemperatur-Probenkopf).

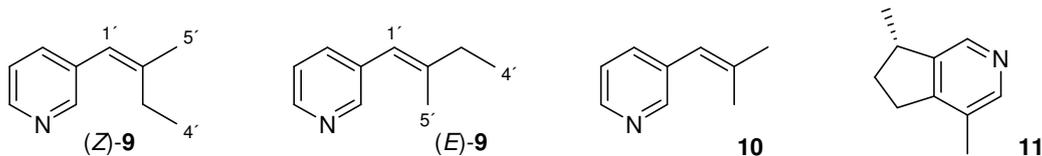
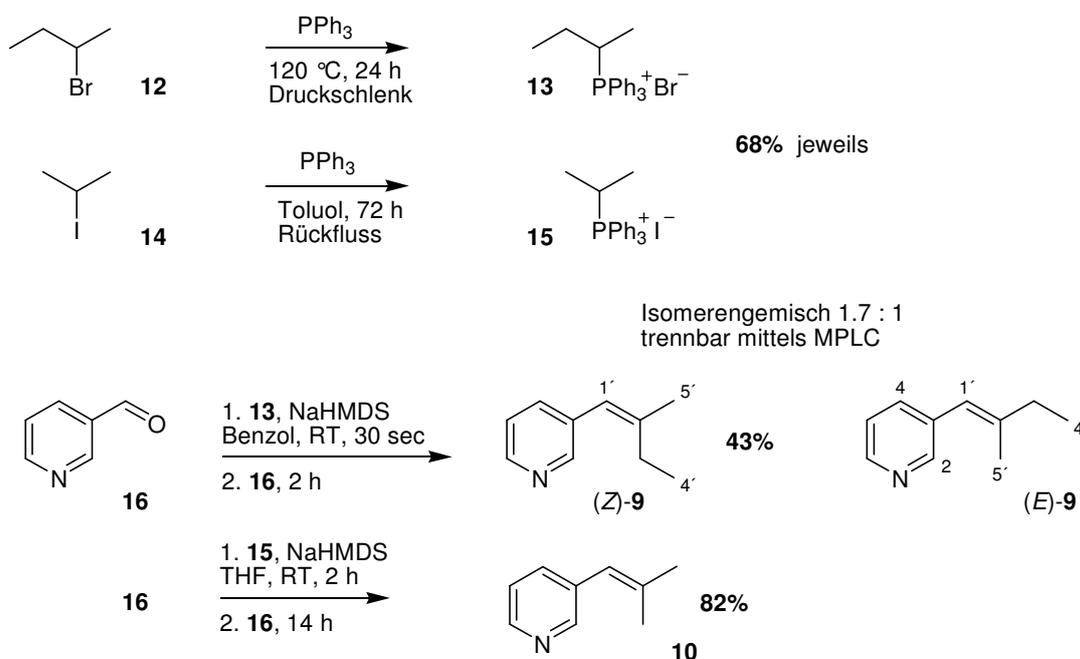


Abbildung 10: Strukturen von (*Z*)- und (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**9**), 3-(1-Isobutenyl)-pyridin (**10**) und Actinidin (**11**).

Die Pyridinalkaloide (*Z*)- und (*E*)-**9** wurden als Isomerengemisch mit leichtem Überschuss an (*Z*)-**9** (1.7:1) durch WITTIG-Olefinierung unter salzfreien Bedingungen dargestellt (Schema 4). Hierzu wurde 2-Brombutan (**12**) nach Literaturbedingungen²² in das Phosphoniumsalz **13** überführt, dieses anschließend mit Natriumhexamethyldisilazid deprotoniert und mit Nicotinaldehyd (**16**) nach modifizierter Literaturvorschrift²³ umgesetzt. Eine Trennung der Isomeren war mittels MPLC auf Normalphase möglich. Gemäß dem Mechanismus²⁴ der salzfreien WITTIG-Reaktion verlief die Reaktion (*Z*)-selektiv, wenn auch nur mit geringem Überschuss. Dies war jedoch zu erwarten, da gute Stereoselektivitäten nur bei der Umsetzung von Yliden vom Typ $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{-CH}^-\text{R}$ mit gesättigten Aldehyden (R-CHO , $\text{R} = \text{Alkyl}$) zu erwarten sind.²⁴ Die Konfiguration der entstandenen Doppelbindung wurde zweifelsfrei durch NOE-Differenzspektroskopie bestätigt. Einstrahlung auf die olefinische Methylgruppe in (*Z*)-**9** zeigte einen NOE-Effekt mit dem Proton ($\text{H-1}'$) der Seitenkette. Bei Einstrahlung auf das Signal der 5'-Methylgruppe von (*E*)-**9** wurden Korrelationen mit H-2 und H-4 am Pyridinring festgestellt. Die eher suboptimale Ausbeute der Umsetzung ist höchstwahrscheinlich auf konkurrierende β -H-Eliminierung bei der Deprotonierung von **13** zurückzuführen, zumal immer ein gewisser Anteil an neu entstandenem Triphenylphosphan in der Reaktionsmischung nachgewiesen wurde. Die Darstellung von **10** verlief analog aus Nicotinaldehyd (**16**) und 2-Iodpropan (**14**).



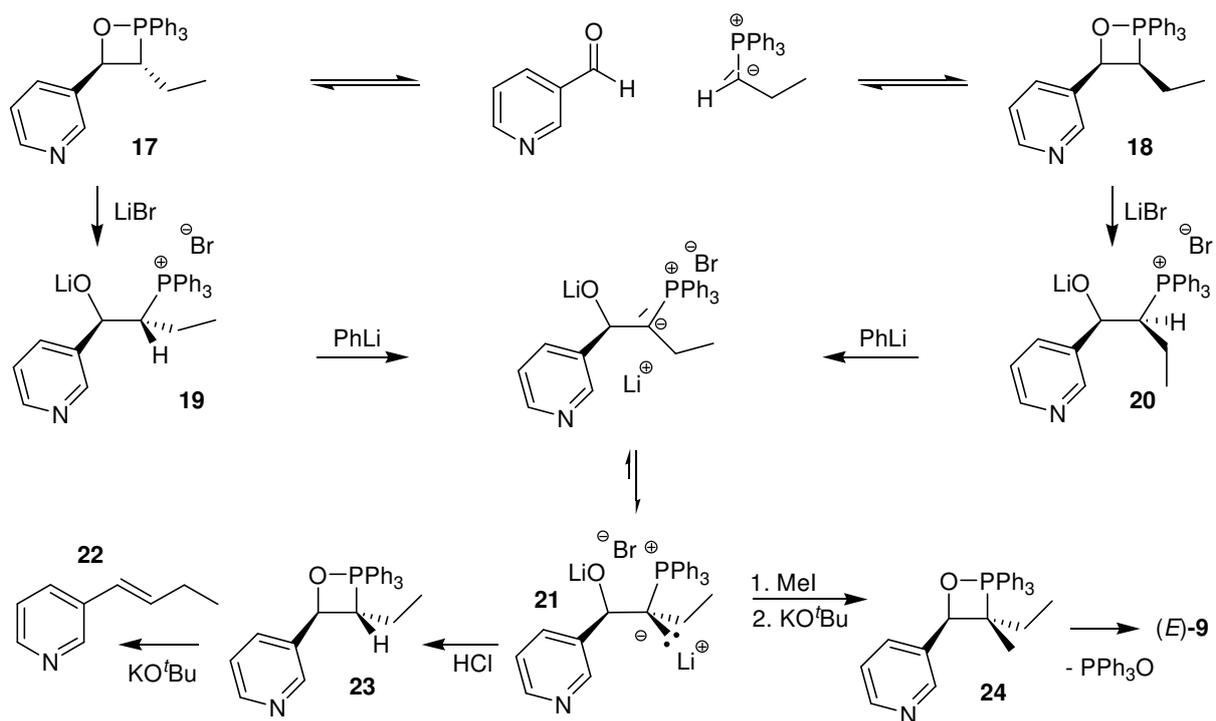
Schema 4: Synthese der Pyridinalkaloide **9** als Isomerengemisch und **10** mittels WITTIG-Olefinierung.

Ein Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren, die aus der Mischung der Pygidialdrüsenextrakte von *S. similis*, *S. solutus* und *Philonthus laminatus* erhalten wurden, mit denen von synthetischem (*Z*)-**9** und (*E*)-**9** bewies die Strukturen von (*Z*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin ($t_R = 9.21$ min) aus *S. similis* und (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin ($t_R = 9.38$ min) aus *S. solutus*. Die Retentionszeiten ($t_R = 8.41$ min) und die Massenspektren von Verbindung **10** aus den vier *Stenus* Spezies und der synthetisierten Probe waren identisch. Damit wurde auch das Vorkommen von 3-(1-Isobutenyl)-pyridin in den Wehrdrüsensekreten von *S. solutus*, *S. cicindeloides*, *S. binotatus* und *S. pubescens* bewiesen.

2.1.2 Untersuchungen zur stereoselektiven Darstellung der Pyridinalkaloide (*Z*)- und (*E*)-**9**

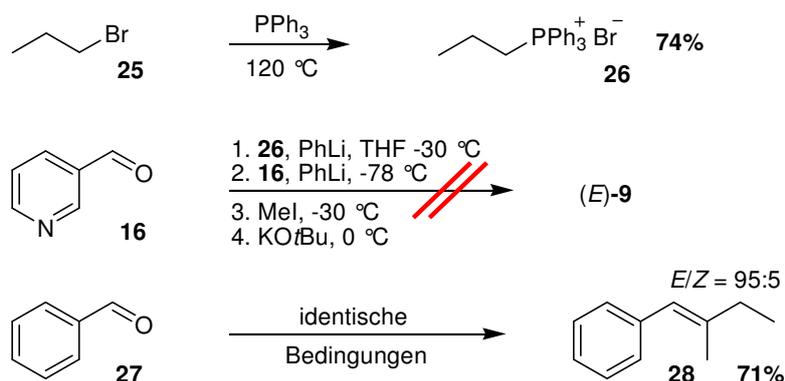
Um die für biologische Tests erforderliche aufwendige chromatographische Isomerentrennung zu vermeiden, wurde versucht, die Verbindungen (*Z*)- und (*E*)-**9** stereoselektiv darzustellen.

Die SCHLOSSER-Variante bietet die Möglichkeit, *trans*-selektive WITTIG-Reaktionen durchzuführen.²⁵ Schema 5 zeigt den mechanistischen Verlauf dieser Reaktion,^{24,25c} projiziert auf die geplante Darstellung von (*E*)-**9**. Im Gegensatz zur salzfreien Variante, bei der das kinetisch gebildete *cis*-Oxaphosphetan **18** unter Cycloreversion rasch zum Olefin zerfällt, werden hier die Oxaphosphetane **17** und **18** durch beabsichtigten Lithiumsalz-Überschuss zunächst in die Lithiobetaine **19** und **20** überführt. Deprotonierung führt nach Einstellung des Gleichgewichts zum Oxidoylid **21**. Die Zugabe eines Elektrophils ($\text{CH}_3\text{-I}$, oder HCl) führt nach Verdrängung der Lithiumkationen durch Kalium-*tert*-butanolat zu den Oxaphosphetanen **23** bzw. **24**, welche nun diastereomerenrein vorliegen. Aus diesen bilden sich schließlich unter Verlust von Triphenylphosphanoxid die *E*-konfigurierten Olefine (*E*)-**9** bzw. **22**.



Schema 5: Erwünschte, jedoch nicht abgelaufene Reaktion der *trans*-selektiven SCHLOSSER-Variante^{24,25} projiziert auf die Darstellung von (*E*)-9.

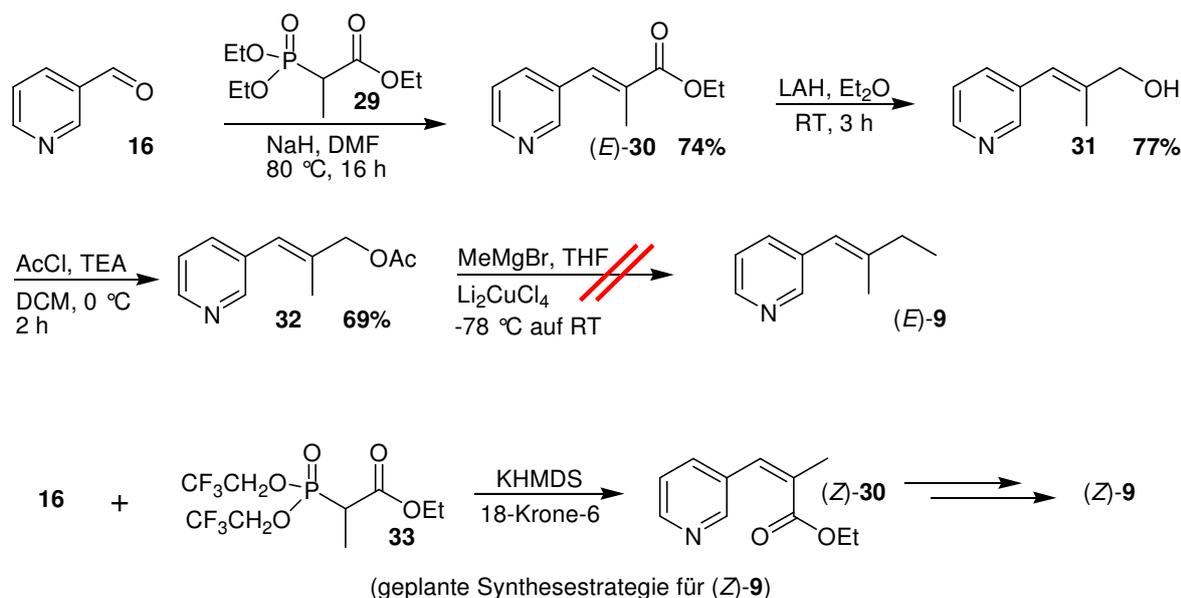
Das benötigte Phosphoniumsalz **26** wurde durch Erhitzen von Triphenylphosphan in 1-Brompropan (**25**) erhalten (Schema 6). Verbindung **26** wurde anschließend mit frisch hergestelltem Phenyllithium,²⁶ das außerdem ein Äquivalent LiBr enthielt, in THF bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ deprotoniert. Für den weiteren Reaktionsverlauf wurden exakt die Literaturbedingungen^{25b} des Phenylanalogons **28** verwendet. Auch nach mehreren Versuchen konnten keinerlei Spuren des gewünschten Produktes nachgewiesen werden. Es bildete sich stets ein teerartiges harziges Vielstoffgemisch, was auf komplette Zersetzung der Reaktanden hindeutete. Der Heteroaromat **16** scheint demnach mit den benötigten Reaktionsbedingungen nicht kompatibel. Als Ursache wäre eine 1,2-Addition von Phenyllithium an den Pyridinstickstoff oder eine Deprotonierung der Lithiobetaine **19** und **20** in Benzylstellung, anstelle der gewünschten 2'-Position, denkbar.



Schema 6: Versuchte stereoselektive Darstellung von *(E)*-**9** und Literatursynthese^{25b} für Phenylanalogon **28** nach SCHLOSSER.

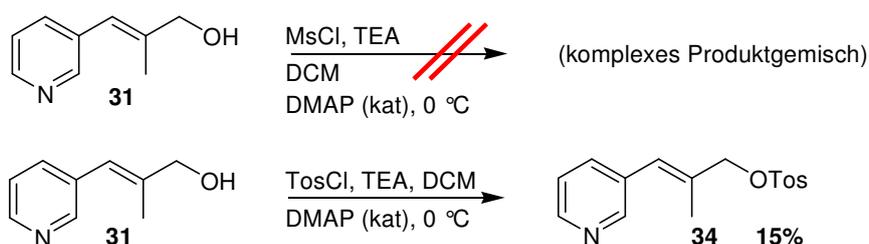
Aufgrund des Scheiterns der obigen Reaktion wurde eine neue Synthesestrategie zur selektiven Darstellung von *(E)*- und *(Z)*-**9** entwickelt (Schema 7). Ziel war es, zunächst die beiden α,β -ungesättigten Ester *(Z)*- und *(E)*-**30** durch *E*-selektive HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion²⁷ und deren *Z*-selektive STILL-GENNARI-Variante²⁸ selektiv darzustellen. Die Pyridinalkaloide sollten durch Reduktion zum Alkohol **31**, Veresterung zu **32** und anschließende SCHLOSSER-FOUQUET-Kupplung²⁹ mit Methylmagnesiumbromid synthetisiert werden.

Hierzu wurde Triethyl-2-phosphonopropionat (**29**) mit Aldehyd **16** zum gewünschten Ester *(E)*-**30** isomerenrein umgesetzt. Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid³⁰ ergab in guter Ausbeute den Methallylalkohol **31**. Dieser wurde anschließend mit Acetylchlorid zu **32** in akzeptabler Ausbeute verestert,³¹ um eine Abgangsgruppe für die anschließende Kupplung zu generieren. Leider konnte bei der Kupplung mit Methylmagnesiumbromid auch nach mehreren Versuchen kein gewünschtes Produkt detektiert werden. Es wurden stets Zersetzungsprodukte und nicht abreagiertes Edukt festgestellt.



Schema 7: Untersuchungen zur Synthese von (*E*)- und (*Z*)-**9** durch HWE / STILL-GENNARI-Reaktion und anschließende SCHLOSSER-FOUQUET Kupplung.

Da Verbindung **32** nicht mit MeMgBr reagierte, wurde versucht, eine bessere Abgangsgruppe zu installieren (Schema 8). Sehr gut geeignet für diese durch Lithiumtetrachlorocuprat katalysierten Kupplungen, sind *p*-Toluolsulfonate (ROTos).^{29a} Bedauerlicherweise entstand dies nur als Produktgemisch, welches geschätzt ca. 15% an **34** enthielt. Die versuchte Darstellung des entsprechenden Methansulfonats führte zu kompletter Zersetzung des Ausgangsmaterials.

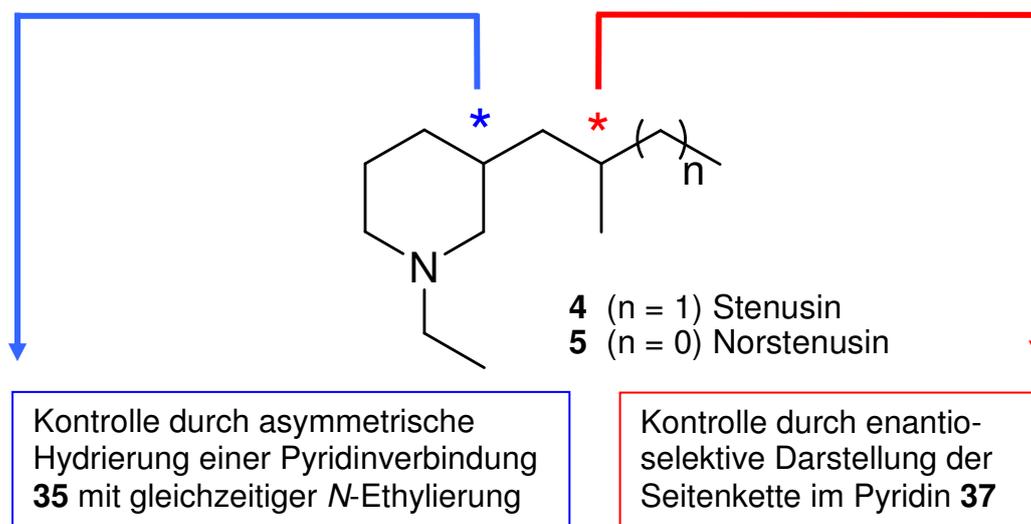


Schema 8: Versuchte Umwandlung der Hydroxy-Funktion von **31** in eine Sulfonat-Abgangsgruppe.

In Anbetracht dieser Resultate und der Tatsache, dass sich die gewünschten Naturstoffe durch Isomerentrennung in einer Einstufen-Synthese darstellen ließen, wurden keine weiteren Optimierungsversuche zur SCHLOSSER-FOUQUET-Kupplung unternommen und somit diese Syntheseroute aufgegeben.

2.2 Synthese aller Stenusin- und Norstenusin-Isomere durch asymmetrische Hydrierung von Pyridinen

Ziel war es, eine Synthesestrategie zu entwickeln, welche es erlaubt, alle Stereoisomere der Piperidinalkaloide Stenusin (**4**) und Norstenusin (**5**), die in den Pygidialdrüsen von *Stenus*-Käfern vorkommen, selektiv darzustellen. Die beiden zu kontrollierenden Stereozentren sind in Schema 9 gezeigt. Das Stereozentrum im Piperidinring sollte durch asymmetrische Hydrierung der Pyridinverbindung **35** generiert werden, welche die chirale Seitenkette bereits enthält (Schema 10).



Schema 9: Strategie für die Kontrolle der beiden Stereozentren von Stenusin (**4**).

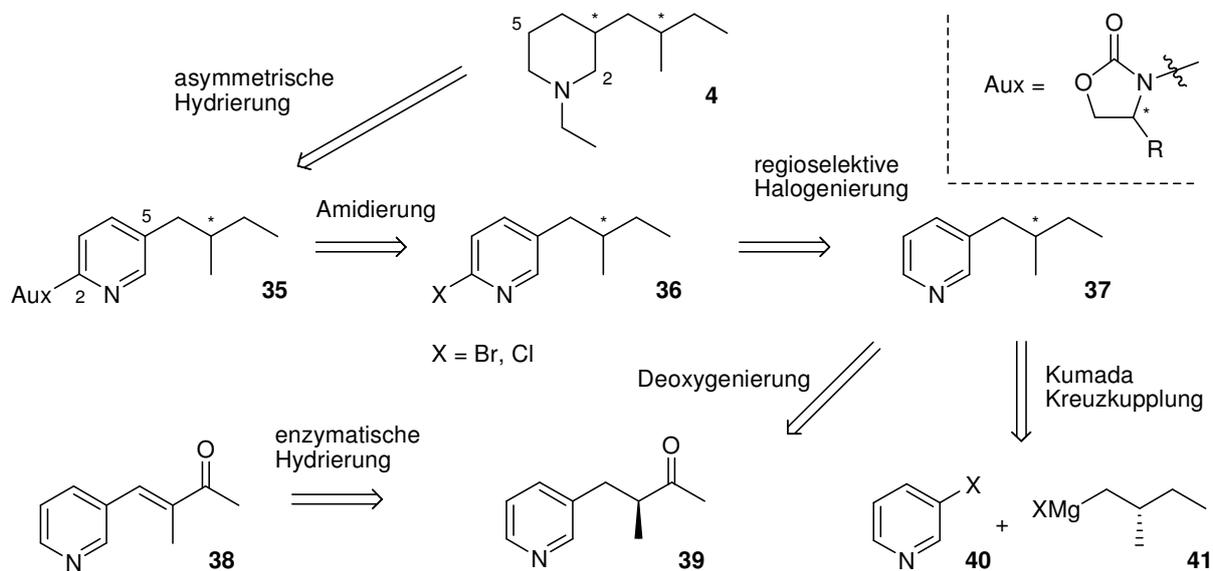
2.2.1 Syntheseplanung

Obwohl die asymmetrische Hydrierung von Ketonen, Olefinen und Iminen seit langer Zeit gängige synthetische Praxis ist, existiert derzeit kein katalytisches Verfahren, das die asymmetrische Hydrierung eines 3-alkylsubstituierten Pyridins erlaubt.³² Deshalb wurde eine Methode gewählt, welche auf einem chiralen Auxiliar beruht und sich für dieses Problem bereits bewährt hat.³³ Auxiliarbasierende Methoden besitzen zwar den gravierenden Nachteil, dass sie die chirale Information – und damit das Auxiliar selbst – in stöchiometrischer Menge benötigen, jedoch sind die erzielten Stereoselektivitäten meist hoch. Weiterhin sind chirale Auxiliare meist einfach und preiswert (z.B. aus Aminosäuren) darstellbar und lassen sich häufig nach der Reaktion unverändert rückisolieren.

Schema 10 zeigt den ausgearbeiteten Lösungsansatz: Der Schlüsselschritt ist die auxiliär-vermittelte asymmetrische Hydrierung der Pyridinverbindung **35**, welche in 2-Position ein

EVANS-Auxiliar (Oxazolidinon) trägt. Dieses Verfahren wurde 2004 von GLORIUS et al. entwickelt.³³ Schema 11 zeigt den Mechanismus: Da Piperidine als Katalysatorgift wirken, werden diese Hydrierungen im sauren Milieu durchgeführt. Die Protonierung erzeugt eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Pyridinium- und dem Oxazolidinonteil, was zur koplanaren Konformation **42** führt. Da eine der beiden diastereotopen π -Flächen nun durch die Isopropylgruppe abgeschirmt ist, erfolgt die Übertragung des Wasserstoffs von der gegenüberliegenden Seite zum protonierten Aminoal **43**. Nach Eliminierung des Auxiliars bildet sich das Iminiumsalz **44**, welches mit dem Enaminiumsalz **45** im Gleichgewicht steht. Dadurch wird eines der potentiell vier neuen Stereozentren racemisiert. Weitere Hydrierung führt zum Endprodukt **46**. In Gegenwart von Acetaldehyd liefert die Reaktion direkt das *N*-ethylierte Piperidin.³⁴ Dies kann mechanistisch als reduktive Aminierung verstanden werden.

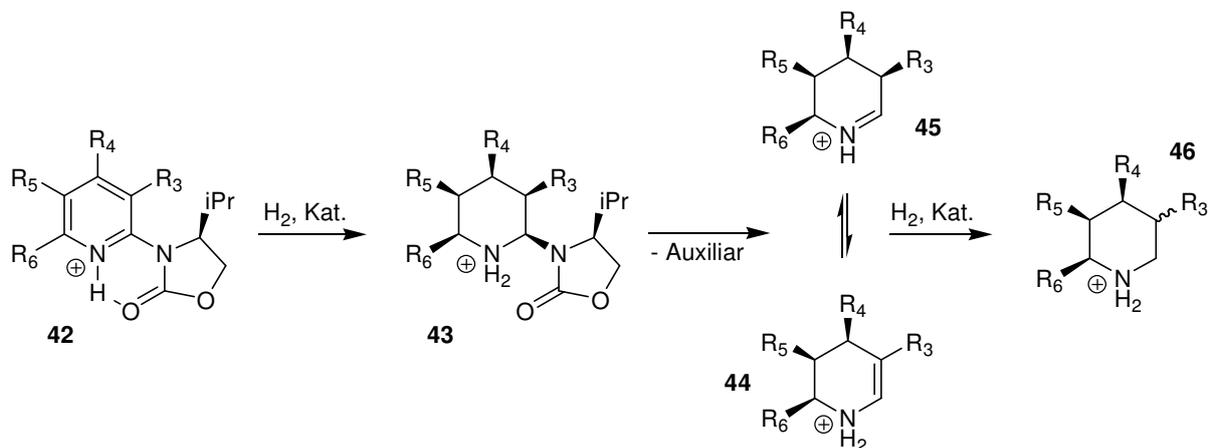
Das Auxiliar wird an die halogenierte Pyridinverbindung **36** mittels einer weiterentwickelten GOLDBERG-Reaktion durch Einsatz eines Katalysatorsystems aus CuI und 1,2-Diaminligand und geeigneter Base angeknüpft (Schema 10).³⁵ Aus Schema 11 ist ersichtlich, dass sich das Auxiliar in *para*-Position zur 2-Methylbutyl-Seitenkette befinden muss, was zusätzlich eine regioselektive Halogenierung der chiralen Pyridinverbindung **37** erfordert. Eine komplexierende Superbase aus zwei Äquivalenten Butyllithium und einem Äquivalent Dimethylaminoethanol (BuLi-LiDMAE) ist in der Lage, dieses zu gewährleisten.³⁶



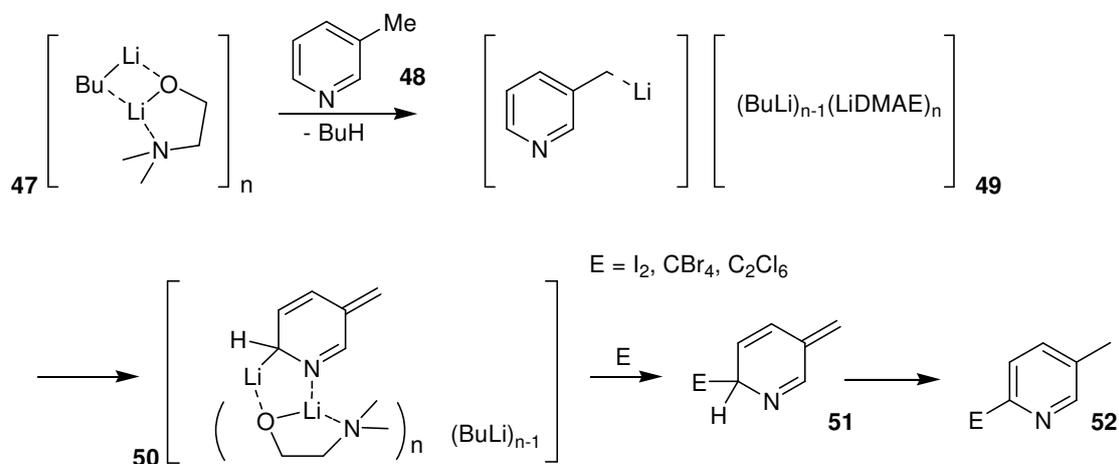
Schema 10: Retrosynthesestrategie für die gezielte Synthese aller Isomeren von Stenusin (**4**).

Schema 12 zeigt einen plausiblen Mechanismus zur regioselektiven Halogenierung am Beispiel von 3-Picolin (**48**): Zunächst erfolgt die Deprotonierung in Benzylstellung. Die

lithiierte Zwischenstufe **49** lagert sich nun, bedingt durch den komplexierenden Effekt des LiDMAE-Teils, zur elektronisch günstigeren Spezies **50** um. Diese Spezies kann nun mit einem geeigneten Elektrophil abgefangen werden, was zur Zwischenstufe **51** führt, welche rasch und spontan zu **52** rearomatisiert.



Schema 11: Mechanismus der asymmetrischen Hydrierung nach Glorius et al.³³



Schema 12: Mechanismus der regioselektiven Halogenierung mittels BuLi-LiDMAE.^{36a}

Die Synthese der beiden chiralen Pyridine (*S*)- und (*R*)-**37** erfolgt auf unterschiedlichen Wegen (Schema 10). Verbindung (*S*)-**37** kann sehr einfach durch KUMADA-Kreuzkupplung aus einem 3-Halogenpyridin (**40**) und der GRIGNARD-Verbindung **41** erhalten werden,³⁷ die leicht aus kommerziell erhältlichem Gärungsamylalkohol (*S*)-2-Methyl-1-butanol dargestellt werden kann. Da dessen Enantiomer nicht dem chiralen Pool entnommen werden kann und daher nicht in ökonomisch vertretbarer Weise erhältlich ist, muss für die Darstellung von (*R*)-

37 ein anderer Weg eingeschlagen werden. Durch eine chemoenzymatische Synthesestrategie ist Pyridin (*R*)-**37** aus dem Enon **38** zugänglich. Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) vermag die Doppelbindung von **38** asymmetrisch zu hydrieren.³⁸ Dies führt zum chiralen Keton **39**, das nach einer geeigneten Deoxygenierung die gewünschte Verbindung (*R*)-**37** liefern sollte.

2.2.2 Synthese von (2*S*,3*R*)-, (2*S*,3*S*)-Stenusin und (*S*)-, (*R*)-Norstenusin

Die Nickel-katalysierte Kreuzkupplung von 3-Brompyridin (**40**) mit der chiralen GRIGNARD-Verbindung **41** nach KUMADA konnte problemlos nach Literaturvorschrift^{37b} reproduziert werden (Schema 13). Die anschließende regioselektive Halogenierung bedurfte jedoch intensiver Optimierung bis akzeptable und reproduzierbare Ausbeuten erreicht werden konnten. Die Literatursausbeuten, welche auf dem Einsatz von Tetrabrommethan in THF beruhen,^{36a,c} konnten auch nach mehreren Versuchen nicht annähernd erreicht werden. Es bildeten sich hochviskose teerartige Gemische, welche sich nur mit Mühe aufreinigen ließen. Die Zugabe des Elektrophils in *n*-Hexan verbesserte deutlich die erzielte Ausbeute. Dipolare Anteile im Lösungsmittel verschlechtern daher die Ausbeute, möglicherweise durch Destabilisierung des Komplexes **50** (Schema 12). Dies erklärt auch eine weitere Steigerung der Ausbeute, wenn anstelle von technischem Hexan, HPLC-Hexan (beide getrocknet über Kalium) verwendet wurde. Eine möglichst langsame Zugabe des Elektrophils mittels Spritzenpumpe bei hoher Verdünnung und tiefer Temperatur erhöhte ebenfalls die Ausbeute.

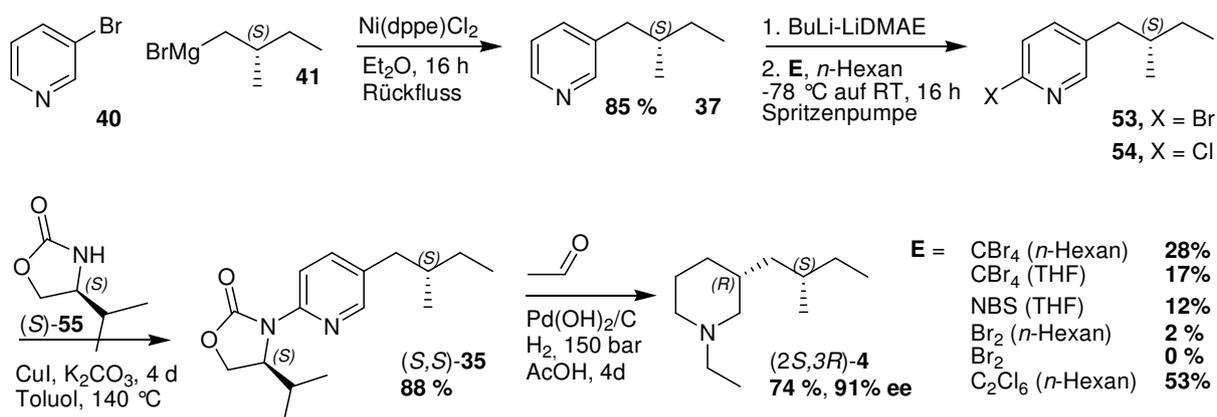
Da alle Bromelektrophile auch nach erfolgter Optimierung noch inakzeptable Ausbeuten lieferten, wurde Hexachlorethan verwendet, was eine signifikante Verbesserung auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit darstellte. Eine Abschwächung der Reaktivität bei der nachfolgenden Amidierung wurde dabei in Kauf genommen. Diese Umsetzung konnte sehr nahe an den Literaturbedingungen³⁵ erfolgen. Während **53** bei 110 °C nach 16 h vollständig umgesetzt war, verlief die Reaktion mit **54** nur sehr langsam. Eine höhere Reaktionstemperatur und gleichzeitige Anhebung der Katalysatorbeladung auf 15 Mol-% konnten dies ausgleichen. Nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen konnte ein vollständiger Umsatz bei sehr guter Ausbeute erreicht werden.

Die anschließende Hydrierung zu den gewünschten Naturstoffen benötigte ebenfalls eine sehr lange Reaktionszeit. Als entscheidende Faktoren erwiesen sich hier die Reaktionstemperatur und der Wasserstoffdruck. Bei Drücken unter 150 bar verlief die Hydrierung sehr schleppend und zeigte Nebenprodukte im GC, während unter 30 °C die

20 Beschreibung der einzelnen Teilprojekte

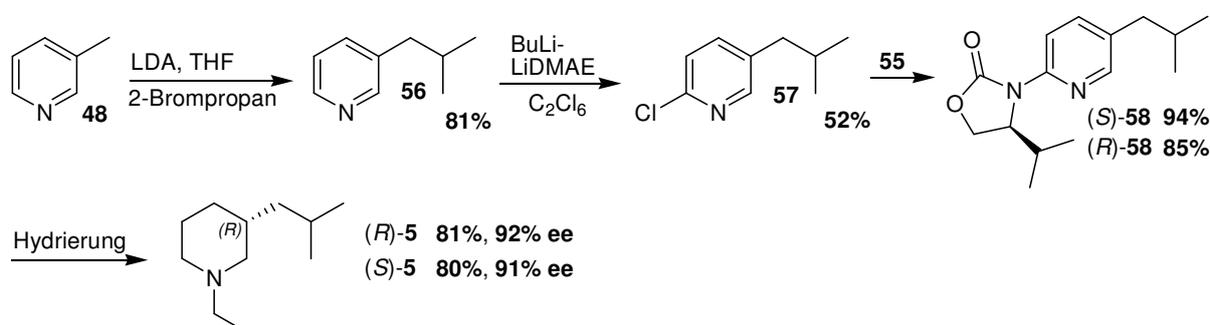
Reaktion sehr langsam, aber dafür mit leicht gesteigerter Stereoselektivität, ablief. Bei optimalen Bedingungen wurde ebenfalls nach 4 Tagen ein vollständiger Umsatz erreicht.

(2*S*,3*R*)-Stenusin konnte mit 74%-iger Ausbeute nach Chromatographie isoliert werden. Die Gesamtausbeute belief sich auf 29% über 4 Stufen. Die Hydrierung verlief mit guter Diastereoselektivität von 91% de. (2*S*,3*S*)-**4** wurde ausgehend von (*S*,*R*)-**35** in analoger Weise mit 30%-iger Gesamtausbeute und 90% de erhalten.



Schema 13: Synthese von (2*S*,3*R*)-Stenusin in 4 Stufen mit 29% Gesamtausbeute und 91% de.

Die Enantiomere von Norstenusin (**5**) wurden analog aus 3-Isobutylpyridin (**56**) dargestellt (Schema 14): Verbindung **56** wurde durch benzyliche Alkylierung von 3-Picolin (**48**) mit 2-Brompropan erhalten.³⁴ Die erzielten Enantiomerenüberschüsse verhielten sich mit 92% ee ((*R*)-**5**) und 91% ee ((*S*)-**5**) ähnlich den Diastereomerenüberschüssen von Stenusin. Dies zeigt, dass das chirale Zentrum der Seitenkette in **35** nur einen sehr geringen Einfluss auf die Stereoselektivität der Hydrierung nimmt.

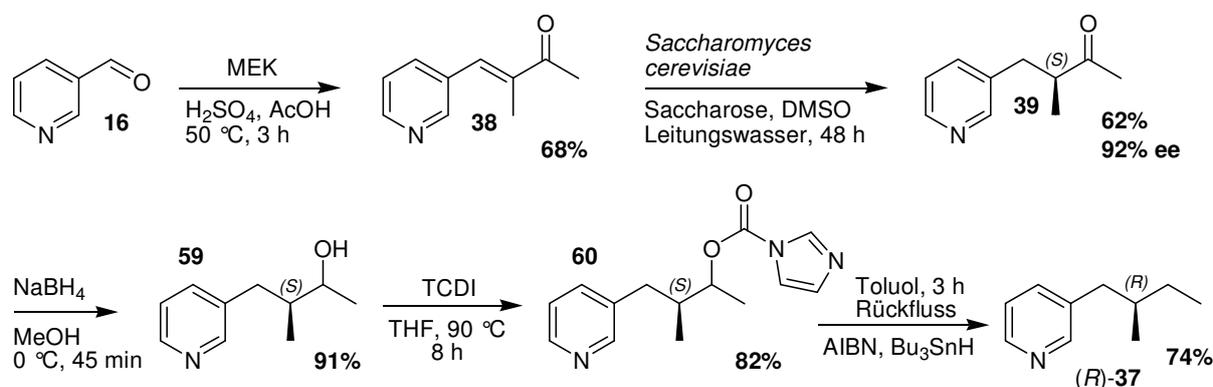


Schema 14: Synthese der beiden Norstenusin-Enantiomeren.

2.2.3 Synthese von (2*R*,3*R*)- und (2*R*,3*S*)-Stenusin

Für die Darstellung der Pyridinverbindung (*R*)-**37**, die für die Synthese von (2*R*,3*R*)- und (2*R*,3*S*)-**4** analog Schema 13 benötigt wird, musste zunächst das Ausgangsmaterial **38** bereitgestellt werden (Schema 15). Die Synthese von **38** erfolgte durch Aldolkondensation von Nicotinaldehyd (**16**) mit 2-Butanon (MEK). Die Synthesevorschrift von KAWAI et al.³⁸ erwies sich jedoch als ungeeignet für Umsetzungen im größeren Maßstab. Das Syntheseprotokoll sieht nach Beendigung der Reaktion vor, das gesamte Reaktionsmedium (Eisessig und H₂SO₄) zu neutralisieren und mit Ethylacetat zu extrahieren. Bei 0.2 mol Ansatzgröße müssen demnach 280 ml Eisessig und 33 ml H₂SO₄ mit ca. 1 Liter NaOH (20%-ig) neutralisiert werden. Je nach Geschwindigkeit und Kühlung kann dies zu einem enormen Temperaturanstieg führen, was die Aufarbeitung enorm langwierig und mitunter gefährlich gestalten kann.

Neben diesen eher praktischen Gesichtspunkten stellte sich noch ein viel schwerwiegenderes Problem heraus, welches in Abbildung 11 gezeigt ist. Neben dem gewünschten Produkt **38** (12.8 min) wurde auch ein kleiner Anteil (3-5%) des Strukturisomers **61** (13.4 min) erhalten. Da diese Verbindung bei GC-Reaktionskontrollen nicht nachweisbar war, musste deren Existenz mit den Bedingungen bei der Aufarbeitung zusammenhängen. Durch die stark basische Umgebung und hohe Temperatur reagiert wahrscheinlich restliches Edukt ebenfalls im Zuge einer Aldolreaktion über das terminale Enolat zum Isomer **61** (Schema 16). Die Bildung auch von geringen Mengen an **61** ist verheerend, da dieses Isomer auf keiner Stufe in der gesamten Syntheseroute präparativ abgetrennt werden kann und zwangsläufig die Endprodukte mit *N*-Ethyl-3-(*n*-pentyl)-piperidin (**62**) verunreinigt. Das unerwünschte Isomer **67** zeigte im EI-MS einen Ethylverlust [M-29]⁺ durch α -Spaltung an der Carbonylfunktion und konnte auch als Minderkomponente im ¹H- und ¹³C-NMR eindeutig nachgewiesen werden.



Schema 15: Synthese der Pyridinverbindung (*R*)-**37**

Die Vorgehensweise bei der Aufarbeitung von **38** wurde daher abgeändert. Lediglich die Schwefelsäure wurde mit Natriumcarbonat vorsichtig neutralisiert. Anschließend wurde zwischen MTBE und Wasser verteilt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Eisessig zunächst am Rotationsverdampfer und anschließend durch Vakuumdestillation mittels VIGREUX-Kolonnen entfernt. Durch dieses Verfahren konnte die Bildung von **61** vollständig unterdrückt werden.

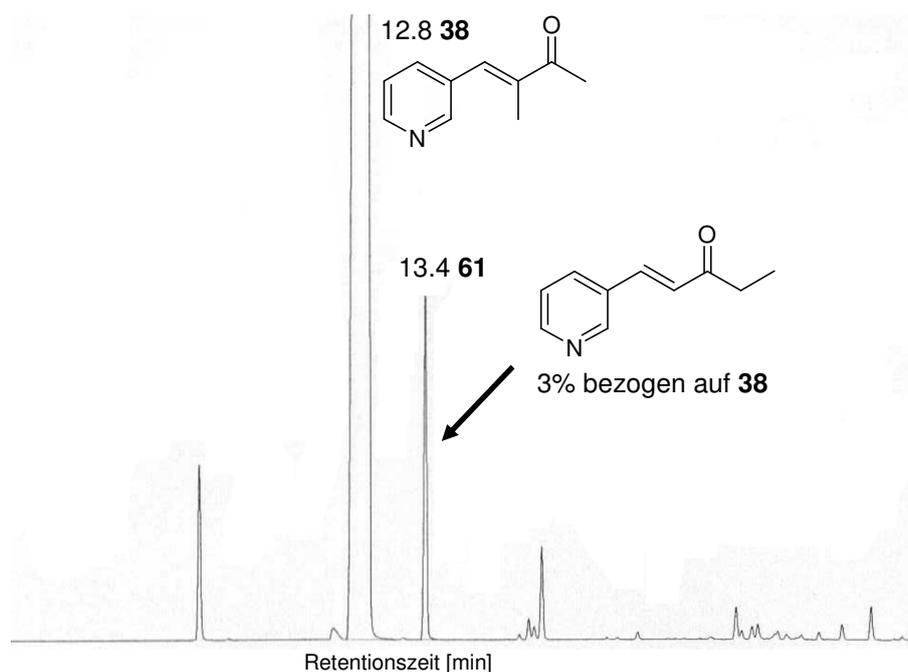
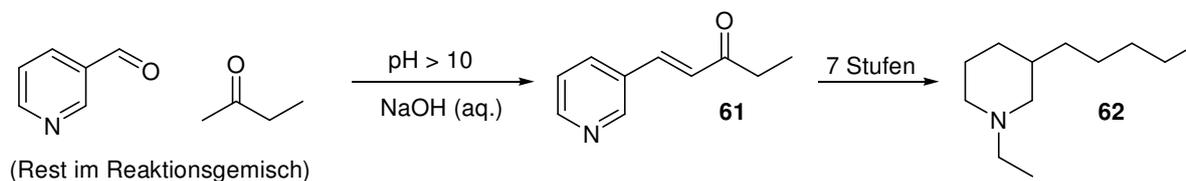


Abbildung 11: GC des Rohproduktes von **38** nach stark basischer Aufarbeitung.



Schema 16: Wahrscheinliche Entstehung des Strukturisomers **61** bei der Aufarbeitung von Verbindung **38** und Bildung von *N*-Ethyl-3-(*n*-pentyl)-piperidin (**62**).

Die enzymatische Reduktion von **38** zum chiralen Keton **39** (Schema 15) wurde zunächst exakt nach Literaturvorschrift³⁸ durchgeführt. Die Autoren publizierten für **39** unter Verwendung von Trockenhefe einen Enantiomerenüberschuss $>95\%$ ee bei 76% Ausbeute. Bei Verwendung von Trockenhefe Typ II (YSC-2, SIGMA) konnte allerdings weder die

Ausbeute noch der ee-Wert reproduziert werden. Durch Einsatz von frischer Hefe („Wieninger Hefe“, REWE) wurde ein noch schlechterer Überschuss von 81% ee erzielt (Tabelle 1 Eintrag 2). Die ee-Werte wurden mittels chiraler GC durch Integration von basisliniengetrennten Signalen bestimmt. Die GC-Peaks der beiden Enantiomeren von **39** wurden mit Hilfe des authentischen Racemates zugeordnet. Hierzu wurde **38** bei Normaldruck mit Pd/C zu (*R,S*)-**39** hydriert. Da Enantiomerenüberschüsse unter 90% ee bereits als suboptimal einzustufen sind, wurde versucht, sie durch Optimierung der Reaktionsbedingungen zu verbessern.

Die ersten stereoselektiven Umsetzungen von organischen Substraten mit Bäckerhefe³⁹ wurden bereits 1918^{39a} beschrieben. Allerdings besitzen diese Reaktionen auch heute noch einen sehr stark empirischen Charakter, so dass es schwierig ist, genaue Vorhersagen zu treffen.^{39a}

	Hefe / mmol 38 [g] ^a	T [°C]	t [h]	Medium	Umsatz für 39 [%] ^b	ee [%]	Ausbeute [%] ^c (39)
1 ^d	10	35	16	H ₂ O	n.b.	88	52
2 ^e	20	35	16	H ₂ O	96	81	n.b.
3 ^f	1.8	30	24	H ₂ O/DMSO 5:1	65	92	n.b.
4 ^f	1.8	30	24	H ₂ O/DMSO 5:1 + Saccharose	99	92	n.b.
5 ^f	1.8	30	24	H ₂ O/MTBE 1:1	25	96	n.b.
6 ^f	1.8	30	24	H ₂ O/DMSO 1:1 + Saccharose	8	n.b.	n.b.
7 ^f	1.8	30	24	H ₂ O/DMSO 1:5 + Saccharose	0	n.b.	n.b.
8 ^f	1.9	RT	48	H ₂ O/DMSO 5:1 + Saccharose	99	92	62

^a Verhältnis von eingesetzter Hefe zu Substrat [g/mmol]

^b relativer Umsatz für **39** bezogen auf Ausgangsmaterial bestimmt durch GC

^c isolierte Ausbeute nach Chromatographie

^d original Syntheseprotokoll nach KAWAI et al³⁸

^e Verwendung von frischer Bäckerhefe

^f Verwendung von Trockenhefe Typ II (YSC-2 SIGMA)

Tabelle 1: Verschiedene Bedingungen für die enzymatische Reduktion von **38** durch *Saccharomyces cerevisiae*.

Der Umsatz und die Stereoselektivität hängen dabei sehr stark vom umgebenden Medium, dem Stoffwechselzustand der Hefe und möglichen zugefügten Additiven ab. Der Zusatz von Glucose oder Saccharose verstärkt häufig die Aktivität der beteiligten Enzyme, was zu einer Umsatzsteigerung^{39b} führt. Entgegen der chemischen Intuition ist es auch möglich, organische Lösungsmittel wie Ether, Kohlenwasserstoffe und Ester mit einem nur geringen Wasseranteil zu verwenden, was die Substratlöslichkeit erhöht und häufig den ee-Wert beeinflusst oder sogar umkehrt.^{39d,e} Jedoch leidet die Umsatzgeschwindigkeit meist darunter, was wiederum die Menge einzusetzender Hefe erhöht. Häufig muss hier eine Abwägung zwischen Stereo-

selektivität und präparativem Nutzen getroffen werden. Sehr vielversprechend ist oft der Einsatz eines mit Wasser mischbaren org. Lösungsmittels, lediglich als Co-Solvens.^{39f}

Im Falle der Hydrierung von **38** führte eine geringere Menge an Hefe und der Zusatz von DMSO zum Reaktionsmedium zu einer Verbesserung des Enantiomerenüberschusses bei allerdings schlechtem Umsatz (Tabelle 1. Eintrag 3). Der Zusatz von Saccharose konnte dies durch verstärkte Enzymaktivität ausgleichen, wodurch die effektiv benötigte Menge an Hefe für eine vollständige Umsetzung um den Faktor 5 reduziert werden konnte. Der erzielte Enantiomerenüberschuss blieb hierdurch unverändert (Eintrag 4). In Übereinstimmung mit der Literatur^{39d} konnte der ee-Wert für **39** durch Erhöhung des Anteils an organischem Lösungsmittel noch weiter gesteigert werden, allerdings brach dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit dramatisch ein (Einträge 5–7). Für eine Umsetzung im präparativen Maßstab (26 mmol) schienen deshalb die Bedingungen unter Eintrag 4 am sinnvollsten. Um eine zu starke Schaumbildung bei der Reaktion zu vermeiden, wurde lediglich die Temperatur leicht abgesenkt (Eintrag 8).

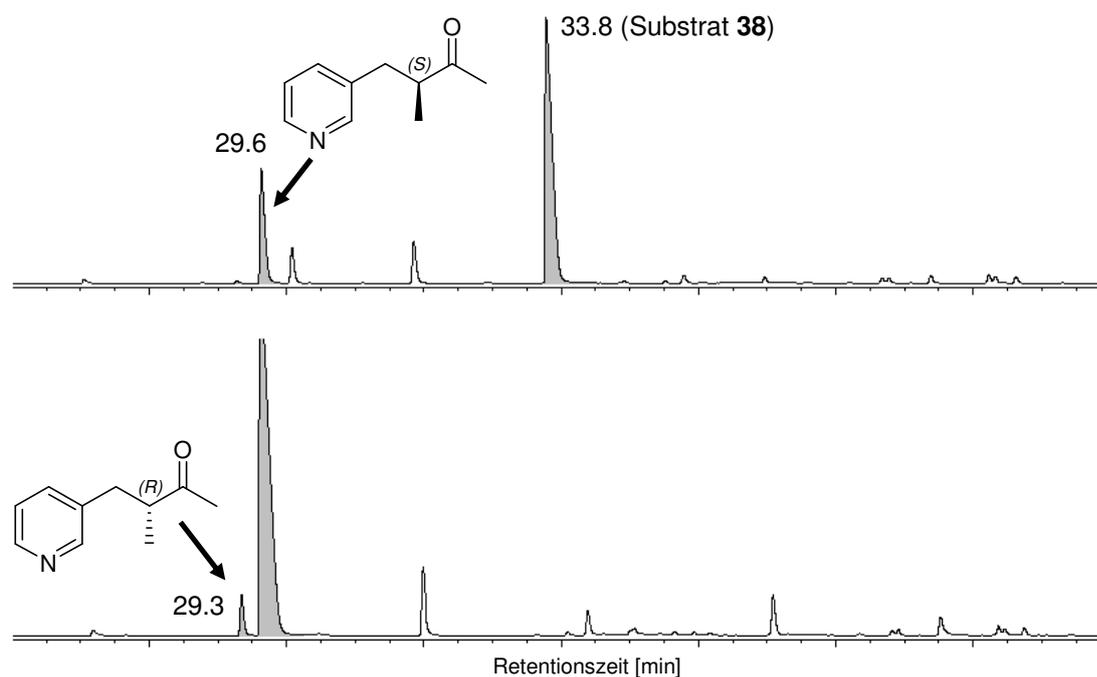


Abbildung 12: Gaschromatogramme an chiraler Phase der Experimente 5 (oben) und 4 (unten) aus Tabelle 1.

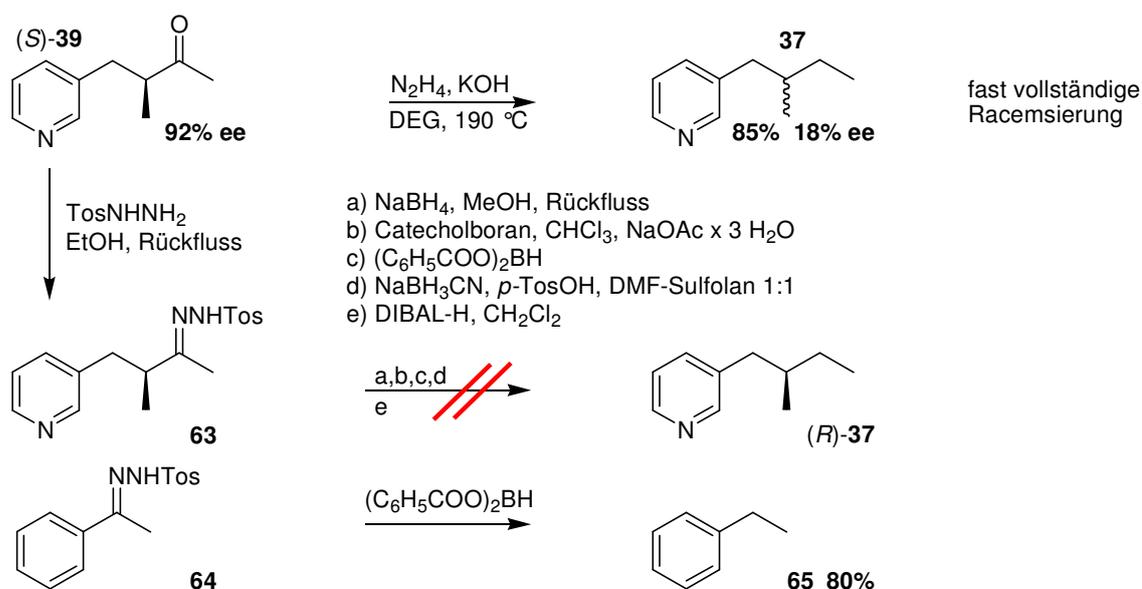
Das so erhaltene chirale Keton **39** wurde nach Literaturvorschrift⁴⁰ zu den diastereomeren Alkoholen **59** reduziert, mit Thiocarbonyldiimidazol (TCDI) zu den Thiocarbamaten **60** derivatisiert und sofort nach BARTON-MCCOMBIE deoxygeniert.⁴¹ (*R*)-**37** wurde mit 92% ee bei 23% Gesamtausbeute über 5 Stufen erhalten (Schema 15). Diese Verbindung wurde

analog Schema 13 zu den Stenusin-Isomeren (2*R*,3*R*)- (90% de) und (2*R*,3*S*)-**4** (93% de) in insgesamt 8 Stufen weiter umgesetzt. Die Gesamtausbeute betrug jeweils 8%.

2.2.4 Untersuchungen zur Deoxygenierung von Keton **39**

Für die Reduktion eines Ketons zum entsprechenden Alkan gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten.⁴² Als direkte Methoden kommen z.B. die CLEMMENSEN-⁴³ oder die WOLFF-KISHNER-Reduktion⁴⁴ in Frage. Diese klassischen Reaktionen erfordern jedoch sehr lange Reaktionszeiten unter stark sauren oder alkalischen Bedingungen, was die Anwesenheit der meisten funktionellen Gruppen ausschließt. Sie liefern direkt das gewünschte Alkan, wobei bei der klassischen Variante nach WOLFF-KISHNER das entsprechende Hydrazone noch intermediär isoliert wurde. Bei den indirekten Methoden wird die Carbonylfunktion zunächst zum Alkohol reduziert, in eine geeignete Abgangsgruppe (z.B. Sulfonsäureester, Halogenid, Xanthogenat) umgewandelt und anschließend mittels einer Hydridquelle (z.B. LiAlH₄, LiEt₃BH, Bu₃SnH) substituiert.

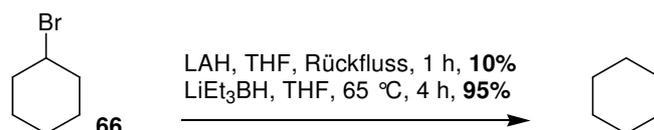
Trotz Bedenken aufgrund der drastischen Reaktionsbedingungen wurde zunächst die HUANG MINLON-Variante, eine gängige Modifikation der WOLFF-KISHNER-Reaktion, erprobt (Schema 17). Das Pyridin **37** konnte exakt nach Literaturbedingungen⁴⁵ in sehr guter Ausbeute isoliert werden, jedoch wurde das Stereozentrum vermutlich durch Enolatbildung bei drastisch alkalischen Bedingungen fast vollständig racemisiert.



Schema 17: Versuche zur Deoxygenierung von Keton **39** (direkte Methoden).

In Fällen, bei denen obige Bedingungen zu drastisch sind, hat es sich bewährt, zunächst das entsprechende Tosylhydrazon **63** zu erzeugen und dieses mit Boranen oder Metallhydriden umzusetzen.⁴⁶ Diese Methode liefert meist sehr schonend, in hohen Ausbeuten, wenn auch nicht mit hoher Atomeffizienz, das entsprechende Alkan. Trotz des Einsatzes vieler Reagenzien und unterschiedlicher Reaktionsbedingungen konnten bei der Umsetzung von **63** keinerlei Spuren des gewünschten Produktes (*R*)-**37** festgestellt werden. Da weder die eher klassische Variante mit NaBH₄ in siedendem Methanol,^{46a} Catecholboran,^{46c} Bis(benzoyloxy)boran,^{46d} Natriumcyanoborhydrid^{46b} und die sehr schonende Methode mit Diisobutylaluminiumhydrid^{46e} bei 0 °C, zum Erfolg führten, wurde um einen systematisch begangenen Fehler auszuschließen, das Tosylhydrazon **64** umgesetzt. In diesem Fall konnte Ethylbenzol (**65**) in guter Ausbeute isoliert werden. Daraufhin wurden die Versuche zur direkten Deoxygenierung nicht weiter verfolgt.

Nun wurde versucht, die Carbonylfunktion von **39** in eine Abgangsgruppe zu überführen und diese mit komplexen Metallhydriden zu substituieren (Schema 19). Als Hydridquelle kann hier Lithiumaluminiumhydrid (LAH) verwendet werden.⁴⁷ Die Ausbeuten sind allerdings meist mäßig aufgrund von Nebenreaktionen durch dieses aggressive Reagenz. Als ausgezeichnete Alternative bietet sich Lithiumtriethylborhydrid (Super-Hydride[®]) an. Dieses Hydrid substituiert prim. und sek. Halogenide und Sulfonsäureester bereits bei Raumtemperatur in quantitativen Ausbeuten.⁴⁸ Selbst Substrate wie Cyclohexylbromid (**66**), die nach S_N2 nur noch überaus schlecht angreifbar sind,²⁴ können damit noch substituiert werden (Schema 18).

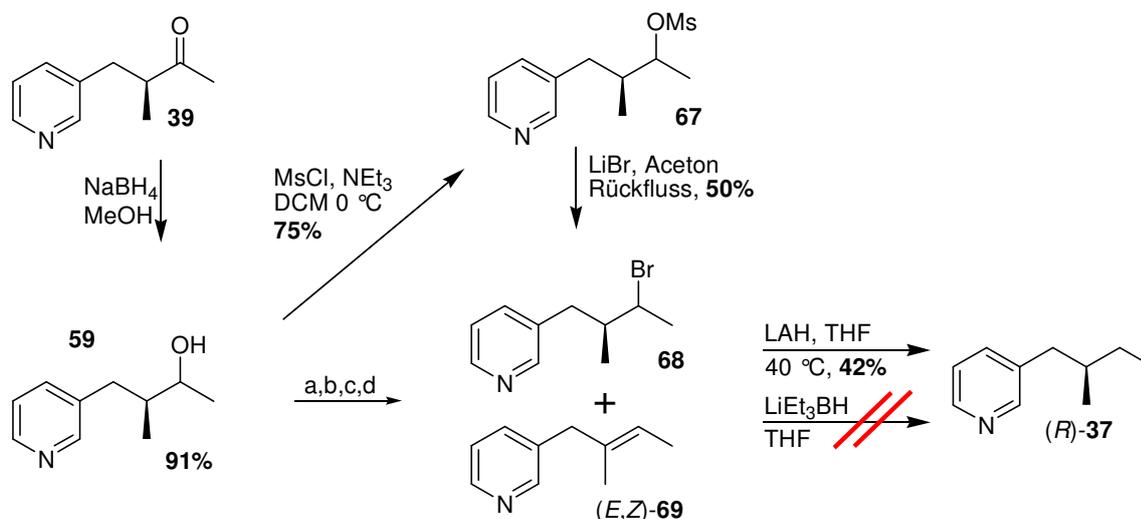


Schema 18: Vergleich der Reaktivitäten von LAH und LiEt₃BH hinsichtlich der nukleophilen Substitution von **66**.⁴⁸

Nach Reduktion von Keton **39** zum Alkohol **59** wurde dieser in das entsprechende Bromid **68** überführt. Bedauerlicherweise gelang dies bei Verwendung geläufiger direkter Methoden⁴⁹ nur in sehr mäßigen Ausbeuten. Die Bildung beachtlicher Mengen an Olefin **69** durch Eliminierung als Konkurrenzreaktion konnte nicht verhindert werden. Auch ein Umweg über das Mesylat **67** und anschließende nukleophile Substitution brachte keine Verbesserung der Ausbeute. Bereits die meist quantitativ verlaufende Reaktion zur Bildung von **67** nach Literaturbedingungen⁵⁰ gelang nur in durchschnittlicher Ausbeute. Da weder Ausgangsmaterial noch Nebenprodukte im Rohprodukt von **67** nachweisbar waren, ist dies auf

undefiniert verlaufende Zersetzungsreaktionen zurückzuführen. Bei der anschließenden Substitution mit Lithiumbromid⁵¹ entstand erneut eine größere Menge an Eliminierungsprodukt **69**.

Die angestrebte Dehalogenierung von Bromid **68** mittels Super-Hydride[®] erwies sich als nicht durchführbar aufgrund kompletter Zersetzung des Ausgangsmaterials. Die Zugabe von LiEt₃BH zu **68** führte sofort zu einer deutlichen Schwarzfärbung des Reaktionsgemisches. Im DC waren nur noch hochpolare Zersetzungsprodukte sichtbar. Dies kann nur auf eine Unverträglichkeit des Reagenzes mit Pyridinverbindungen zurückgeführt werden, da andere potentiell störende Funktionalitäten im Molekül nicht vorhanden sind. Die Dehalogenierung durch das weniger selektive Lithiumaluminiumhydrid gelang, jedoch nur in sehr durchschnittlicher Ausbeute. Die sehr langsame Reaktionsgeschwindigkeit machte eine Reaktionsdauer von immerhin 16 h bei leicht erhöhter Temperatur notwendig. Dadurch zersetzte sich auch hier ein großer Teil von **68**. Da demnach die gesamte Deoxygenierung über zwei Stufen nur in völlig inakzeptabler Ausbeute gelang, wurden diese Untersuchungen eingestellt und eine radikalische Substitution nach BARTON-MCCOMBIE angestrebt.

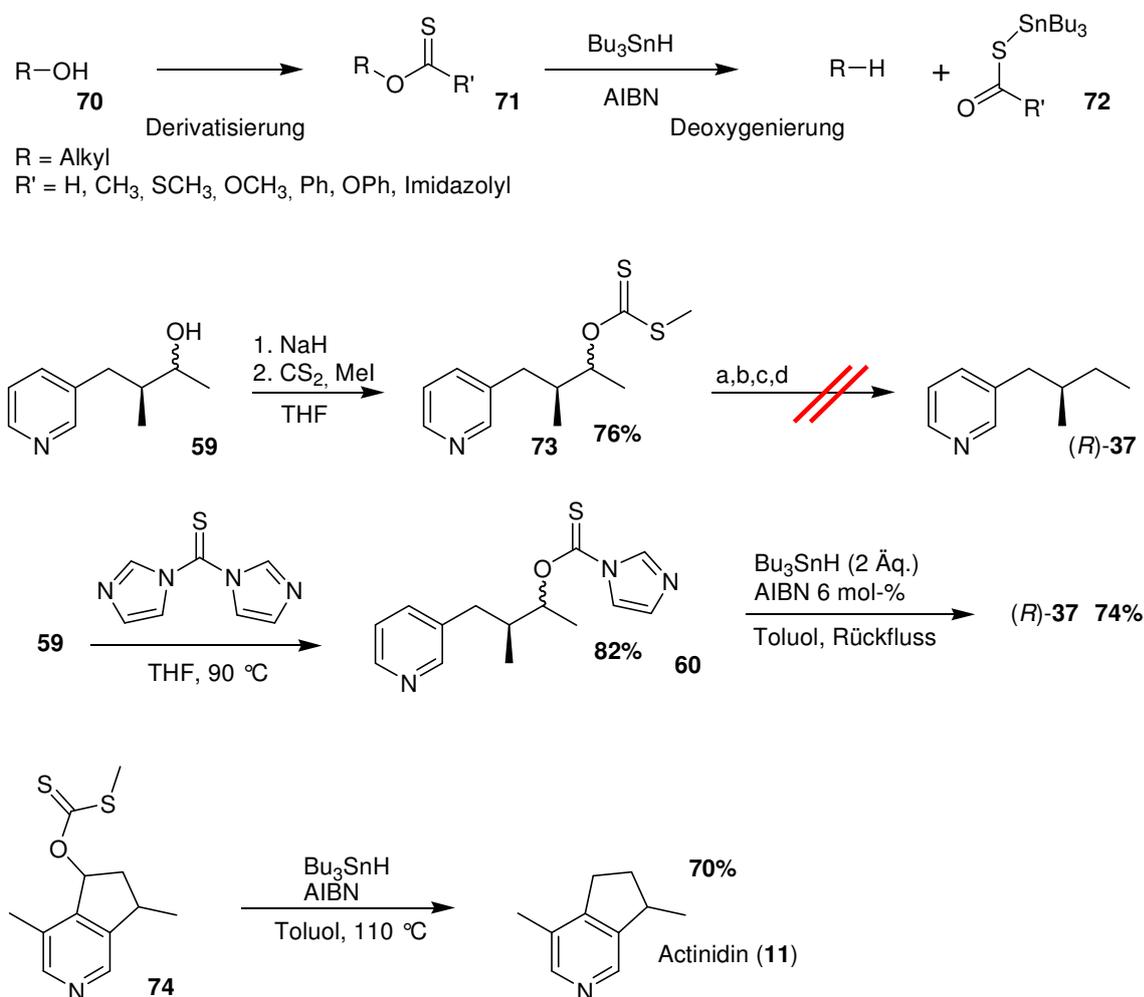


Schema 19: Untersuchungen zur Deoxygenierung von Keton **39** (indirekte Methoden). Reagenzien und Bedingungen: a) PBr₃, THF, RT, **40%**;^{49a} b) CBr₄, PPh₃, DCM, 0 °C, **40%**;^{49b} c) HBr (aq.), Rückfluss, **15%**, Vielstoffgemisch;^{49c} d) Br₂, PPh₃, 0 °C, DCM, **55%**.^{49d}

Bei dieser Deoxygenierungsreaktion wird der zugrunde liegende Alkohol **70** zunächst in ein Thiocarbonylderivat **71** überführt (Schema 20). Dieses kann anschließend mit Tributylzinnhydrid, einem Thiophil, und dem Radikalstarter AIBN bei erhöhter Temperatur defunktionalisiert werden.⁵²

Häufig eingesetzte funktionelle Gruppen für die Deoxygenierung von Alkoholen sind Xanthate **71**. Diese sind einfach und preiswert durch Deprotonierung des Alkohols und Umsetzung mit Schwefelkohlenstoff und einem Elektrophil darstellbar.

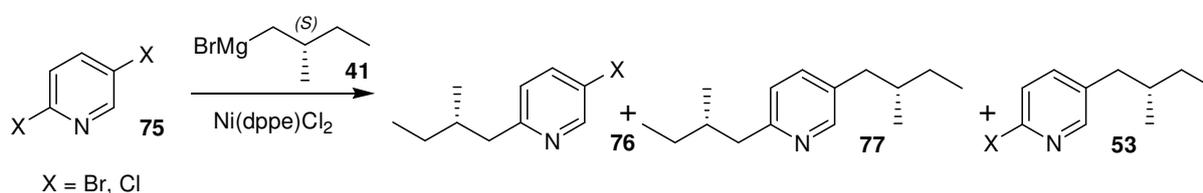
Die Darstellung der beiden Diastereomeren **73** erfolgte nach Literaturbedingungen.⁵³ Interessanterweise ließ sich **73**, auch bei Variation aller relevanter Parameter⁵⁴ wie Anteil des Radikalstarters, Substratkonzentration und Reaktionsmedium, nicht deoxygenieren, obwohl diese Umsetzung für das sehr ähnliche Molekül (\pm)-Actinidin (**11**) literaturbekannt ist.⁵⁵ Es konnten nur radikalische Zersetzungsprodukte, z.B. Dimere des Tributylzinnhydrids, nachgewiesen werden. Erst der Wechsel der funktionellen Gruppe zum Imidazolylthiocarbamat **60** brachte den gewünschten Erfolg. Hier gelang die Defunktionalisierung zum chiralen Pyridin (*R*)-**37** nach Standardbedingungen in brauchbarer Ausbeute.



Schema 20: Allgemeines Schema (oben), Literatursynthese⁵⁵ von **11** (unten) und erfolgreiche Optimierung der BARTON-McCOMBIE Deoxygenierung für (*R*)-**37**. Reagenzien und Bedingungen: a) 2 mol-% AIBN, **73** in Toluol, 0.3 M, Rückfluss 3 h; b) 20 mol-% AIBN, **73** in Toluol, 0.3 M, Rückfluss 16 h; c) 20 mol-% AIBN, **73** in Toluol 0.03 M, Rückfluss 16 h; d) 10 mol-% AIBN, Bu₃SnH 50 Äq., 110 °C, Druckschlenk.

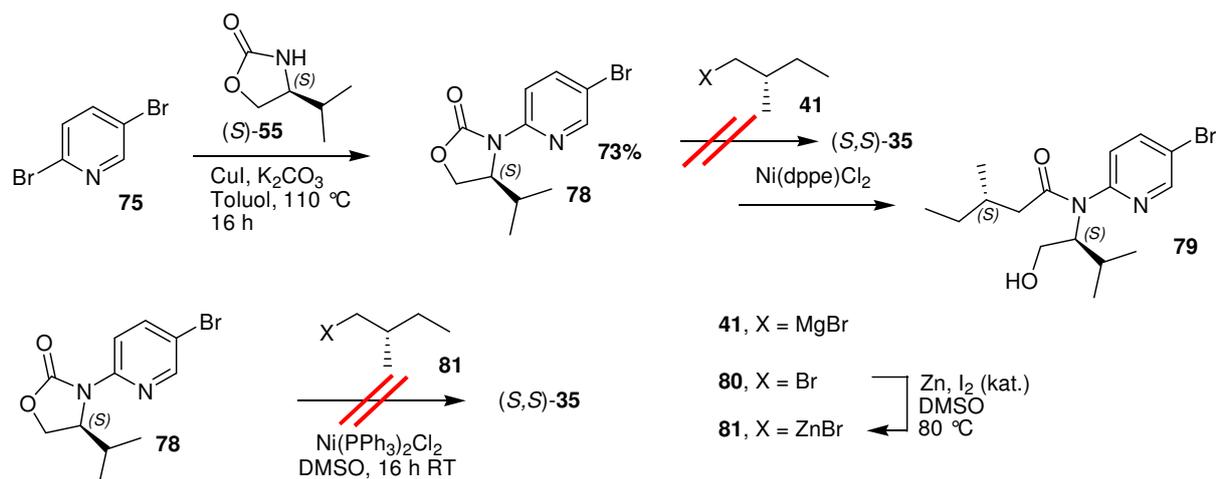
2.2.5 Untersuchungen zur Synthese von (2*S*,3*R*)- und (2*S*,3*S*)-Stenusin in drei Stufen via KUMADA- und NEGISHI-Kupplung

Da die mit nur 53% verlaufende Chlorierung der Pyridinverbindung **37** die Gesamtausbeute der Syntheseroute deutlich schmälert (Schema 13), wurde versucht, diese Umsetzung durch Verwendung von 2,5-Dibrompyridin (**75**) zu ersetzen. Weil allerdings die Reaktivität eines 2,5-Dihalogenpyridins (X = Br, Cl) bei der Kreuzkupplung nach KUMADA in Position 2 leicht überwiegt, ist es nicht möglich, selektiv Verbindung **53** darzustellen. Es sollte sich bestenfalls ein Produktgemisch bilden (Schema 21).^{37a} Die angestrebte Verkürzung der Syntheseroute erfordert daher Verbindung **78** (Schema 22), welche anschließend zu (*S,S*)-**35** umgesetzt werden müsste.



Schema 21: Erwartetes Produktgemisch bei der KUMADA-Kupplung von 2,5-Dihalogenpyridin (**75**) mit GRIGNARD-Verbindung **41**.^{37a}

Die regioselektive Umsetzung von **75** mit dem Oxazolidinon **55** in 2-Position gelang bei äquimolarem Einsatz der Reaktanden in guter Ausbeute. Anschließend musste ein geeignetes Verfahren zur Kreuzkupplung von **78** gefunden werden, welches die Carbamatfunktion toleriert. Zunächst wurde versucht, die bereits erfolgreich durchgeführte KUMADA-Kupplung auf dieses Problem anzuwenden. Die sehr reaktive GRIGNARD-Verbindung reagierte jedoch unter Ringöffnung des Oxazolidinons zum Alkohol **79**. Als logische Konsequenz wurde daraufhin eine NEGISHI-Kupplung versucht, bei der Alkylzinkhalogenide (R-ZnX) zum Einsatz kommen.⁵⁶ Bedingt durch die geringere Polarität und damit geringere Reaktivität der Organozinkverbindungen wird hier eine Vielzahl funktioneller Gruppen toleriert.



Schema 22: Untersuchungen zur Kreuzkupplung von Pyridin **78** mit den chiralen Bausteinen **41** und **81**.

Das Zinkorganyl **81** wurde durch direkte Umsetzung des Bromids **80** mit Zinkpulver unter Iodkatalyse erhalten. Das zugesetzte Iod oxidiert hierbei aufgrund seines höheren Redoxpotentials die Zinkoberfläche, wodurch diese aktiviert wird.^{56b} Das sich hierbei bildende Iodid kann dann das Alkylbromid **80** intermediär in das korrespondierende Iodid überführen, welches viel reaktiver gegenüber der oxidativen Insertion zu **81** ist.^{56b} Bei der anschließenden Ni-katalysierten Kreuzkupplung konnte leider auch bei längerer Reaktionszeit kein Umsatz festgestellt werden. Als Fehlerquellen kommen der Nickel-Katalysator (meist wird das weniger oxidationsempfindliche $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ verwendet) und das Substrat selbst in Frage. Die Reaktivität von Arylbromiden ist im Vergleich zu Aryliodiden und Triflaten deutlich verringert. Da 2,5-Diiodpyridin als Ausgangsmaterial für eine Synthesesequenz bereits relativ kostenintensiv ist und außerdem eine optimierte Synthese für die beiden Stenusin-Isomeren bereits vorhanden war, wurden weitere Versuche an dieser Stelle, nicht unternommen.

2.3 Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese des Piperideinalkaloids Cicindeloin aus *Stenus cicindeloides*

Die beiden *Stenus*-Arten *S. solutus* und *S. cicindeloides* besitzen eine herausgehobene Stellung aufgrund der chemischen Zusammensetzung ihrer Pygidialdrüsensekrete.²¹ Die Besonderheit in ihrer Chemie liegt darin, dass sie von den bisher untersuchten Arten die beiden einzigen sind, die nicht Stenusin als Hauptkomponente besitzen, sondern die bislang unbekannte Substanz **82**.⁵⁷ *S. solutus* enthält diese und das bereits beschriebene (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**9**) fast im Verhältnis 50 zu 50. Die Drüsen von *S. cicindeloides* enthalten sogar ca. 80% von **82** (Abbildung 13). Verbindung **82** erhielt daher den Trivialnamen Cicindeloin. In *S. binotatus* konnte eine Verbindung per GC-MS detektiert werden, welche ein identisches EI-MS bei unterschiedlicher Retentionszeit aufwies. Es schien daher überaus wahrscheinlich, dass es sich hierbei, ähnlich wie bei den Pyridinalkaloiden (*E*)- und (*Z*)-**9**, um ein Isomer von **82** handelte. Da die Art *S. cicindeloides* zum Spreitungsschwimmen befähigt ist,⁵⁸ jedoch anstelle des Spreitungsalkaloids Stenusin (**4**), Verbindung **82** enthält, wurde vermutet, dass diese ebenfalls eine Spreitungsaktivität zeigt. Da sie in den Wehrdrüsen der Käfer produziert wird, ist es wahrscheinlich, dass die Substanz eine antimikrobielle Wirkung gegenüber insektenpathogenen Mikroorganismen und eine abschreckende Wirkung gegenüber Prädatoren zeigt, wie es bei den Stenusin-Isomeren (**4**) und den Pyridinalkaloiden **9** der Fall ist. Tests zur Untersuchung dieser physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften erfordern eine Totalsynthese, da in den Wehrdrüsen eines Käfers lediglich ca. 8 µg an **82** enthalten sind.

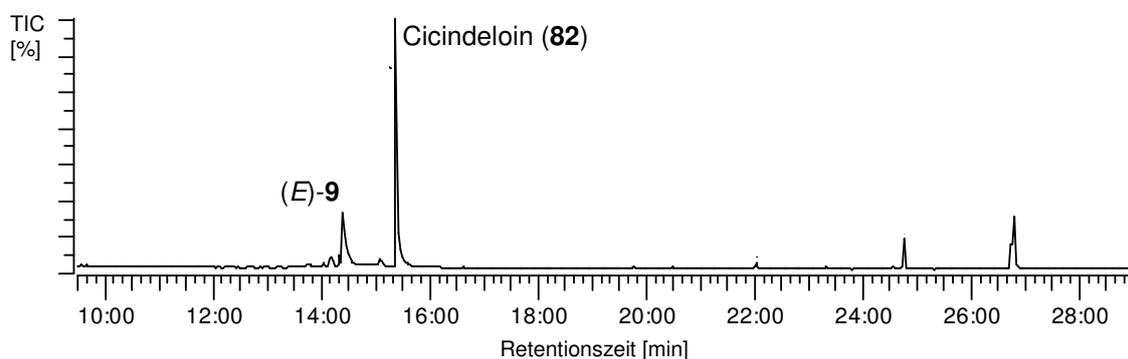


Abbildung 13: Totalionenstrom eines Pygidialdrüsenextraktes von *S. cicindeloides*.

2.3.1 Strukturaufklärung von Cicindeloin

Zunächst wurde die Bruttoformel von **82** durch ESI-HRMS auf $C_{10}H_{17}NO$ bestimmt, was sich aus dem gemessenen Moleküladdukt $168.1379 [M+H]^+$ ergab. Dies stimmte mit dem höchsten gemessenen Peak $m/z = 167$ im EI-MS überein, welcher somit als Molekülpeak $[M]^+$ interpretiert werden konnte. Aufgrund der Summenformel musste Verbindung **82** drei Doppelbindungsäquivalente enthalten.

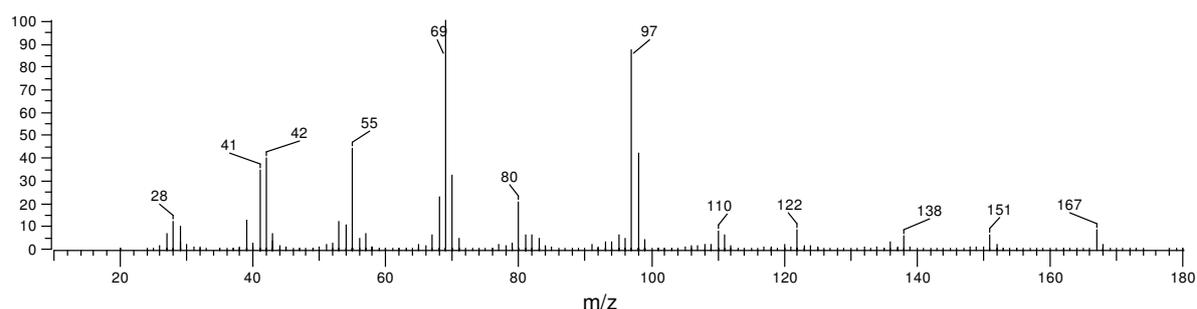


Abbildung 14: EI-MS von Cicindeloin (**82**).

Von K. SHAKER (AK SEIFERT) wurden aufgrund von weiteren MS/MS-Untersuchungen drei Strukturvorschläge für **82** erarbeitet und die Verbindungen synthetisiert (Abbildung 15). Diese entsprachen jedoch laut ihren GC-MS-Daten allesamt nicht dem Naturstoff und konnten daher ausgeschlossen werden. Deshalb wurden von I. LUSEBRINK die Pygidialdrüsen von 60 *S. cicindeloides* Käfern herauspräpariert und mit Ethylacetat extrahiert. HPLC-NMR (AK SCHNEIDER, MPI Jena) des Rohextraktes führte leider ebenfalls nicht zum Erfolg. Sehr wahrscheinlich zersetzte sich die Verbindung bei den verwendeten HPLC Bedingungen (RP-18, MeCN, H₂O, 0.1% TFA).

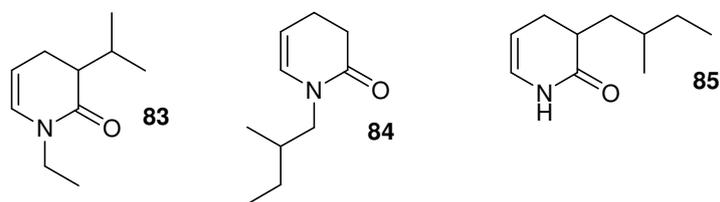


Abbildung 15: Strukturvorschläge für **82**, welche ausgeschlossen werden konnten.

Da eine längere Verweildauer der Substanz im wässrigen Medium ungünstig schien, wurde ein anderer Ansatz versucht. Da als Grundkörper nun ein basisches Alkaloid angenommen wurde, sollte Verbindung **82** durch klassische Säure/Base Extraktion von den restlichen Drüsenbestandteilen abgetrennt werden. Zur Isolierung der Substanz wurde der Rohextrakt

zwischen CHCl_3 und 5%-iger HCl verteilt. Der wässrige Extrakt wurde anschließend mit NaHCO_3 alkalisch gestellt, mit CDCl_3 extrahiert und direkt NMR-spektroskopisch vermessen, was ein ausreichend sauberes ^1H -NMR Spektrum des Alkaloids lieferte. Die ^{13}C -Resonanzen konnten aufgrund der geringen Substanzmenge lediglich aus den 2D-Experimenten (HSQC, HMBC) extrahiert werden und unterlagen somit gewissen Ungenauigkeiten. Die Auswertung aller NMR-Daten führte schließlich zur Struktur von **82** (Abbildung 16).

Als charakteristisches Signal zeigte das ^1H -Spektrum ein Proton bei 7.11 ppm, welches im HSQC-Experiment mit einem ^{13}C -Signal bei 165 ppm korrelierte. Dies musste zweifelsfrei als ein Azomethin bzw. Aldimin interpretiert werden, da keine andere funktionelle Gruppe durch diese ^1H - und ^{13}C -NMR chemischen Verschiebungen charakterisiert wird. Insgesamt zeigte die Verbindung zehn ^{13}C -Signale ($1 \times \text{C}_q$, $3 \times \text{CH}$, $4 \times \text{CH}_2$, $2 \times \text{CH}_3$), was die Vermutung nahe legte, dass auch hier ein sechsgliedriger Heterocyclus mit 2-Methylbutyl-Seitenkette in Position 3 vorliegen könnte, wie es bei den Pyridinalkaloiden **9** und Stenusin (**4**) der Fall ist.

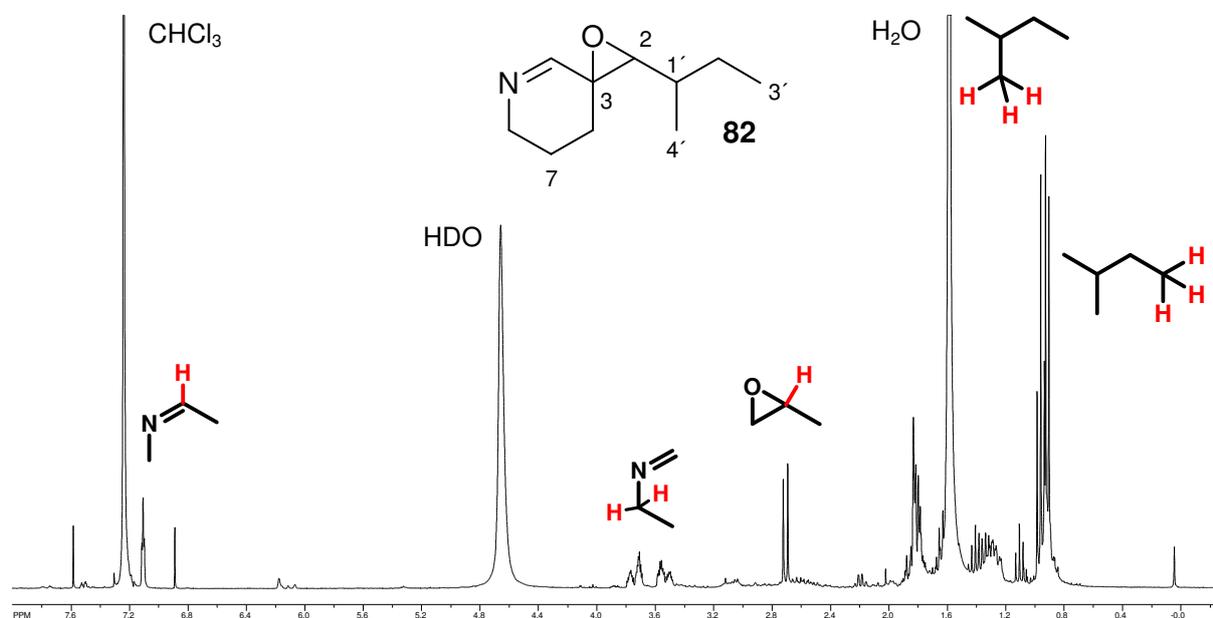


Abbildung 16: ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3) des Rohextraktes der Pygidialdrüsen von 60 *S. cingendoides* Käfern nach Säure Base Extraktion.

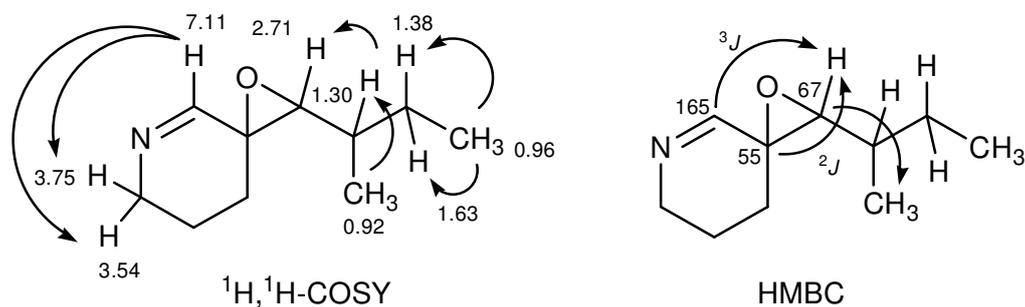


Abbildung 17: Ausgewählte $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY- und HMBC-Korrelationen des Naturstoffs Cicindeloin (**82**).

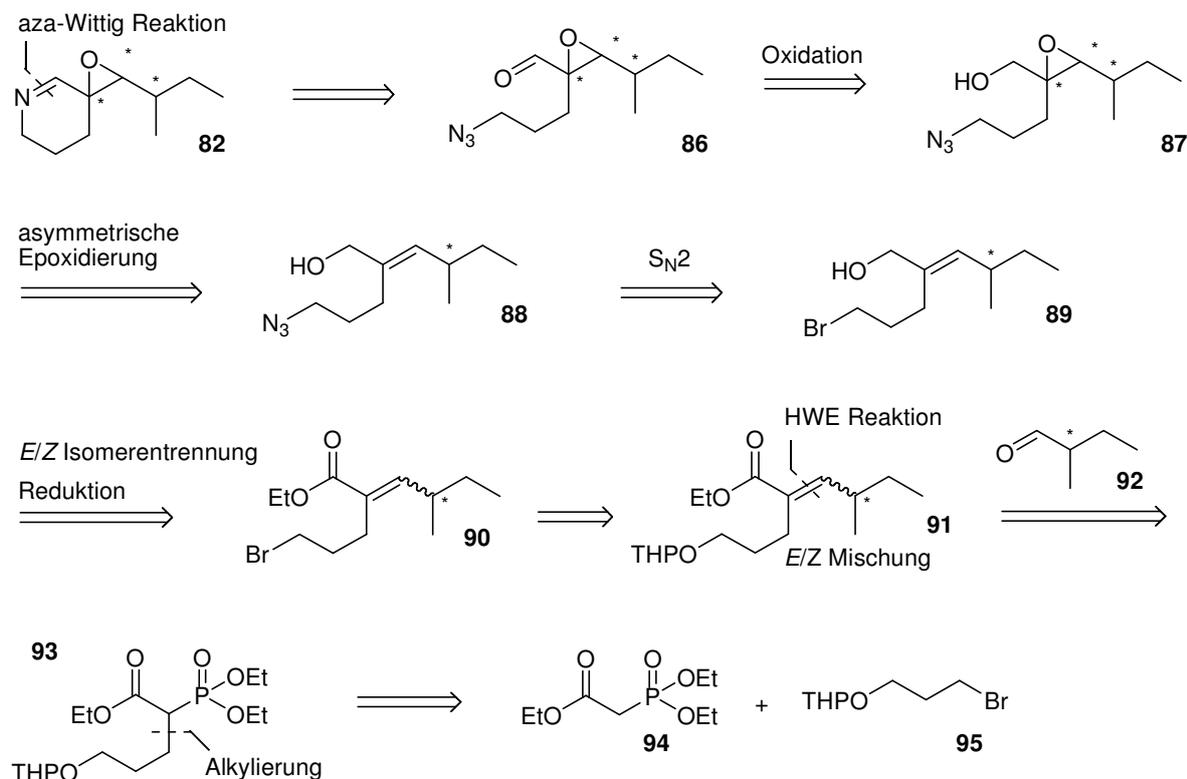
Die Auswertung des $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY Spektrums ergab eine endständige Isobutylgruppe, welche sich in Nachbarschaft zu H-2 befindet, dessen Methinsignal bei 2.71 ppm beobachtet wurde. Die chemischen Verschiebungen der Signale von H-2, C-2 (67 ppm) und dem quartären Brückenkopfatom C-3 (55 ppm) stimmen gut mit denen eines Epoxides überein. Die Lage der Azomethin-Doppelbindung wurde durch eine starke 3J HMBC-Korrelation (H-2, C-4) (Abbildung 17) eindeutig festgelegt.

2.3.2 Totalsynthese und Aufklärung der Absolutkonfiguration von Cicindeloin

Um die Absolutkonfiguration von **82** zu bestimmen und genügend Material für biologische und pharmakologische Tests zu erhalten, wurde ein Synthesepfad für **82** entwickelt, welcher die selektive Darstellung aller potentiellen Stereoisomeren ermöglicht. Schema 23 zeigt die Retrosynthese: Da die Iminfunktionalität in **82** aufgrund ihrer Instabilität und Basizität weitere Umsetzungen stark erschwert, war der Grundgedanke der Planung, diese funktionelle Gruppe durch Ringschluss an letzter Stelle einzuführen. Beispielsweise führt die Epoxidierung mit Standardmethoden in Anwesenheit einer Iminfunktion zur Bildung eines 1,2-Oxaziridin-Derivates.⁵⁹

Eine elegante und experimentell einfache Lösung für dieses Problem stellt die intramolekulare STAUDINGER-aza-WITTIG-Reaktion dar.⁶⁰ Diese führt retrosynthetisch zum offenkettigen epoxidierten Aldehyd **86**, welcher ein primäres Azid enthält. Die Verwendung eines Azids als Iminvorläufer besitzt weiterhin eine Reihe von Vorteilen. Anders als bei der Verwendung eines prim. Amins⁶¹ entfällt die notwendige Schutzgruppe, da Azide nicht von selbst mit Aldehyden reagieren. Die Ringschlussreaktion kann durch einfache Zugabe von Triphenylphosphan unter Neutralbedingungen eingeleitet werden. Da Azide nicht basisch

sind, lassen sie sich im Gegensatz zu Aminen problemlos auf Normalphase chromatographieren, was die Aufreinigung enorm erleichtert. Der Aldehyd **86** sollte leicht durch eine geeignete Oxidationsmethode aus dem epoxidierten Allylalkohol **87** zugänglich sein. An dieser Stelle bietet sich nun die Möglichkeit einer SHARPLESS-Epoxidierung,⁶² was die selektive Darstellung beider Diastereomeren von **87** erlaubt und retrosynthetisch zum Allylalkohol **88** führt. Das Azid in **88** wird durch nukleophile Substitution des entsprechenden Bromides erhalten, was zu Verbindung **89** führt. Diese ist das Folgeprodukt der Reduktion des α,β -ungesättigten Esters **90**. Da dieser Ester durch HWE-Reaktion⁶³ nur als *E/Z*-Gemisch gebildet wird, muss an geeigneter Stelle vor der Epoxidierung eine *E/Z*-Isomerentrennung erfolgen. Das Halogenid in **90** kann direkt durch Umwandlung der THP-Schutzgruppe aus dem Ester **91** erzeugt werden.⁶⁴ Der für die HWE-Reaktion mit dem chiralen Aldehyd **92** notwendige Triethylphosphonoester **93** kann laut Literatur durch Alkylierung von Triethylphosphonoacetat (**94**) mit dem THP-geschützten C-3-Baustein **95** erhalten werden.^{63c} Der chirale Aldehyd **92** kann durch Oxidation des Gärungsamylalkohols (*S*)-2-Methylbutanol aus dem chiralen Pool entnommen werden.

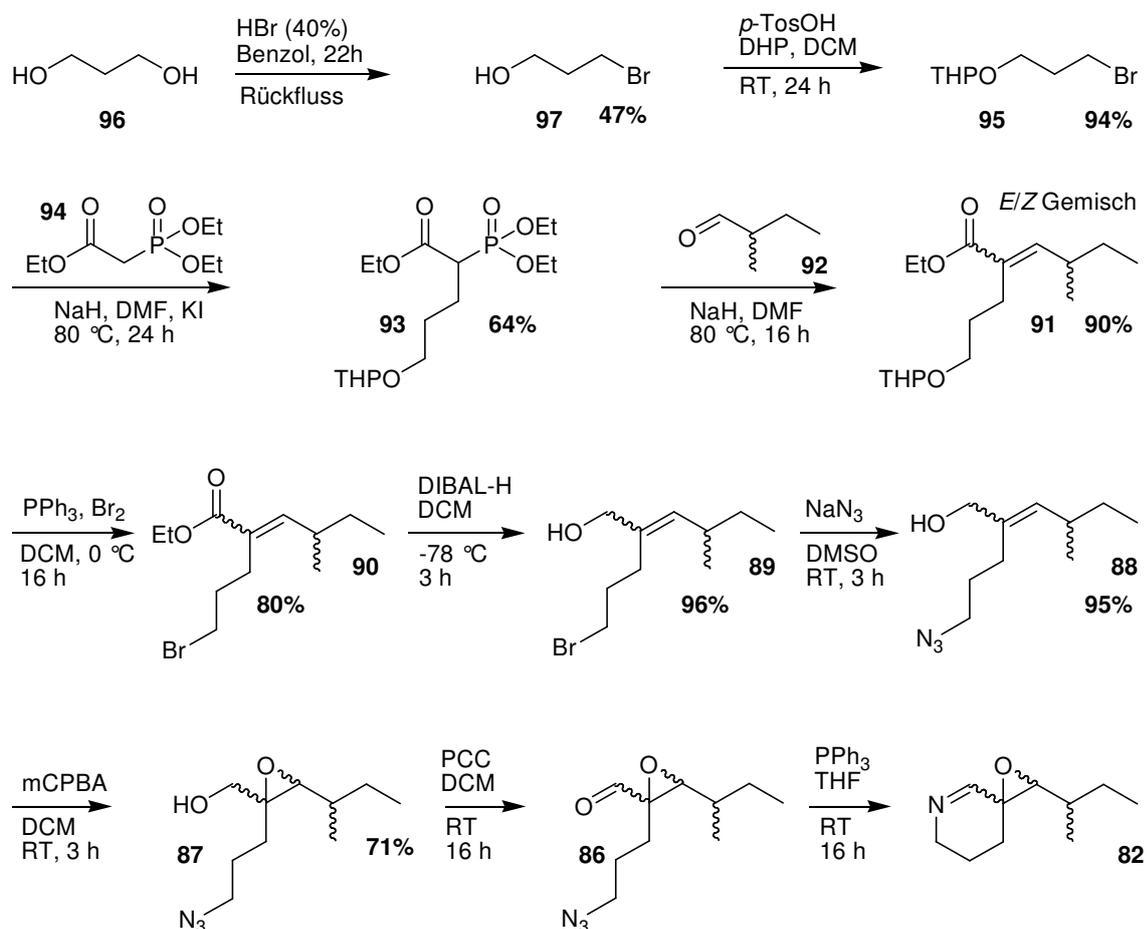


Schema 23: Retrosynthese für Cicindeloin (**82**).

36 Beschreibung der einzelnen Teilprojekte

Das erste Ziel stellte die schrotschussartige Darstellung aller 8 Stereoisomeren und deren Auftrennung durch chirale Gasschromatographie dar. Durch Coinjektion mit der natürlichen Substanz sollte später herausgefunden werden, welches Isomer in *S. cicindeloides* vorkommt.

3-Brompropan-1-ol (**97**) wurde aus Propan-1,3-diol (**96**) und wässriger HBr in literaturüblicher Ausbeute⁶⁵ erhalten (Schema 24). Für die nachfolgende Alkylierung musste an **97** eine geeignete Schutzgruppe (THP) angebracht werden. Dies gelang nach Literaturvorschrift⁶⁶ in annähernd quantitativer Ausbeute. Die anschließende Alkylierung von Triethylphosphonoacetat (**94**) mit dem geschützten C-3-Baustein erfolgte nach modifizierter Vorschrift^{63c} in akzeptabler Ausbeute. Es folgte die HWE-Olefinierung mit Aldehyd **92** nach derselben Literaturvorschrift, was den α,β -ungesättigten Ester **91** in einem *E/Z*-Verhältnis von annähernd 1:1 und in sehr guter Ausbeute lieferte. Die direkte Umwandlung der OTHP-Gruppe zum Bromid **90** nach Standardmethoden⁶⁴ konnte ebenfalls in sehr guter Ausbeute realisiert werden. Bei der Reduktion des Esters **90** zum Allylalkohol **89** mit Lithiumaluminiumhydrid wurde als Nebenreaktion die Reduktion der Doppelbindung und auch geringfügig eine Dehalogenierung beobachtet, was zu einem Produktgemisch führte.



Schema 24: Synthese des Isomerengemisches von Cicindeloin (**82**).

Bei tiefer Temperatur ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) und durch Einsatz von Diisobutylaluminiumhydrid⁶⁷ gelang diese Umsetzung mit annähernd quantitativer Ausbeute. Es folgte die nukleophile Substitution der Bromid-Abgangsgruppe durch Natriumazid in DMSO, welche in Übereinstimmung mit der Literaturvorschrift⁶⁸ ebenfalls fast quantitativ verlief. Die Epoxidierung des Allylalkohols **88** mit *meta*-Chlorperbenzoesäure lieferte das Epoxid **87**, das in Form von 8 Stereoisomeren vorlag. Die Oxidation einer analytischen Menge von **87** mit Pyridiniumchlorochromat führte zum instabilen Aldehydgemisch **86**, welches sofort und ohne weitere Aufreinigung mit Triphenylphosphan zum Endprodukt **82**, unter Abspaltung von Triphenylphosphanoxid und Stickstoff, cyclisiert wurde.^{60c} Das entstandene Rohprodukt wurde direkt mittels GC-MS und chiraler GC untersucht. Das Massenspektrum der natürlichen Probe erwies sich im Rahmen normaler Intensitätsschwankungen als identisch mit dem der synthetischen Substanz, was den Strukturvorschlag durch Totalsynthese bestätigte (Abbildung 18).

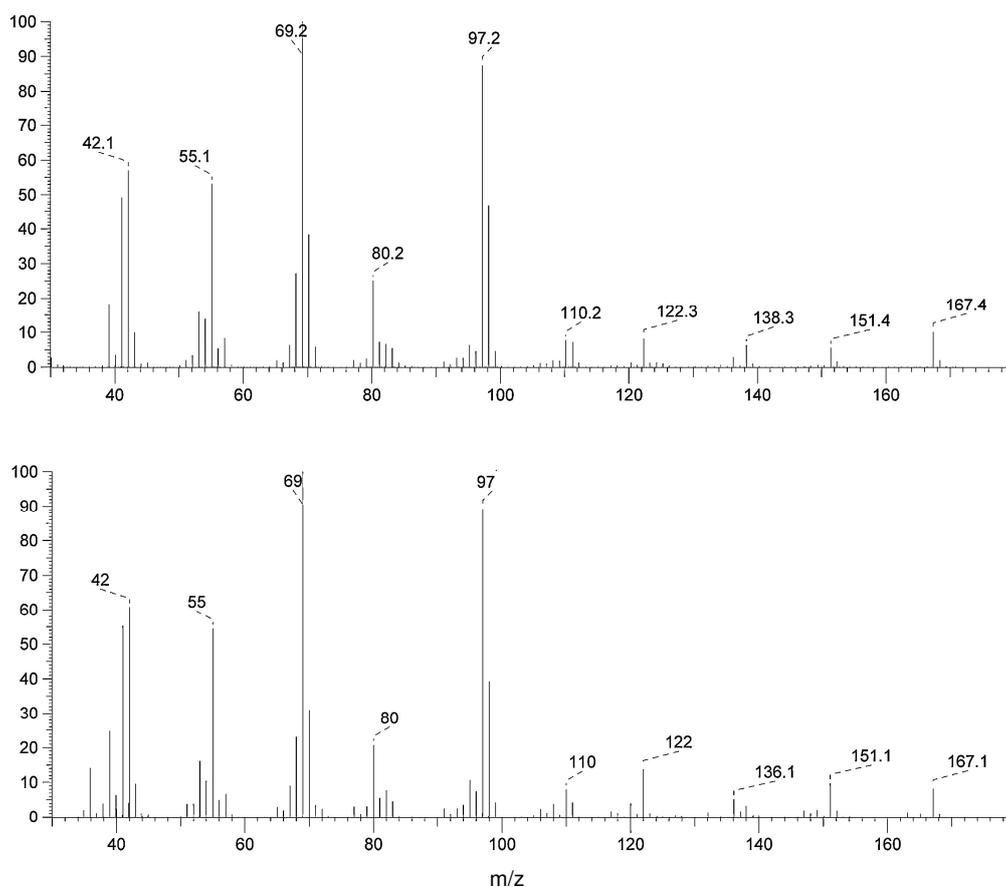


Abbildung 18: Vergleich der EI-Massenspektren von natürlichem (oben) und synthetischem Cicindeloïn (**82**) (unten).

Nach Optimierung des Temperaturprogramms konnte eine sehr gute Auftrennung mittels chiraler GC erreicht werden (Abbildung 19). Das Chromatogramm zeigt die erwarteten 8 Stereoisomere in Form ihrer 4 Enantiomerenpaare mit unterschiedlichen relativen Anteilen. Durch Coinjektion wurde das natürliche Stereoisomer im Gemisch eindeutig identifiziert. Abbildung 19 (unten) zeigt, dass das natürliche Isomer durch die Syntheseroute in Schema 24, welche nur über substratkontrollierte Diastereoselektivität verfügt, lediglich als Minderkomponente gebildet wurde. Es galt nun durch systematische Variation aller Parameter die Absolutkonfiguration von **82** herauszufinden und die Synthese für das natürliche Isomer anzupassen.

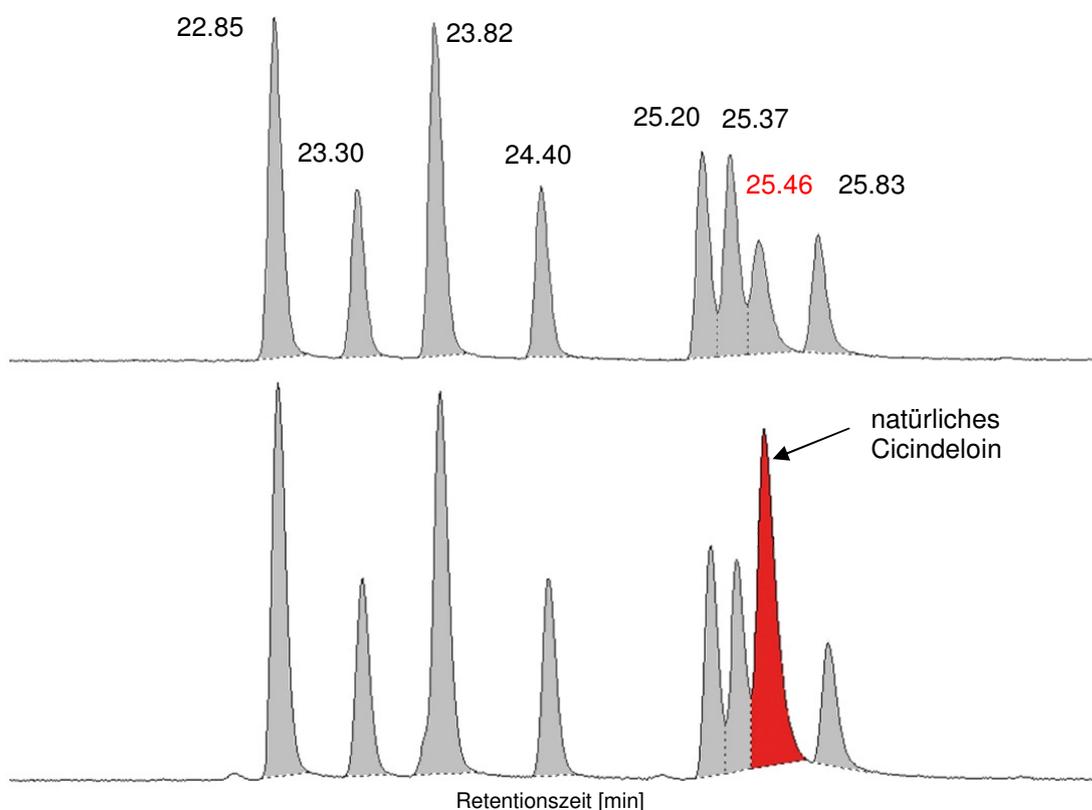


Abbildung 19: Chirale Gaschromatogramme des Isomerengemisches von synth. Cicindeloins (oben) und Coinjektion mit Probe des Naturstoffes (unten).

Als nächstes wurde das *E/Z*-Gemisch von **89** durch MPLC (Normalphase, *n*-Hexan/MTBE Gradient) aufgetrennt und die Synthese im analytischen Maßstab mit (*Z*)-**89** wiederholt. Die Zuordnung der (*E/Z*)-Isomere stützte sich zunächst nur auf Vergleich der ^{13}C -Resonanzen mit errechneten Werten und wurde deshalb nochmals durch NOE-Experimente verifiziert.

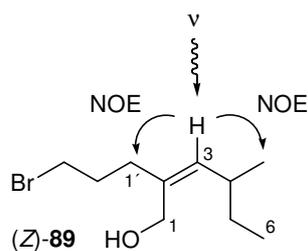
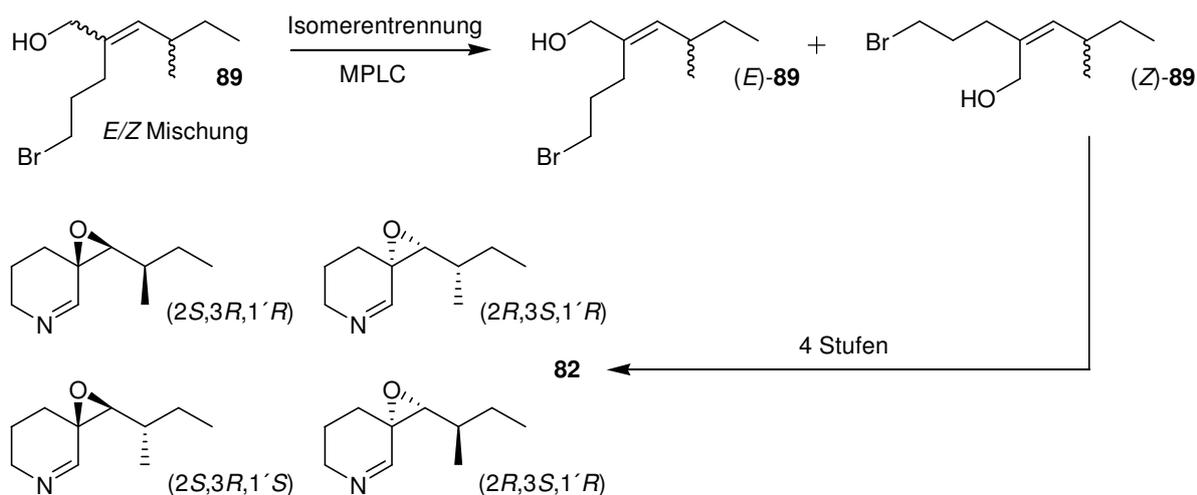


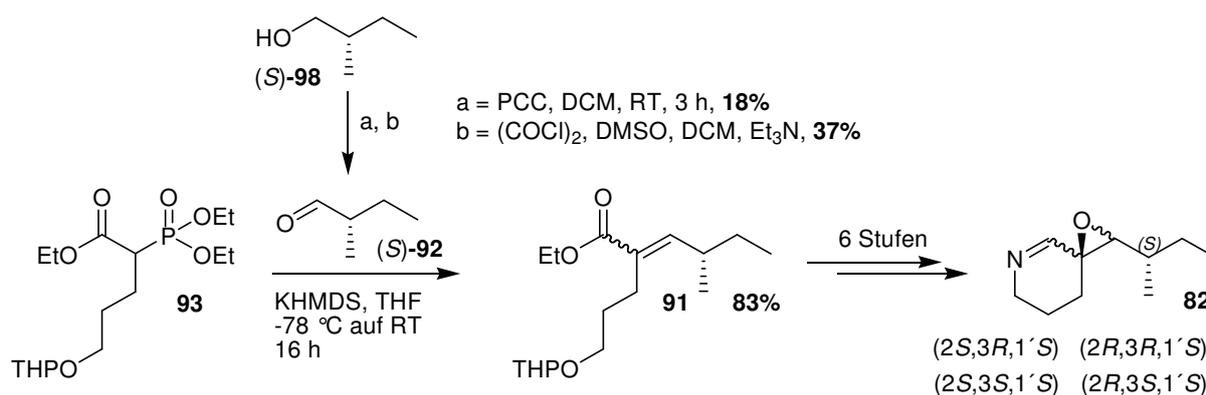
Abbildung 20: Durch 1D-NOE-Differenzmessungen gefundene NOE Effekte in (Z)-89.

Abbildung 20 zeigt den eindeutigen Befund: Die Einstrahlung bei der Resonanzfrequenz des olefinischen Protons in 3-Position zeigte eine deutliche Erhöhung der Signale für die benachbarte Methyl- und Methylengruppe in 1'-Position. Im Falle von (E)-89 wäre ein NOE-Effekt mit diesem Methylensignal undenkbar, da der Abstand beider Kerne hier deutlich über 3 Å liegt.



Schema 25: Darstellung zweier Enantiomerenpaare von Cicindeloin (**82**) aus (Z)-89.

(Z)-89 wurde analog Schema 24 in 4 Stufen zur Zielverbindung umgesetzt. Durch die erfolgte Isomerentrennung wurden demnach nur 2 Enantiomerenpaare erhalten, welche durch chirale Gaschromatographie untersucht wurden. Abbildung 21 (unten) zeigt das eindeutige Ergebnis: Die Stereoisomere, welche aus (Z)-89 stammen, eluieren als „erster Viererblock“ deutlich vor den restlichen vier Isomeren, welche somit aus (E)-89 darstellbar sind.



Schema 26: Darstellung von 4 Diastereomeren von Cicindeloin (**82**) durch Verwendung von enantiomerenreinem Alkohol (*S*)-**98**.

Um die Absolutkonfiguration von **82** weiter einzugrenzen, wurde die Synthese mit dem chiralem Aldehyd (*S*)-**92** wiederholt (Schema 26). Da die HWE-Olefinierung zu **91** racemisierungsfrei verlaufen sollte, mussten schonendere Reaktionsbedingungen verwendet werden als bei der Synthese des Isomerengemisches (NaH, DMF, 80 °C, 16 h, Schema 24). Mit Hilfe von KHMDS wurde daher das reaktivere Kaliumsalz des Phosphonoesters **93** gebildet und anschließend auf -78 °C abgekühlt. Um freies KHMDS im Reaktionsgemisch zu vermeiden, wurde ein leichter Unterschuss an KHMDS verwendet. Anschließend wurde ein großer Überschuss an Aldehyd (*S*)-**92** zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht langsam auf Raumtemperatur gebracht. Für die Darstellung des für die Reaktion notwendigen Aldehyds (*S*)-**92** wurde kommerzielles (*S*)-2-Methyl-1-butanol (**98**) mit Pyridiniumchlorochromat oder unter SWERN-Bedingungen oxidiert. Bedingt durch die enorme Flüchtigkeit von **92** waren die Ausbeuten bei Isolation durch Destillation sehr schlecht. Die Literaturausbeuten (z.B. TIETZE et al., 80% nach SWERN)⁶⁹ konnten nicht ansatzweise erreicht werden. Verbindung **91** wurde anschließend analog Schema 24 in 6 Stufen zur Zielverbindung **82** umgesetzt und hinsichtlich der stereochemischen Zusammensetzung untersucht. Abbildung 22 zeigt zwei wesentliche Befunde: Das natürlich vorkommende Stereoisomer war in der Mischung enthalten.

Für die gesuchte Absolutkonfiguration kamen daher nur noch zwei mögliche Diastereomere in Frage. Je nachdem, ob die Epoxy- und die Methylgruppe in 1'-Position *syn* oder *anti* zueinander stehen, muss es sich hierbei um (2*R*,3*R*,1'*S*)-**82** (*syn*) oder (2*S*,3*S*,1'*S*)-**82** (*anti*) handeln. Da die (1'*R*)-Diastereomere ebenfalls beobachtet wurden und der verwendete Alkohol (*S*)-**98** optisch rein vorlag, musste während der Synthese eine nicht unerhebliche Racemisierung stattgefunden haben.

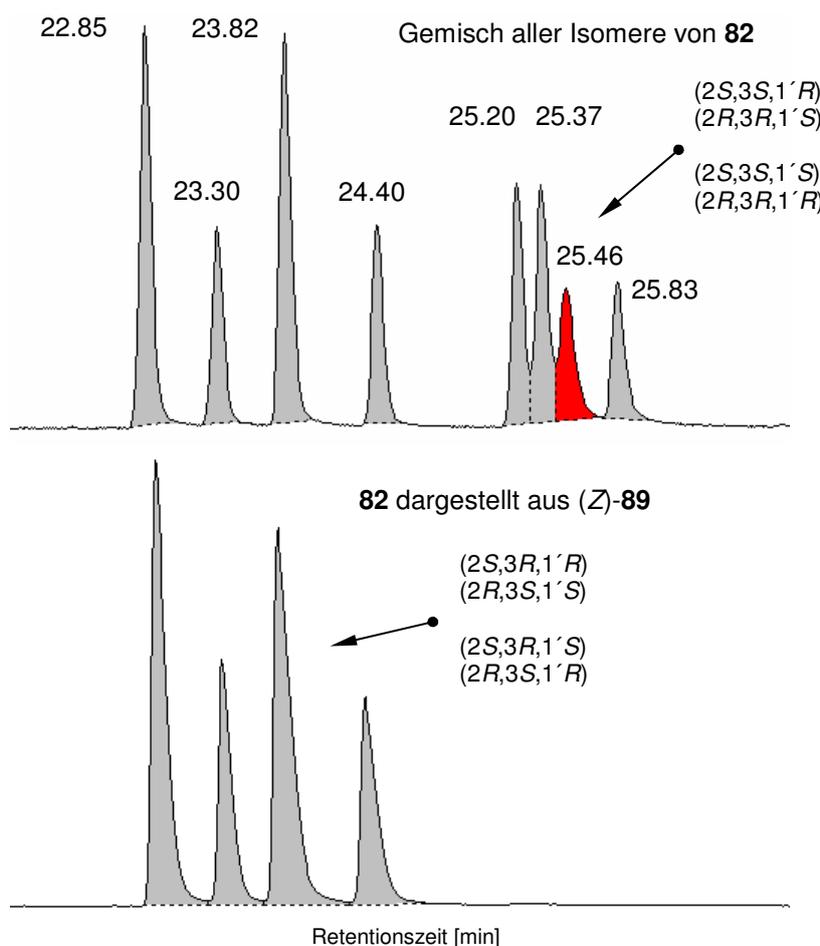


Abbildung 21: Gaschromatogramme an chiraler Phase des vollständigen Isomerengemisches von Cicindeloïn **82** (oben) und der Enantiomerenpaare von **82** aus (*Z*)-**89** (unten).

Die Integration der Peaks des Gaschromatogramms ergab nur einen Enantiomerenüberschuss bezogen auf (1'*S*) von 72% ee. Da nach der HWE-Olefinierung eine Racemisierung des Stereozentrums faktisch ausgeschlossen ist, musste dies während dieser Reaktion oder bereits bei der Oxidation zum Aldehyd (*S*)-**92** erfolgt sein. Die Aussagen in der Literatur bezüglich einer Racemisierung von (*S*)-**92** bei der Oxidation mit PCC sind nicht eindeutig. Während TYRRELL et al.⁷⁰ eine Verringerung der optischen Aktivität auf 55% ee beobachteten, wurde dies an anderer Stelle z.B. von AKAO et al.⁷¹ nicht festgestellt. Außerdem ist es möglich, dass die Racemisierung zusätzlich oder ausschließlich durch das basische Esterenolat von **93** bei der HWE-Olefinierung stattfand. Da es unwahrscheinlich schien, durch Optimierung der Reaktionsbedingungen dies vollständig zu unterdrücken, wurde für eine finale Synthese des Naturstoffs nach racemisierungsfreien Alternativmethoden gesucht.

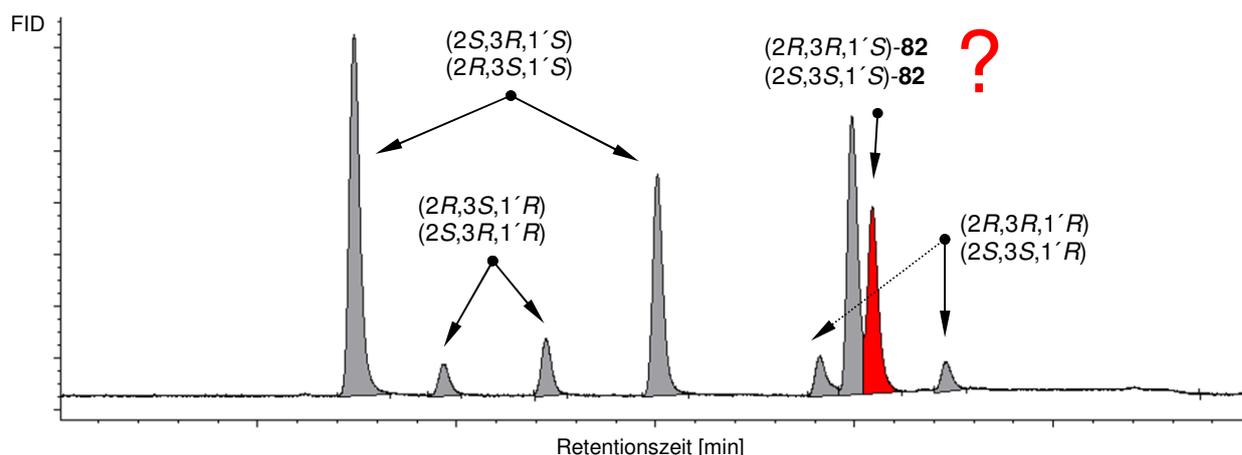
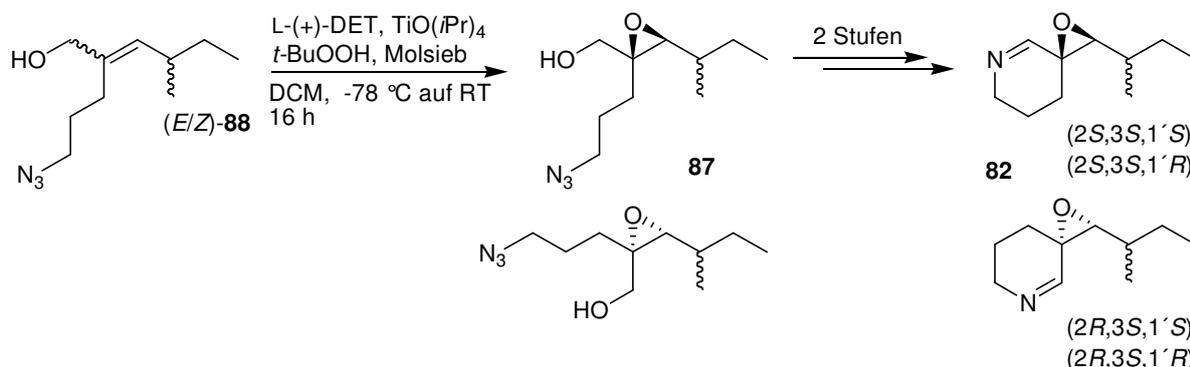


Abbildung 22: Gaschromatogramm an chiraler Phase des dargestellten Diastereomergemisches von Cicindeloin (**82**) nach Schema 26.

Um die Absolutkonfiguration der natürlichen Substanz endgültig aufzuklären, wurde ein (*E/Z*)-Gemisch des azidierten Allylalkohols **88** nach SHARPLESS^{62b} mit (+)-Diethyltartrat epoxidiert und zur Zielverbindung umgesetzt (Schema 27).



Schema 27: Darstellung der 4 Diastereomeren von Cicindeloin (**82**) durch SHARPLESS-Epoxidierung von (*E/Z*)-**88** mit L-(+)-DET.

Das Gaschromatogramm in Abbildung 23 zeigt nun wiederum zwei wichtige Befunde: Da die natürliche Verbindung im Gemisch enthalten war, wurde die Absolutkonfiguration zu (*2S,3S,1'S*) bestimmt, weil der Angriff bei der SHARPLESS-Epoxidierung mit (+)-Diethyltartrat von der *re*-Seite erfolgt. Vom Diastereomer (*2R,3R,1'S*)-**82** wurden lediglich ca. 2.5% gebildet. Dies bedeutet, dass die Epoxidierung mit akzeptabler Stereokontrolle ablief, obwohl hier der „mismatched Fall“ vorlag, d.h. Substratkontrolle und Additivkontrolle arbeiteten gegenläufig. Dies wird deutlich, wenn man das Verhältnis von (*2S,3S,1'R*)-**82** zu (*2R,3R,1'R*)-**82** betrachtet. Da sich hier die beiden Effekte verstärkten („matched Fall“) bewegte sich die Konzentration von (*2R,3R,1'R*)-**82** lediglich am Rande der Nachweisgrenze.

Betrachtet man die 4 Peaks der Isomeren von **82**, die aus (*Z*)-**88** entstehen, so stellt man auf den ersten Blick fest, dass die Stereokontrolle der SHARPLESS-Epoxidierung faktisch versagte. Es ist kein nennenswerter stereochemischer Überschuss feststellbar. Eine stichhaltige Erklärung für diese Beobachtung kann an dieser Stelle nicht gegeben werden, jedoch konnten die Absolutkonfigurationen der einzelnen Verbindungen trotzdem zugeordnet werden.

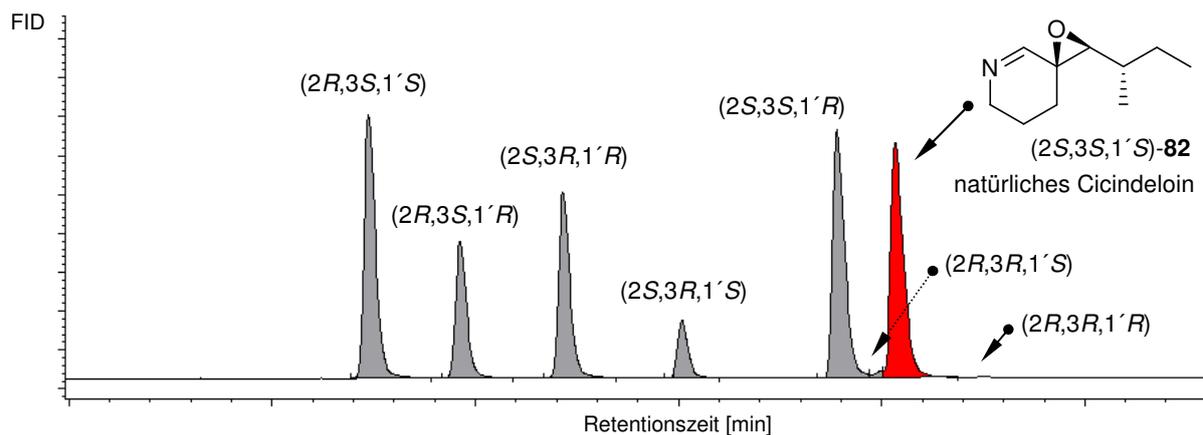
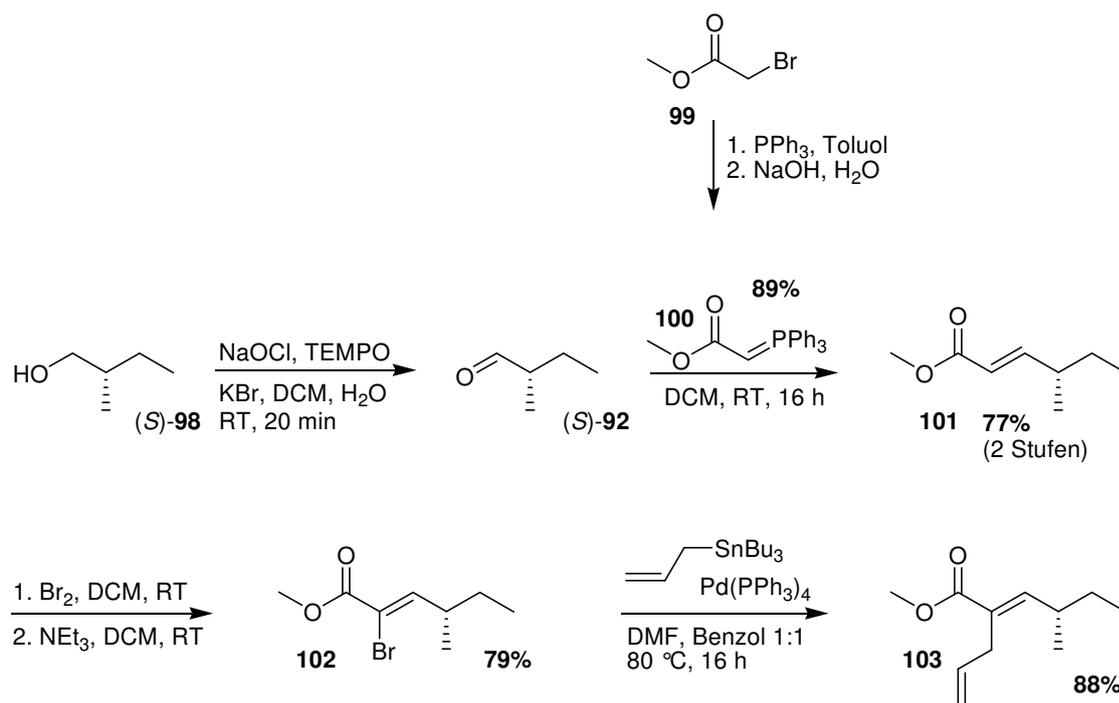


Abbildung 23: Gaschromatogramm an chiraler Phase des dargestellten Diastereomerengemisches von Cicindeloin (**82**) nach Schema 27.

Die Summen der Integrale von Signal 1+4 und 2+3 verhalten sich genau gleich. Dies ist logisch, da sich diese Paare in der Konfiguration der Seitenkette unterscheiden und aus dem Racemat von **92** dargestellt wurden. Betrachtet man die Integrale der Signale 1+2 im Verhältnis zu 3+4, so stellt man einen leichten Enantiomerenüberschuss von 25% ee bezogen auf die Epoxy-Gruppe für den Angriff von der *re*-Seite fest. Würde man die Zuordnung der Paare 1+4 und 2+3 vertauschen, so käme man auf eine Umkehr der Additivkontrolle bei der Epoxidierung, d.h. (+)-DET würde bevorzugt von der *si*-Seite angreifen, was nicht möglich ist.

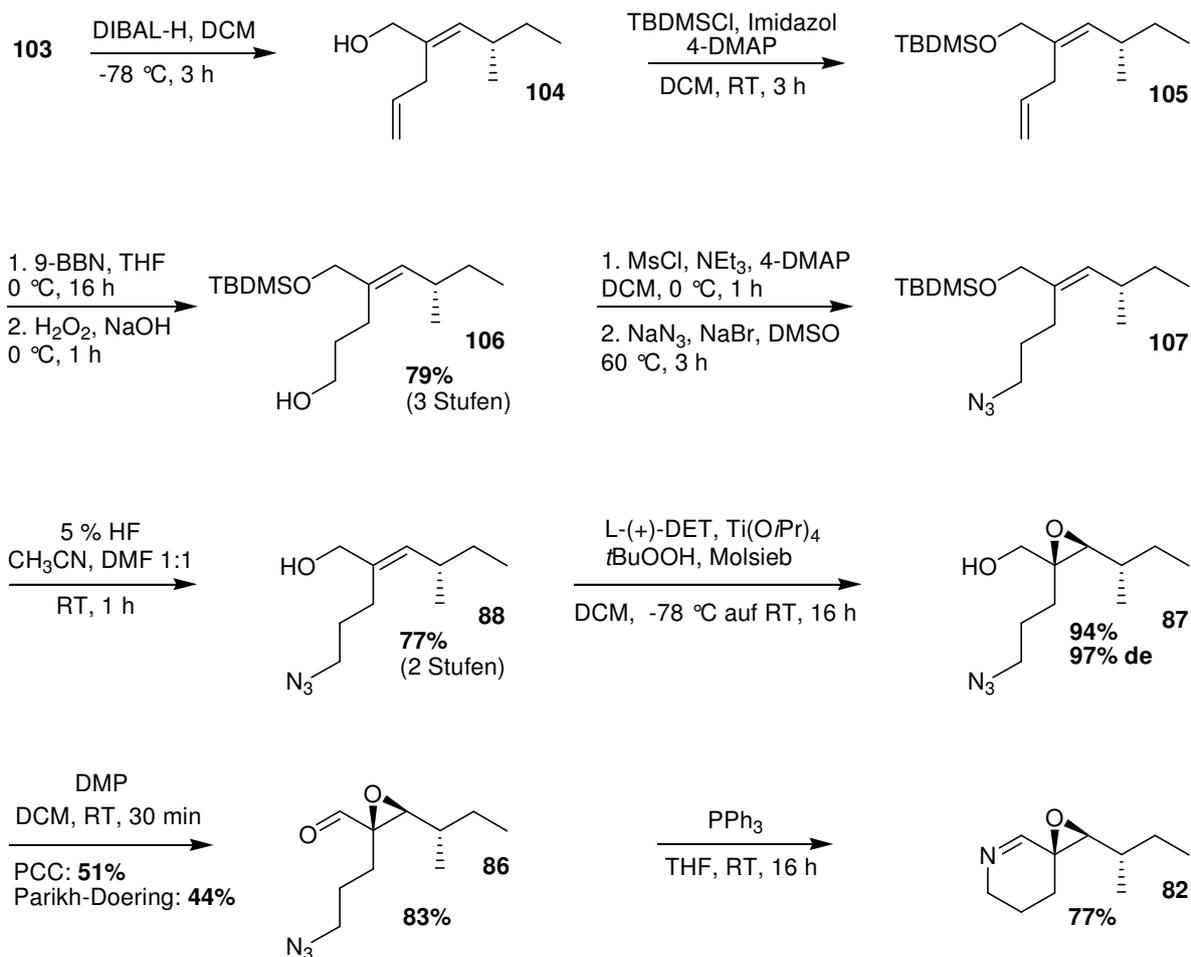
Da nun die Absolutkonfiguration von Cicindeloin (**82**) bekannt war, wurde ein racemisierungsfreier Zugang zum Allylalkohol (*S,E*)-**88** angestrebt. Ein stereoselektiver Zugang zum (*E*)-Olefin erschien wünschenswert, da damit die aufwendige und unelegante Isomerentrennung (Schema 25) entfällt. Die Syntheseroute wurde daher folgendermaßen abgeändert:



Schema 28: Finale Synthese (Teil 1) von (2S,3S,1'S)-Cicindeloin (**82**).

Methylbromacetat (**99**) wurde nach modifizierter Literaturvorschrift⁷² zum stabilen Ylid **100** umgesetzt. Dieses wurde mit dem Rohprodukt des chiralen Aldehyds (*S*)-**92** zur Reaktion gebracht⁷¹ und führte stereoselektiv zum *E*-konfigurierten α,β ungesättigten Ester **101**. Der Alkohol (*S*)-**98** wurde durch die racemisierungsfrei verlaufende TEMPO/NaOCl-Methode⁷³ oxidiert. Wenn auf die Isolierung von (*S*)-**92** verzichtet wurde, gelang die Darstellung von **101**, bezogen auf (*S*)-**98**, mit 77% über zwei Stufen. Dies stellte eine enorme Verbesserung im Gegensatz zur PCC-Oxidation (Schema 26) dar.

An die Doppelbindung von **101** wurde durch *anti*-Addition Brom addiert und durch *syn*-Eliminierung stereoselektiv das (*Z*)-konfigurierte Olefin **102** erhalten.⁷⁴ Dieses wurde nun im Zuge einer STILLE-Kupplung in sehr guter Ausbeute zum Methyl ester **103** umgesetzt.^{75,74} Die bei der Reaktion entstehenden Zinnorganyle konnten destillativ abgetrennt werden. Dadurch wurde diese Umsetzung präparativ enorm aufgewertet, da diese Trennung durch Säulenchromatographie sehr aufwendig ist und meist nicht vollständig gelingt.



Schema 29: Finale Synthese (Teil 2) von (2S,3S,1'S)-Cicindeloin (**82**).

Die Esterfunktion in **103** wurde mit Diisobutylaluminiumhydrid zum Allylalkohol **104** reduziert,^{67b} welcher anschließend TBDMS-geschützt⁷⁶ wurde. Das so erhaltene terminale Alken **105** wurde schließlich nach Literaturvorschrift mit 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan hydroboriert und anschließend mit Wasserstoffperoxid zum Alkohol **106** oxidiert.⁷⁷ An dieser Stelle in der Syntheseroute musste erstmalig durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Der Alkohol **106** wurde in einer exzellenten Ausbeute von 79% über 3 Stufen erhalten. Die Hydroxyfunktion wurde anschließend nach Standardbedingungen mesyliert und sofort in das entsprechende Azid überführt.⁶⁸ Dieses Rohprodukt **107** konnte danach mit Fluorwasserstoffsäure entschützt werden,⁷⁸ was das angestrebte Azid (*S,E*)-**88** in sehr guter Ausbeute (77% über 2 Stufen) nach Säulenchromatographie lieferte. Die sich anschließende SHARPLESS-Epoxidierung zu **87** verlief in Übereinstimmung mit der Literaturvorschrift^{62b} in fast quantitativer Ausbeute. Lediglich die Resultate bei der Oxidation zum Aldehyd **86** fielen sehr uneinheitlich aus. Die Ausbeute durch das bereits in Schema 24 verwendete Pyridiniumchlorochromat (COREY-Reagenz) erwies sich mit 51% als inakzeptabel. Über-

raschenderweise zeigte die sehr schonende Variante nach PARIKH-DOERING,⁷⁹ welche ähnlich der SWERN-Oxidation auf aktiviertem Dimethylsulfoxid basiert, ein noch schlechteres Ergebnis von nur 44%. Erst der Einsatz von DESS-MARTIN-Periodinan,⁸⁰ welches auf dem Prinzip von hypervalentem Iod basiert, lieferte den Aldehyd **86** in einer brauchbaren Ausbeute. Erwähnenswert ist, dass der Aldehyd nach erfolgter Umsetzung bereits ausreichende Reinheit besaß und keine Aufreinigung durch Chromatographie benötigte. Dies ist insofern wichtig, da diese Verbindung sich nur als leidlich stabil erwies und sofort weiter umgesetzt werden musste. Für die Synthese des Zielmoleküls wurde der Aldehyd **86** in THF gelöst und durch Zusatz von Triphenylphosphan eine intramolekulare aza-WITTIG-Reaktion^{60c} ausgelöst. Die Substanz wurde ähnlich wie der Naturstoff durch Säure/Base Extraktion aufgereinigt. Die Überführung der Substanz als Hydrochlorid in die HCl-Phase und mehrmaliges Waschen dieser Phase mit Chloroform und Diethylether lieferte nach Extraktion der dann alkalisch gestellten Phase die Reinsubstanz mit 99.5% chemischer Reinheit laut GC. Die stereochemische Zusammensetzung betrug: (2*S*,3*S*,1'*S*) / (2*R*,3*R*,1'*S*) / (2*S*,3*S*,1'*R*) = 97.5% / 1.5% / 1%.

Das Alkaloid Cicindeloin wurde somit in einer 12 Stufen-Synthese dargestellt. Ausgehend von Alkohol (*S*)-**98** beträgt die Gesamtausbeute ausgezeichnete 20%. Dadurch, dass nur in drei Fällen eine Säulenchromatographie notwendig ist und überwiegend leicht erhältliche und preiswerte Edukte und Reagenzien Verwendung finden, besitzt die Synthese ein hohes präparatives Potential.

2.3.3 Aufklärung der Absolutkonfiguration von Cicindeloin in *Stenus binotatus*

Wie bereits am Anfang dieses Abschnitts erwähnt, wurde im *Stenus*-Käfer *S. binotatus* eine Substanz als Minderkomponente gefunden, von der vermutet wurde, dass es sich um ein Diastereomer von Cicindeloin handelt. Diese Substanz zeigte ein identisches EI-MS, aber eine leicht verkürzte Retentionszeit auf achiraler stat. Phase (GC). Da es durch die Arbeiten in Abschnitt 2.3.2 gelang, alle potentiellen Stereoisomere auch an chiraler stat. Phase aufzutrennen und deren Absolutkonfigurationen zuzuordnen, konnte die Konfiguration des Isomers in *S. binotatus* leicht bestimmt werden. Der Drüsenextrakt von *S. binotatus* zeigte bei 24.27 min das zu bestimmende Isomer. Durch Coinjektion mit dem Extrakt aus *S. cicindeloides* (Abbildung 24) wurde die Differenz der Retentionszeiten auf 0.26 min bestimmt. Dies entspricht genau dem Abstand von (2*S*,3*S*,1'*R*)- zu (2*S*,3*S*,1'*S*)-**82** (siehe Abbildung 21). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch bei dem neu entdeckten Alkaloid Cicindeloin Unterschiede innerhalb der einzelnen Arten bezüglich der Stereoisomerenverteilung feststellbar

sind. Dieses Phänomen wurde auch für die Alkaloide Stenusin (**4**) und (*E*)- und (*Z*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**9**) beobachtet. Der biologische Hintergrund ist bis dato ebenso unklar wie im Falle von **4** und **9**.

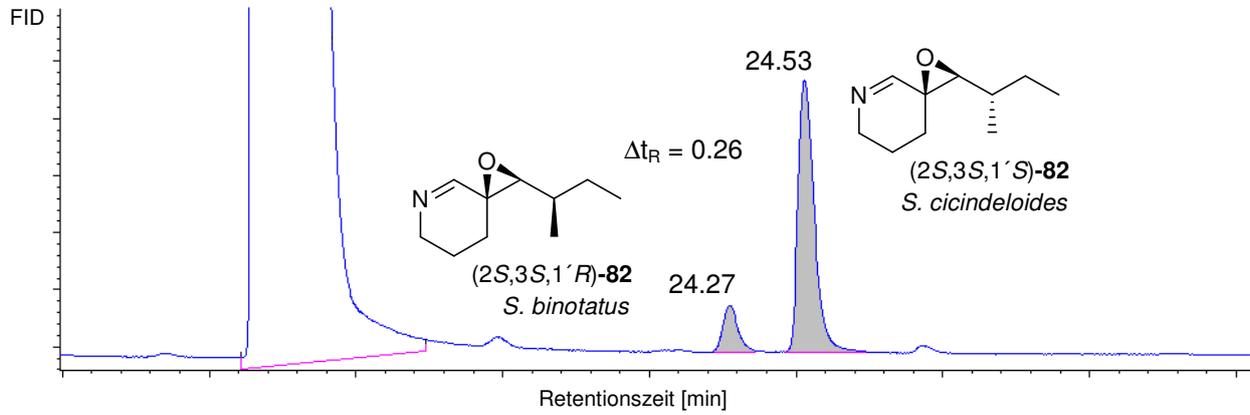


Abbildung 24: Gaschromatogramm an chiraler Phase einer Coinjektion der Pygidialdrüsenextrakte von *S. binotatus* und *S. cicindeloides*.

2.4 Synthese eines neuen marinen Indolalkaloids aus der Seeanemone *Heteractis aurora*

Die Glasperlen-Anemone *Heteractis aurora* gehört zur Ordnung der Seeanemonen (*Actiniaria*). Systematisch leitet sie sich vom Stamm der Nesseltiere (*Cnidaria*) und der Klasse der Blumentiere (*Anthozoa*) ab. Hierbei handelt es sich um solitär lebende, ausschließlich im Meer vorkommende, halbsessile wirbellose Tiere. Diese besitzen eine Fußscheibe, mit deren Hilfe sie sich im Meeresgrund verankern, aber auch langsam fortbewegen können. Ihr muskulöser Körper ist von radialer Symmetrie mit einer zentralen Mundöffnung, die von Tentakeln umgeben ist. An den Tentakeln befinden sich Nesselzellen (Nematocyten), welche bei mechanischer oder chemischer Reizung einen mit Toxinen beladenen Nesselschlauch ausstoßen. Die Tentakel werden zum Beutefang und zur Selbstverteidigung gegen Prädatoren eingesetzt und können ihre Beute direkt zur Mundöffnung transportieren. Die Anemonen ernähren sich hauptsächlich durch die in ihnen lebenden Symbiosealgen und sind außerdem mit Anemonenfischen, welchen sie Schutz bieten, vergesellschaftet.

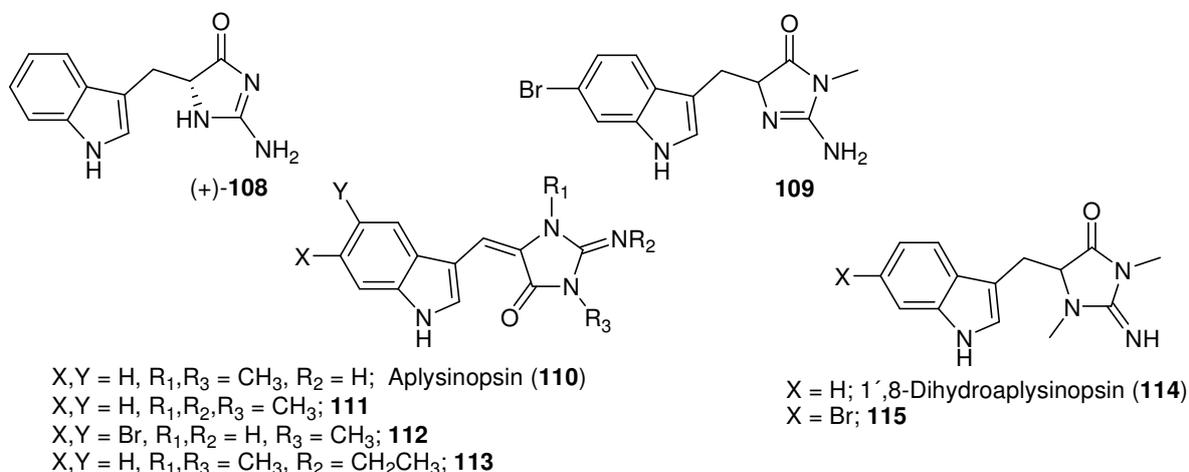
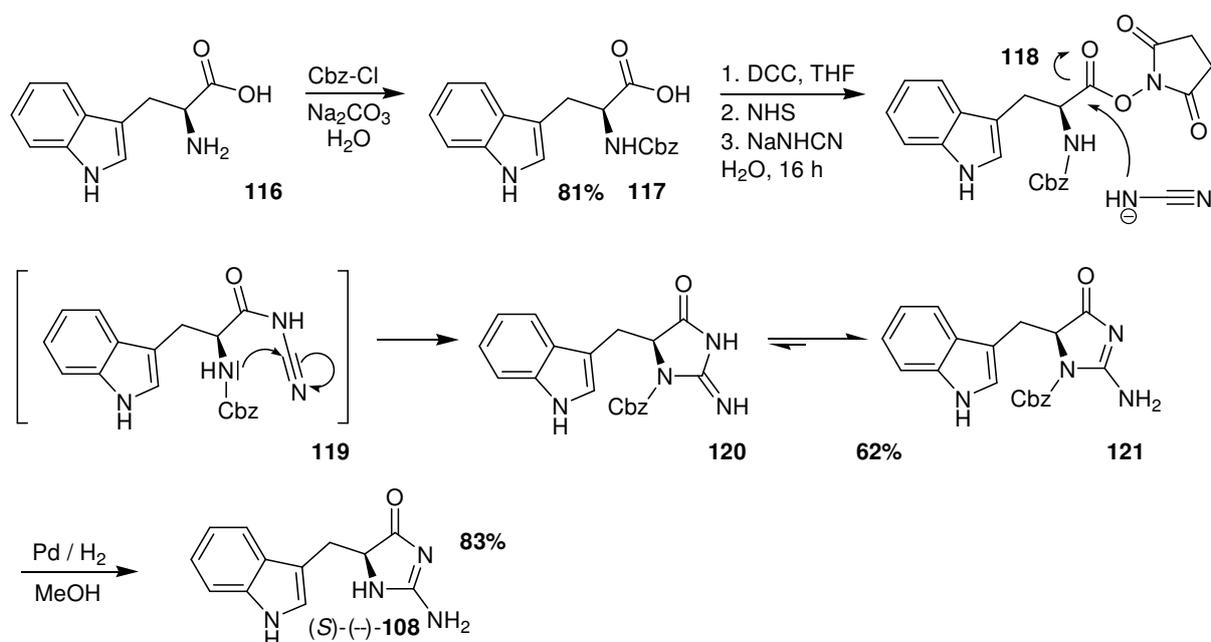


Abbildung 25: Neu isolierte marine Indolalkaloide **108** und **109** aus *H. aurora* und ausgewählte bereits bekannte Aplysinopsine.

Aus *H. aurora* wurden von K. SHAKER (AK SEIFERT) zwei neue Indolalkaloide **108**, **109** vom Aplysinopsin-Typ isoliert und deren Konstitution aufgeklärt (Abbildung 25). Das namensgebende Indolalkaloid Aplysinopsin (**110**) wurde 1997 erstmals von KAZLAUSKAS et al. in indopazifischen Schwämmen der Gattung *Theorecta* (später als *Aplysinopsis* bezeichnet) gefunden.⁸¹ Bis jetzt wurden über 30 natürlich vorkommende Aplysinopsin-Analoga, hauptsächlich aus marinen Schwämmen, Korallen und einer Seeanemone

(*Radianthus kuekenthali*), gefunden.⁸² Einige Vertreter dieses Strukturtyps zeigen pharmakologische Aktivitäten. Neben einer moderaten Wirkung gegen Krebszellen liegen die größten Potentiale dieser Substanzklasse in der Regulierung der Neurotransmission.⁸² Die Alkaloide **111** und **113** besitzen durch Hemmung der Monoaminoxidase (MAO)⁸³ und einer Modulation des Serotoninspiegels durch Affinität zu den 5-HT_{2A} und 5-HT_{2C} Rezeptoren⁸⁴ antidepressives Potential. Verbindung **112** zeigt eine selektive Hemmung der neuronalen NO-Synthase (nNOS).⁸⁵ Eine zu hohe Konzentration an NO führt zu Erkrankungen wie Dickdarmentzündung oder Schizophrenie.

Es wurde eine Synthesestrategie entwickelt, welche für **108**, **109** und auch für Derivate in Position 5 und 6 des Indolrings geeignet ist. Da der Naturstoff **108** eine positive optische Drehung zeigte, sollte durch Vergleich mit einer synthetischen Referenz die Absolute Konfiguration geklärt werden.

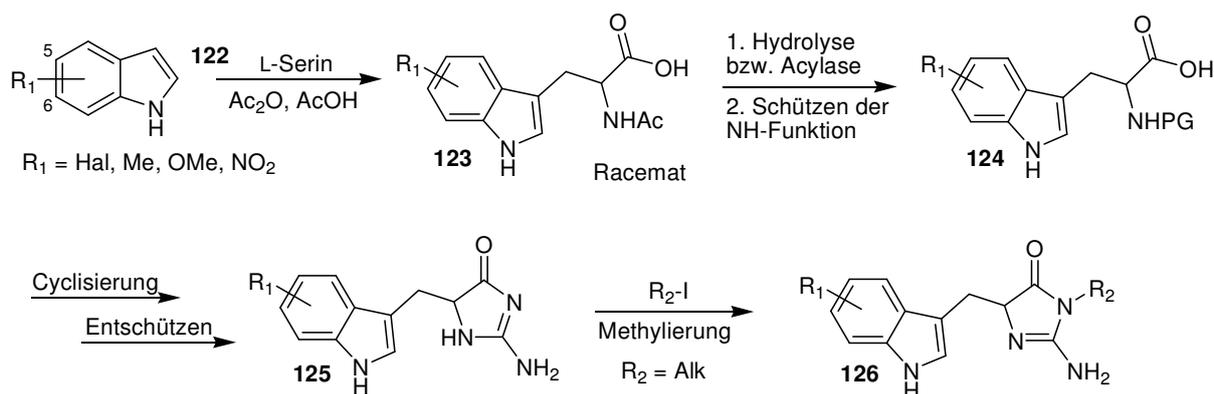


Schema 30: Aufklärung der Absolute Konfiguration des neuen marinen Indolalkaloids (*R*)-(+)-**108** durch Darstellung von dessen Enantiomer (*S*)-(-)-**108**.

Für den Heterocyclus in Verbindung **108**, welcher ein tautomeres Iminohydantoin darstellt, existiert bereits ein etabliertes Darstellungsverfahren durch Umsetzung einer einfach *N*-geschützten α -Aminocarbonsäure mit Natriumcyanamid (Schema 30)⁸⁶. L-Tryptophan (**116**) wurde demnach unter Standardbedingungen⁸⁷ Cbz-geschützt. Die so erhaltene geschützte Aminosäure **117** wurde anschließend im Zuge einer Eintopfreaktion zunächst mit *N*-Hydroxysuccinimid und DCC verestert. Anschließend wurde der aktivierte NHS-Ester **118**

in eine wässrige NaHNCN-Lösung⁸⁸ eingetragen und über Nacht zur Reaktion gebracht.^{86a} Das Cyanamid reagiert unter Spaltung des Esters mit der Carbonylfunktion zum Intermediat **119** und erleidet anschließend eine nukleophile Addition durch die Aminofunktion. Das entstehende Iminohydantoin **120** tautomerisiert vollständig zum Enamin **121**, welches mit akzeptabler Ausbeute nach Chromatographie (62%) isoliert werden konnte. Hydrogenolytische Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe lieferte schließlich die gewünschte Zielverbindung. Die so erhaltene Substanz (*S*)-**108** zeigte eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{23} = -6.1^\circ$, während für den Naturstoff $[\alpha]_D^{23} = +6.2^\circ$ gefunden wurde. Im Rahmen der Messgenauigkeit von Drehwerten muss es sich beim Naturstoff um das Enantiomer (*R*)-**108** handeln.

Diese Synthesestrategie sollte prinzipiell auch auf Verbindungen vom Typ **109** anwendbar sein (Schema 31). In Position 5 und 6 substituierte *N*-Acetyltryptophane **123** lassen sich als Racemat sehr einfach aus dem entsprechend substituierten Indol **122** und der Aminosäure L-SERIN darstellen.⁸⁹ Die Acetylgruppe kann nun chemisch (racemisch) oder mittels Acylase (enantioselektiv) abgespalten werden. Die Racematspaltung mittels Acylase liefert das entsprechende L-Tryptophan in hoher optischer Reinheit (91–99.9% ee) und toleriert eine Vielzahl an Substraten.⁸⁹ Nach Anbringen einer geeigneten Schutzgruppe, welche unter nicht hydrogenolytischen Bedingungen abgespalten werden kann (z.B. Boc) sollte sich analog Schema 30 Verbindung **125** bilden. Eine abschließende Methylierung durch ein Iodalkan in siedendem Ethanol sollte die gewünschte Zielverbindung **126** liefern.⁹⁰



Schema 31: Syntheseplanung für Aplysinopsin-Analoga vom Typ **109**.

2.5 Attraktive Wirkung des Blütenduftes von *Taccarum ulei* (Araceae) auf *Cyclocephala celata* und *C. latericia*

Die alleinig in Südamerika beheimatete Blütenpflanze *Taccarum ulei*, welche zur Familie der Aronstabgewächse gehört, ist für ihre Fortpflanzung ausschließlich auf die Bestäubung durch Blatthornkäfer der Arten *Cyclocephala celata* und *C. latericia* angewiesen (Abbildung 26).⁹¹ Diese erfolgt im Rahmen einer sehr spezialisierten Pflanze-Bestäuber-Interaktion. Zu Beginn der weiblichen Phase der Anthese kommt es zu einer starken Temperaturerhöhung⁹² (ca. 9 °C oberhalb der Umgebungstemperatur) von Spadix und Blütenstandskammer, begleitet von einer starken Duftstoffemission, was sowohl männliche als auch weibliche *Cyclocephala* anlockt. Diese nutzen die Blütenstandskammer, in der sich die weiblichen Blüten befinden, als Paarungsort und zur Nahrungsaufnahme. Durch Pollen, den sie von einem anderen Blütenstand mitgebracht haben, fungieren sie hierbei als effektive Bestäuber. Mit dem Beginn der männlichen Phase der Anthese (Tag 2) kommt es zu einer Verengung der Blütenstandskammer und zu einem erneuten Temperaturanstieg, was die anwesenden *Cyclocephala* Spezies nun auf den oberen Spadixteil, der die männlichen Blüten enthält, führt. Hierbei nehmen sie Pollen auf (Abbildung 26 d), welchen sie anschließend auf eine in der weiblichen Phase befindliche Inluoreszenz übertragen.

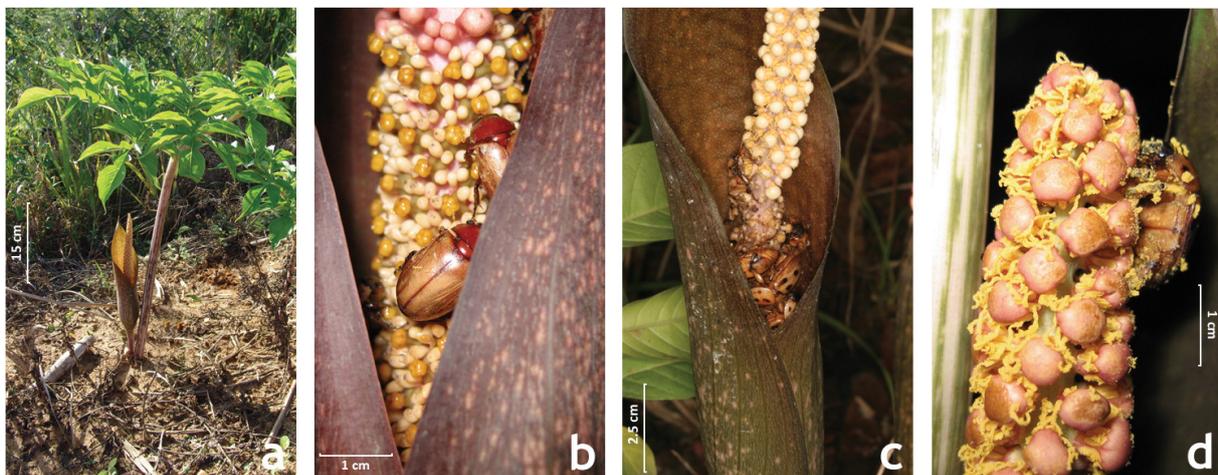
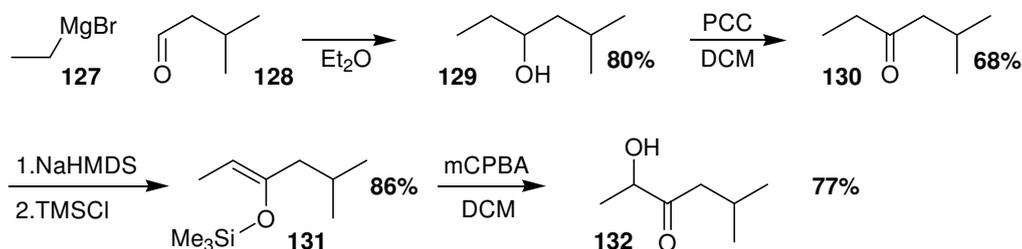


Abbildung 26: *Taccarum ulei*: a) Pflanze mit Blütenstand im natürlichen Habitat. b) *Cyclocephala celata* auf Spadixzone mit weiblichen Blüten. c) Gruppe von *C. latericia* bei der Nahrungsaufnahme. d) Mit Pollen bedeckter *C. latericia* auf männlicher Zone des Spadix vor dem Abflug. Foto: A.C.D. Maia, Dissertation, Universität Toulouse, 2011.

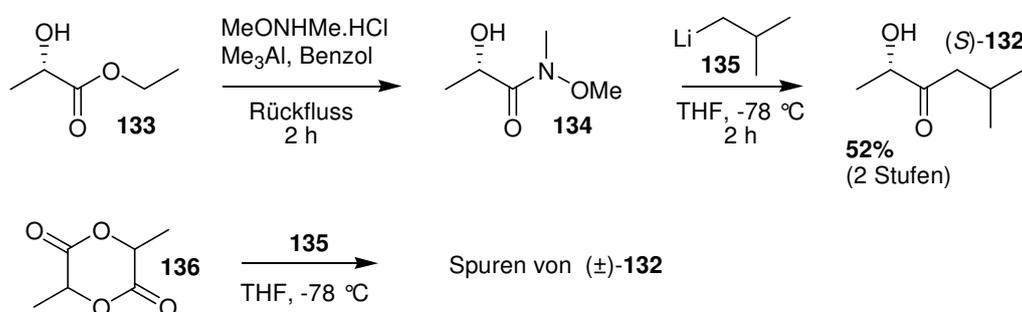
Während der thermischen Aktivität der Blütenstände wurde von S. DÖTTERL die gesamte Duftstoffemission mittels dynamischer Headspace-Analyse auf Tenax[®]-Polymer adsorbiert und per GC-MS qualitativ und quantitativ analysiert. Zwei Substanzen, das Acyloin 2-

Hydroxy-5-methylhexan-3-on (**132**) und das Terpen Dihydro- β -ionon im Verhältnis 4:1, repräsentierten zusammen 96% des Duftbouquets. Für die Klärung der Konfiguration an C-2 von **132** und spätere Biotests wurde ein enantiospezifischer Zugang benötigt, der für die Darstellung im einstelligen Gramm-Maßstab geeignet sein sollte. In der Literatur existierte lediglich eine erst kürzlich beschriebene Synthese,⁹³ welche von Isovaleraldehyd (**128**) ausgeht und durch GRIGNARD-Reaktion und anschließende Oxidation zum Keton **130** führt (Schema 32). Dieses wird in den Silylenolether **131** umgewandelt, der im Zuge einer RUBOTTOM-Oxidation⁹⁴ das Racemat von **132** liefert. Da diese Synthese nicht enantio-spezifisch durchgeführt werden kann und außerdem mit vier Stufen bereits als relativ aufwendig erschien, wurde ein anderer Ansatz gewählt.



Schema 32: Literatursynthese⁹³ für (±)-**132** in 4 Stufen ausgehend von Isovaleraldehyd (**128**).

(*S*)-**132** wurde in einer Zweistufensynthese aus (*S*)-(-)-Ethyllactat (**133**) dargestellt (Schema 33). Hierzu wurde die zuverlässige WEINREB-Ketonsynthese verwendet.⁹⁵ Das sehr preiswerte chirale Ausgangsmaterial **133** wurde mit *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid in Gegenwart von Trimethylaluminium in das WEINREB-Amid **134** überführt.^{95b} Dieses wurde als Rohprodukt bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ mit Isobutyllithium behandelt und lieferte so das gewünschte α -Hydroxyketon **132** in 52% Gesamtausbeute.



Schema 33: Synthese von (*S*)-2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (**132**) und Darstellung einer analytischen Probe von (±)-**132**.

Eine Coinjektion des Headspace Extraktes von *Taccarum ulei* und der synth. Substanz (*S*)-**132** mittels chiraler GC ergab lediglich einen symmetrischen Peak bei 20.5 min. Dies deutete sehr stark darauf hin, dass nur das reine (*S*)-Isomer natürlich vorkommt. Da es jedoch in Ausnahmefällen vorkommen kann, dass Enantiomere an Kapillarsäulen mit chiraler Trennflüssigkeit nicht trennbar sind, wurde eine analytische Probe von (\pm)-**132** dargestellt. Dafür wurde DL-Lactid (**136**) bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ebenfalls mit Isobutyllithium umgesetzt. Es entstand neben dem durch Überreaktion gebildenden *tert.*-Alkohol auch ein geringer Anteil an (\pm)-**132**. Dieses eluierte unter identischen GC-Bedingungen als Doppelpeak bei 20.4 und 20.5 min (Abbildung 27). Eine Coinjektion des synth. Racemats mit dem Naturstoff ergab eine Signal-erhöhung bei 20.5 min, während das Signal bei 20.4 min nun als Schulterpeak auftrat. Durch diese Untersuchungen konnte die Konfiguration im Naturstoff eindeutig auf (*S*)-**132** festgelegt werden.

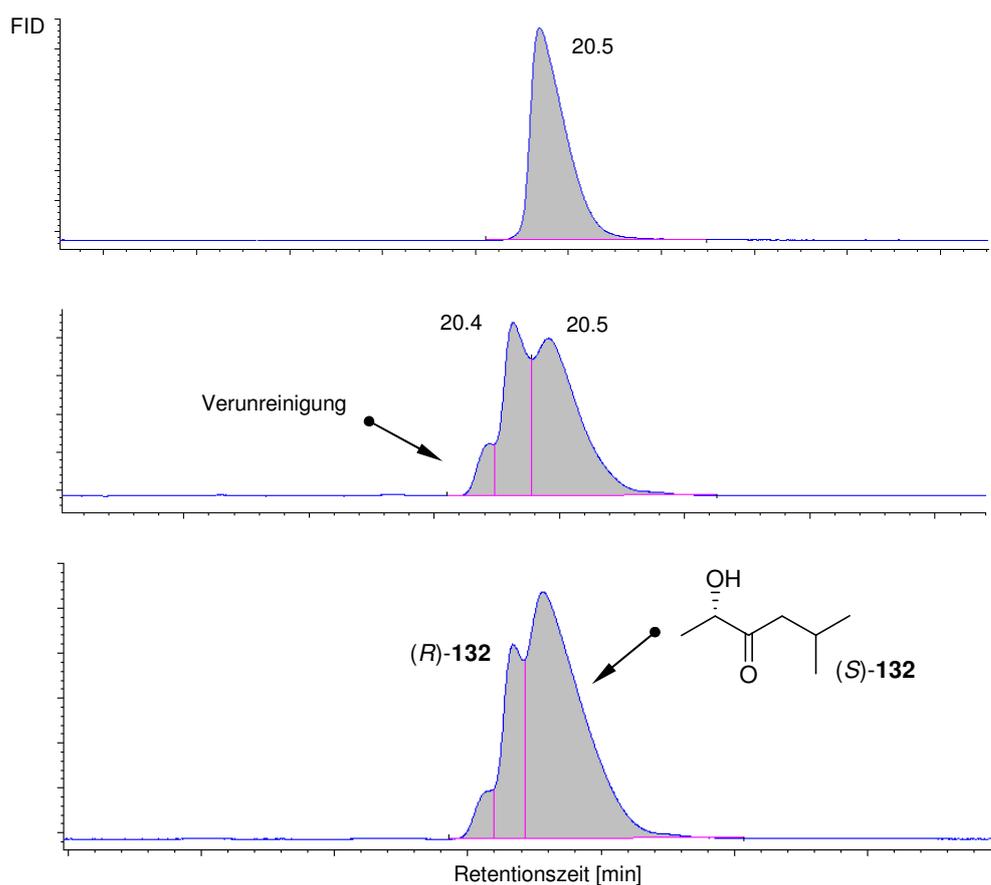


Abbildung 27: Chirale Gaschromatogramme der Coinjektion von synth. (*S*)-2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (**132**) mit dem Naturstoff aus *Taccarum ulei* (oben), synth. (\pm)-**132**, und Coinjektion von (\pm)-**132** mit dem Naturstoff (unten).

Um die attraktive Wirkung des Duftbouquets von *T. ulei* zu untersuchen, wurden von A. MAIA Biotests mit synthetischen Standards der Hauptkomponenten des Bouquets, (S)-**132** und Dihydro- β -ionon, durchgeführt. Hierfür wurden Käferfallen angefertigt, welche mit den jeweils reinen Substanzen und den in *T. ulei* vorkommenden Gemisch von (S)-**132** und Dihydro- β -ionon im Verhältnis 4:1 präpariert wurden (Abbildung 28). Als Kontroll-experiment diente jeweils eine Falle ohne Ködersubstanz. Die Verhaltenstests mit *C. celata* und *C. latericia* wurden in einem Flugkäfig oder im Freiland durchgeführt. Zusammenfassend wurde eine signifikant höhere Attraktivität der Fallen mit (S)-**132** alleine oder gemischt mit Dihydro- β -ionon gegenüber denen, welche nur das Terpen enthielten oder nicht präpariert waren, festgestellt. So konnten beispielsweise in zwei aufeinander folgenden Tests mit (S)-**132** zwölf Käfer, darunter sechs *C. latericia* und sechs *C. celata* gefangen werden, während kein Exemplar auf die Kontrollen ansprach. Geschlechterspezifische Unterschiede wurden sowohl bei *C. celata* als auch bei *C. latericia* nicht festgestellt. (S)-**132** zeigt demnach eine deutlich attraktive Wirkung auf beide Arten in purer oder mit Dihydro- β -ionon gemischter Form.



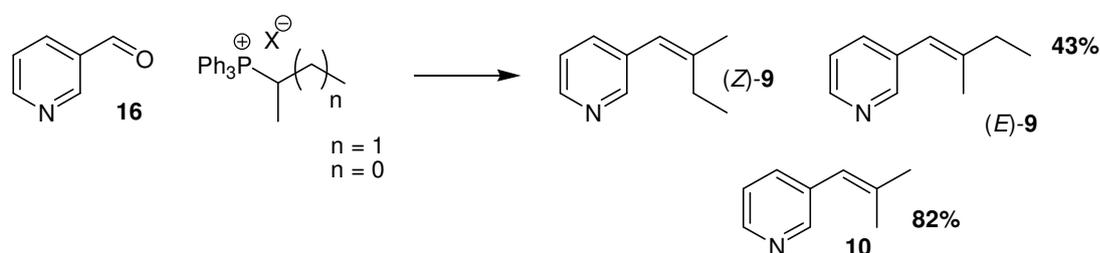
Abbildung 28: Für Biotest verwendete Käferfalle (Eigenbau) präpariert mit einer Probe von (S)-2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (**132**) als Ködersubstanz (links) und erfolgreich ange-lockter *C. celata* (rechts). Foto: PD Dr. Stefan Dötterl

Derartige Beobachtungen wurden bislang nur selten gemacht, da es ungewöhnlich ist, dass mit einzelnen Substanzen eine attraktive Wirkung bei Bestäubern hervorgerufen werden kann. In der Regel wird dies nur durch eine spezielle synergistische Wirkung vieler flüchtiger Einzelkomponenten ausgelöst.⁹⁶ Aliphatische Acyloine wie **132** wurden bisher nicht als

Lockstoffe in Blütenpflanzen gefunden. Verbindung **132** ist hauptsächlich als charakteristischer Inhaltsstoff in Eukalyptushonig bekannt.⁹⁷ Als synth. Aromastoff kann mit dieser Substanz in Lebensmitteln, wie z.B. Milchprodukten, das Geschmacksbild von Röstaromen erzeugt werden.⁹⁸ In einem einzigen Fall wurde diese Verbindung in Blütenpflanzen als Minderkomponente eines komplexen Duftbouquets identifiziert.⁹⁹

3. Zusammenfassung

Die neuen Pyridinalkaloide (*Z*)- und (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**9**) konnten jeweils in den Pygidialdrüsen der Kurzflügelkäfer *Stenus solutus* und *S. similis* als Hauptkomponenten nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 2.1). Die Norverbindung 3-(1-Isobutenyl)-pyridin (**10**) wurde als Minderkomponente in *S. solutus*, *S. cicindeloides*, *S. binotatus* und *S. pubescens* gefunden. Die Strukturen wurden durch NMR-Spektroskopie und Vergleich mit synthetischen Referenzen aufgeklärt. Die Pyridine wurden durch Umsetzung von Nicotinaldehyd (**16**) mit dem jeweiligen Phosphoniumsalz nach WITTIG in einer Stufe erhalten (Schema 34).



Schema 34: Synthese der neuen Pyridinalkaloide (*Z*)-, (*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridin (**9**) und 3-(1-Isobutenyl)-pyridin (**10**).

In Agardiffusionstests konnte gezeigt werden, dass die beiden Pyridine **9** als Abwehrsubstanz gegen insektenpathogene Bakterien wie z.B. *Serratia entomophila* dienen. Die antimikrobielle Wirkung von **9** übertraf die des Stenusins (**4**) leicht, welches als antimikrobieller Wirkstoff bereits bekannt ist (Abbildung 29).¹⁰⁰ Interessanterweise zeigte eine Mischung aus (*Z*)- und (*E*)-**9** (1.7:1) eine höhere Wirksamkeit als das pure (*Z*)-Isomer. In *S. similis* wurde ebenfalls eine Mischung mit erhöhtem Anteil an (*Z*)-**9** gefunden. Da *Steninae*, welche die Pyridinalkaloide **9** produzieren, nur sehr geringe Mengen Stenusin (**4**) enthalten, muss das Pyridin folglich die antimikrobielle Funktion von **4** übernehmen.

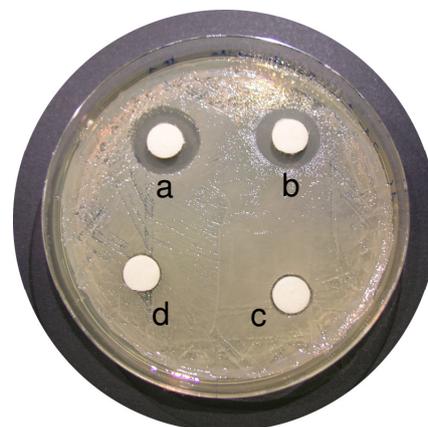


Abbildung 29: Hemmhofstest von (*E/Z*)-**9** (a), Stenusin (**4**) (b), 1,8-Cineol (c), Norstenusin (**5**) (d) gegen *Serratia entomophila*. Foto: Andreas Schierling, Tierökologie II, Universität Bayreuth.

Für das bekannte Spreitungs- und Abwehralkaloid Stenusin (**4**), welches in den meisten Käfern der Gattung *Stenus* vorkommt, wurde eine neuartige Syntheseroute (Schema 35) entwickelt (siehe Abschnitt 2.2). Die Stenusin (**4**) enthaltenden *Steninae* zeigen eine charakteristische Zusammensetzung aller vier Stereoisomeren. Dies konnte in einer Kooperation der Arbeitsgruppen SEIFERT und DETTNER eindeutig gezeigt werden. Alle bislang bekannten stereoselektiven Zugänge zu **4**, wie auch die auf der SAMP/RAMP-Methode basierende Varinate nach ENDERS et al.,¹⁷ erlauben nur die Darstellung der in der Seitenkette (*S*)-konfigurierten Alkaloide (*2S,3R*)- und (*2S,3S*)-**4**. Daher wurde eine neue Synthese entwickelt, die es erlaubt, alle Isomere selektiv darzustellen.

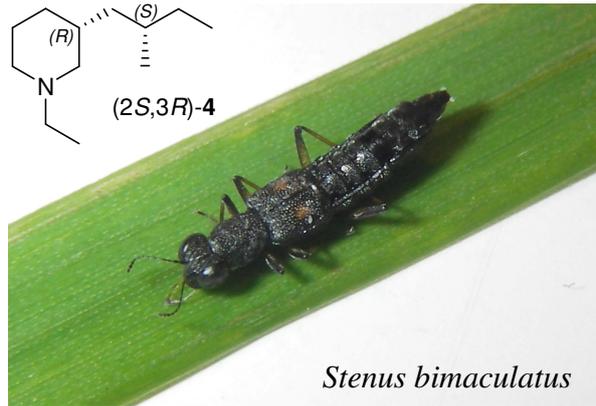
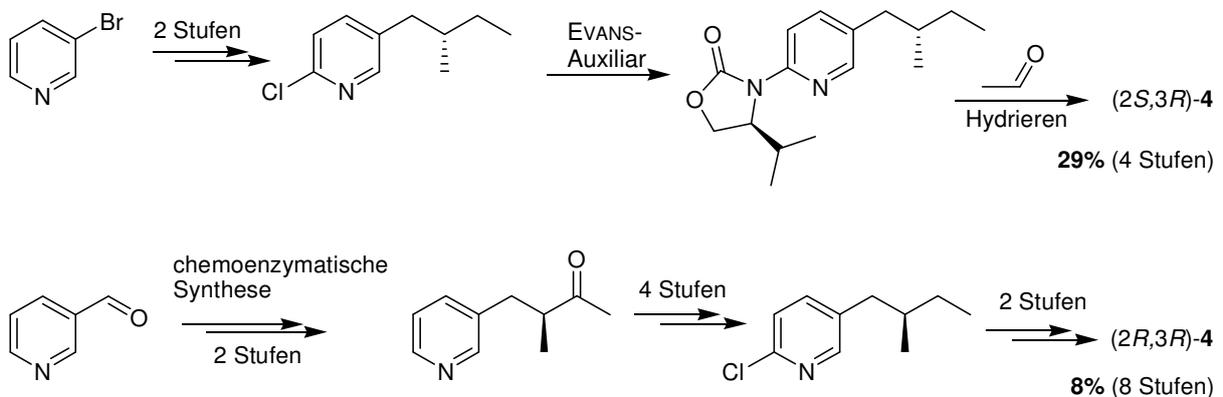
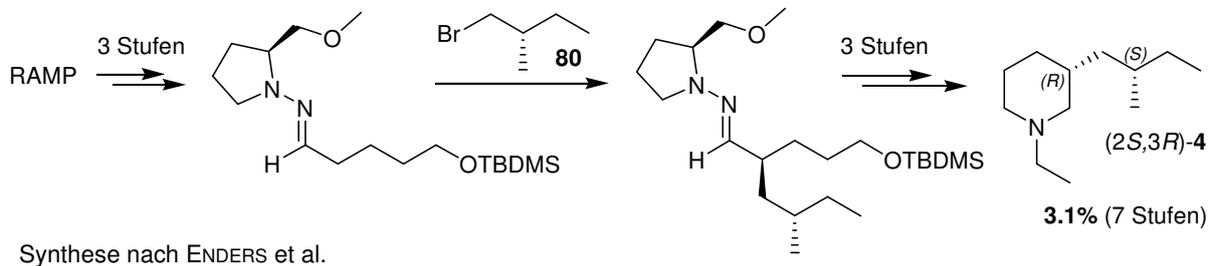


Abbildung 30: *S. bimaculatus* (GYLLENHAL 1810), welcher hauptsächlich (*2S,3R*)-**4** in den Pygidialdrüsen produziert. Foto: Dr. I. Lusebrink, Dissertation, Universität Bayreuth, 2007.



Schema 35: Überblick über die neu entwickelte Synthese aller Stereoisomere von Stenusin (**4**) (unten) im Vergleich zur bekannten Synthese nach ENDERS et al.¹⁷ (oben).

Das Stereozentrum im Piperidinring wird durch auxiliarvermittelte asymmetrische Hydrierung erzeugt, während die Seitenkette entweder aus dem chiralen Pool ((*S*)-2-Methylbutanol) entnommen wird – identisch mit der Variante nach ENDERS – oder mittels einer chemoenzymatischen Synthese erzeugt wird. Insbesondere die (*2S,3R*)- und (*2S,3S*)-Isomere lassen sich ausgehend von 3-Brompyridin und (*S*)-2-Methylbutylbromid (**80**) in einer sehr kurzen Sequenz von nur 4 Stufen in guter Ausbeute darstellen. Weiterhin erfolgt die gesamte Synthese frei von Schutzgruppen. Das verwendete EVANS-Auxiliar kann nach der Hydrierung unverändert wiedergewonnen werden. Im Gegensatz zur ENDERS-Synthese, wird das Auxiliar erst auf der vorletzten Stufe eingeführt, was den Verlust an „chiraler Information“ durch Zersetzung drastisch reduziert.

Das neue Alkaloid Cicindeloin (**82**) wurde aus *Stenus*-Käfern der Art *S. cicindeloides* isoliert und dessen Struktur durch NMR-Spektroskopie in Verbindung mit EI- und ESI-Massenspektroskopie aufgeklärt (siehe Abschnitt 2.3). Die Absolutkonfiguration von **82** konnte durch stereoselektive Totalsynthese (Abbildung 31) und GC-Vergleich mit dem Naturstoff an einer chiralen Phase bestimmt werden. Für **82** wurde ein totalsynthetischer Zugang mit 20% Gesamtausbeute entwickelt, der eine lineare Sequenz von 12 Stufen umfasst, von denen neun ohne Chromatographie auskommen. Die Synthese verwendet einfache und preiswerte Ausgangsmaterialien und ist problemlos im Gramm-Maßstab durchführbar.

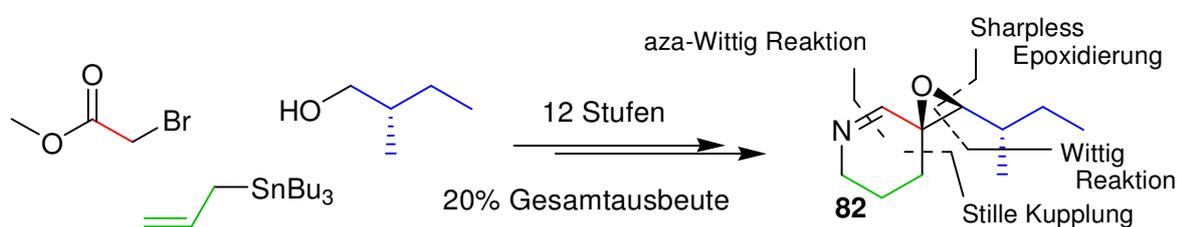
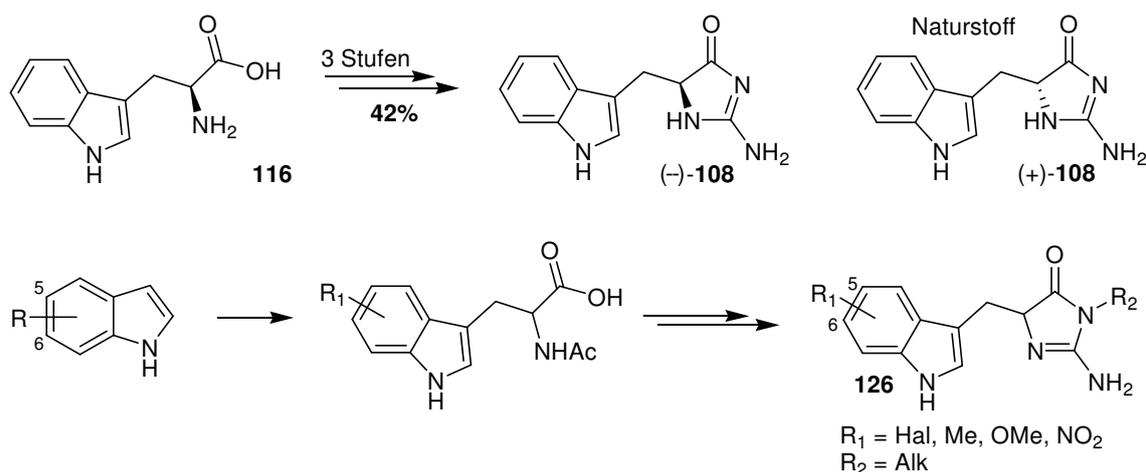


Abbildung 31: *Stenus cicindeloides* (SCHALLER 1783) und Totalsynthese des Alkaloids Cicindeloin (**82**). Foto: Dr. S. Kehl, Tierökologie II, Universität Bayreuth.

Insgesamt wurde ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Chemie von Wehrdrüsen-substanzen aus Kurzflügelkäfern (Staphylinidae) der Gattung *Stenus* geleistet. Durch die Bereitstellung von authentischen Referenzverbindungen mit erfolgter Zuordnung der

Absolutkonfigurationen ist es ab sofort möglich, auch weitere *Stenus*-Spezies hinsichtlich der Stereoisomerenverhältnisse von Stenusin, Norstenusin und Cicindeloin in ihren Pygidialdrüsen zu charakterisieren. Die nun in ausreichender Menge verfügbaren isomerenreinen Verbindungen können für biologische und pharmakologische Tests eingesetzt werden.

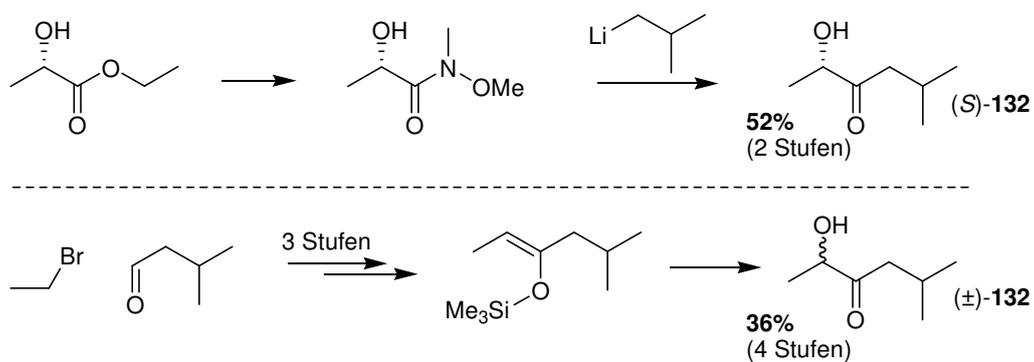
Die Absolutkonfiguration des neuen marinen Indolalkaloids (+)-**108**, welches aus der Seeanemone *Heteractis aurora* isoliert wurde, konnte durch Totalsynthese des Enantiomers (-)-**108** und Vergleich der optischen Drehungen aufgeklärt werden (siehe Abschnitt 2.4). Verbindung (-)-**108** wurde ausgehend von L-Tryptophan (**116**) in 3 Stufen mit 42% Gesamtausbeute erhalten (Schema 36). Dieses Alkaloid gehört zur Klasse der Aplysinopsine⁸² und ist daher von potentiell pharmakologischem Interesse. Die entwickelte Synthesestrategie (Schema 30, Schema 31) sollte sich prinzipiell auch für die Darstellung einer Vielzahl an Derivaten vom Typ **126** eignen.



Schema 36: Aufklärung der Absolutkonfiguration des neuen marinen Indolalkaloids (+)-**108** durch Synthese des entsprechenden Enantiomers (-)-**108** und Synthesepfung für Strukturanaloga **126**.

Das bislang vor allem als natürlicher und synthetischer Aromastoff in Spirituosen, Honig oder Milchprodukten bekannte Acyloin 2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (**132**) wurde als (*S*)-konfigurierte Verbindung als Locksubstanz im Blütenduft von *Taccareum ulei* identifiziert (siehe Abschnitt 2.5). Die Substanz macht ca. 76% des gesamten Duftbouquets aus und wirkte in Biotests auch in purer Form stark attraktiv auf Blatthornkäfer der Arten *Cyclocephala celata* und *C. latericia*. Die Konfiguration des Naturstoffs konnte durch Vergleich mit einer totalsynthetisch hergestellten Referenz aufgeklärt werden. Da keine Literatursynthese für (*S*)-**132** existierte, wurde ein einfacher Zugang in 2 Stufen, ausgehend von (*S*)-(-)-Ethyllactat, ausgearbeitet (Schema 37 oben). Die Synthese eignet sich problemlos für die Darstellung im Maßstab von 1-10 g. Diese neue Darstellungsvariante ist einer erst kürzlich publizierten

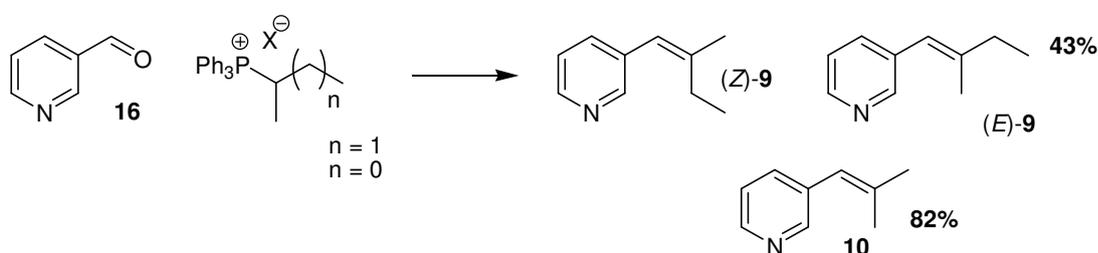
Synthese (Schema 37 unten),⁹³ welche sich ebenfalls nur für den Labormaßstab eignet und nur das Racemat liefert, in puncto Ausbeute und Stufenzahl deutlich überlegen.



Schema 37: Vergleich der neu entwickelten Synthese (oben) für (S)-2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (**132**) und der Literatursynthese (unten) nach TIAN et al.⁹³

4. Summary

Two new pyridine alkaloids (*Z*- and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**9**) were detected as main compounds in the pygidial glands of the *Stenus* species *Stenus solutus* and *S. similis*, respectively. The corresponding nor-compound 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**10**) was found as a minor ingredient in *S. solutus*, *S. cicindeloides*, *S. binotatus* and *S. pubescens*. The structures of the new alkaloids could be elucidated by means of NMR spectroscopy and a final comparison with authentic references. These compounds were obtained by WITTIG-olefination from nicotinic aldehyde (**16**) and the corresponding phosphonium salt in one single step (Scheme 34).



Scheme 34: Synthesis of the new pyridine alkaloids (*Z*-, (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**9**) and 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**10**).

Agar diffusion tests revealed that both the pyridines **9** act as deterrents against insect pathogenic bacteria such as *Serratia entomophila*. These pyridines showed a slightly higher antimicrobial activity than stenusine (**4**), which is already known as an antimicrobial agent (Figure 29).¹⁰⁰ Surprisingly, a mixture of (*Z*- and (*E*)-**9** (1.7:1) showed a higher activity than pure (*Z*)-**9**. This is interesting, because the pygidial glands of the species *S. similis* contain an isomeric mixture of **9** with an increased proportion of (*Z*)-**9** as well. It is therefore strongly assumed, that the pyridines **9** take a compensatory antimicrobial function, since *Stenus* beetles which produce them, contain only minor amounts of stenusine (**4**).

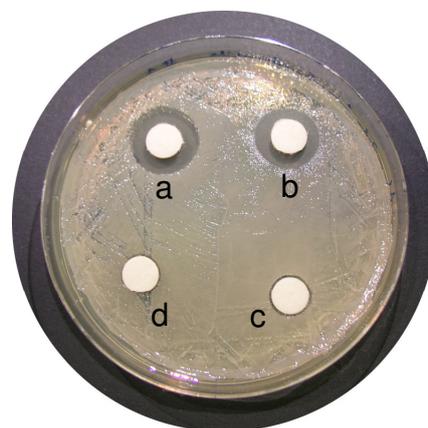


Figure 29: Agar diffusion test of (*E/Z*)-**9** (a), stenusine (**4**) (b), 1,8-cineole (c), norstenusine (**5**) (d) against *Serratia entomophila*. Picture: Andreas Schierling, Animal Ecology II, University of Bayreuth.

A new synthetic route, leading to all stereoisomers of the well-known spreading and defensive alkaloid stenusine (**4**), which can be found in most *Stenus* species, was developed (Scheme 35). This alkaloid plays a somewhat special role in nature, since depending on the observed species, all stereoisomers occur naturally in rather pure form or as a mixture of all four compounds. This could be unambiguously proven by the groups of SEIFERT and DETTNER. All known synthetic routes to stenusine, as well as the SAMP/RAMP approach by ENDERS et al,¹⁷ give only a direct access to the stereoisomers showing (*S*)-configuration in the side chain. Therefore a new synthetic route, providing a straightforward access to all stereoisomers, was developed.

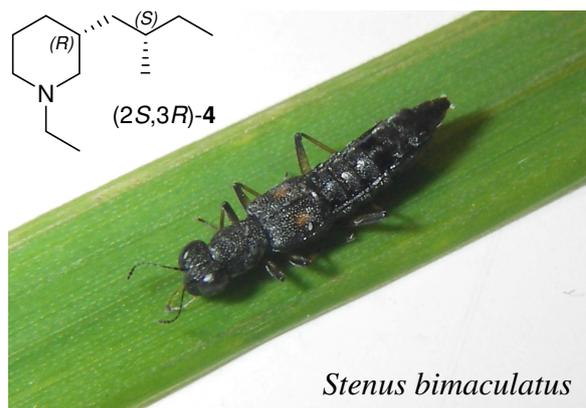
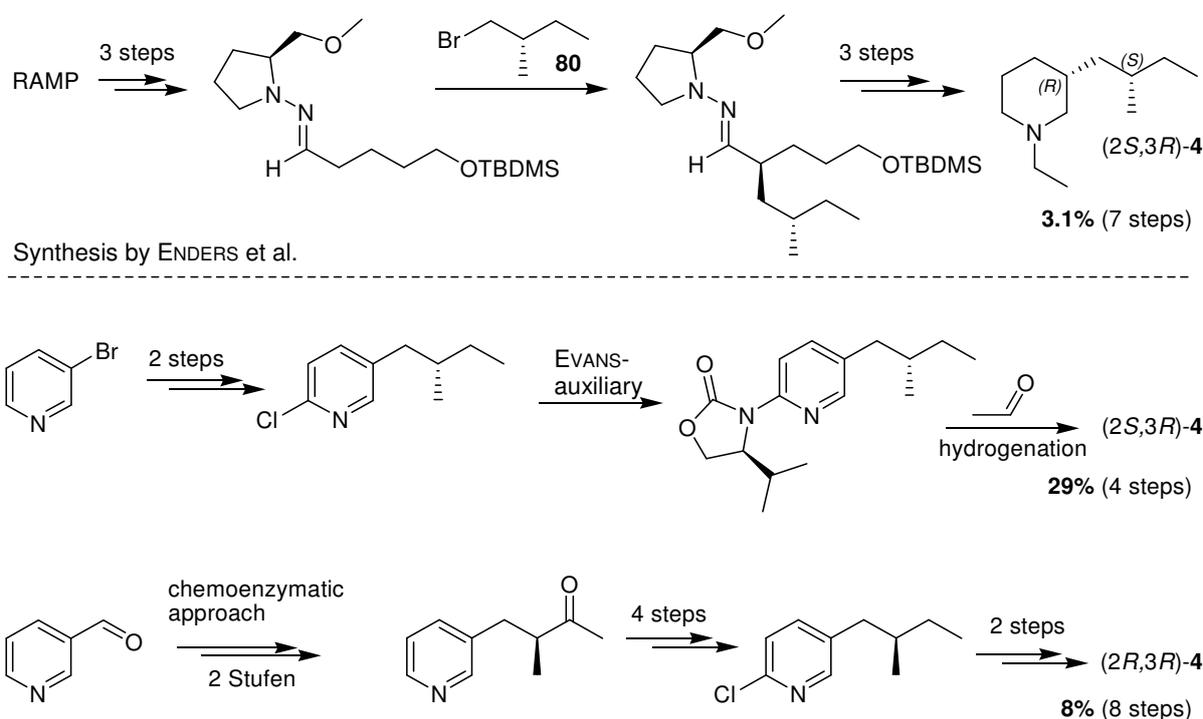


Figure 30: *S. bimaculatus* (GYLLENHAL 1810), producing mainly (2*S*,3*R*)-**4** in his pygidial glands. Picture: Dr. I. Lusebrink, Ph.D. Thesis, University of Bayreuth, 2007.



Scheme 35: New synthetic route leading to all stereoisomers of stenusine (**4**) (down) compared to the known synthesis by ENDERS et al.¹⁷ (top).

The stereogenic center in the piperidine ring is generated by an auxiliary-mediated asymmetric hydrogenation, whereas the chiral side chain derives either from the chiral pool in form of compound **80** – identical to the ENDERS protocol – or is constructed by means of a novel chemoenzymatic approach. Especially the (2*S*,3*R*)- and (2*S*,3*S*)-isomers can be obtained starting from 3-bromopyridine and (*S*)-2-methylbutylbromide (**80**) via a very short 4 step sequence in good yields by this new synthetic route. Furthermore, the synthesis as a whole can be carried out free of protecting groups. The employed EVANS-auxiliary is recovered unchanged after the final hydrogenation. In contrast to the ENDERS protocol, the chiral auxiliary is not introduced until the penultimate step, reducing the loss of chiral information by decomposition drastically.

The new alkaloid cicindeloin (**82**) has been isolated from *Stenus* beetles of the species *S. cicindeloides* and its structure was elucidated by combined analytic methods like NMR-spectroscopy, EI- and ESI-mass spectrometry. The absolute configuration of the natural alkaloid **82** could be assigned by GC-comparison on a chiral phase with an authentic reference obtained by stereoselective total synthesis. For this purpose, a stereoselective synthetic route was developed, comprising a linear sequence of 12 steps which an excellent total yield of 20% (Figure 31). It is noteworthy that nine out of twelve steps can be conducted without column chromatography and only very simple and inexpensive starting materials are employed. For these reasons, this synthesis can be easily carried out in gram scale.



Stenus cicindeloides

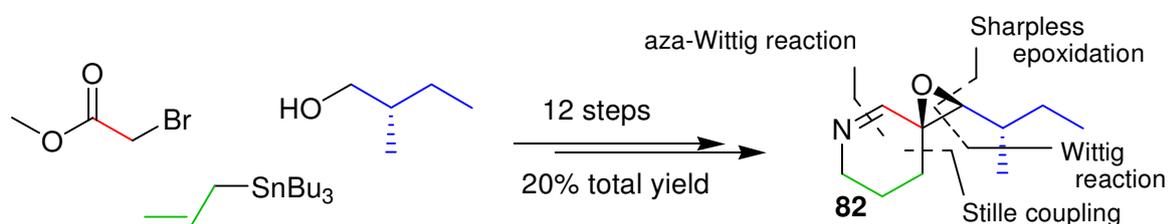
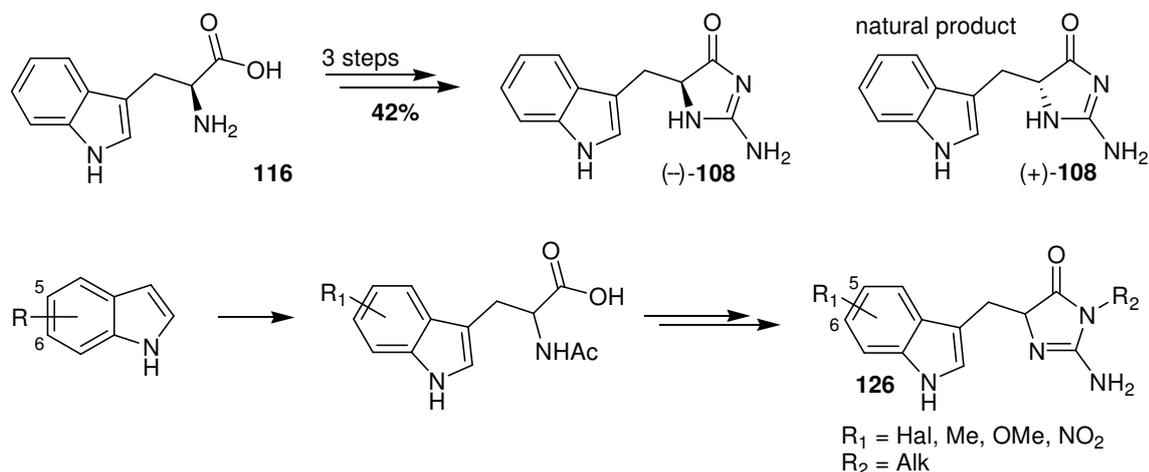


Figure 31: *Stenus cicindeloides* (SCHALLER 1783) and the total synthesis of the alkaloid cicindeloin (**82**). Picture: Dr. S. Kehl, Animal Ecology II, University of Bayreuth.

All in all, an important contribution was made to the comprehension of the defense chemistry from rove beetles (Staphylinidae) of the genus *Stenus*. With the authentic

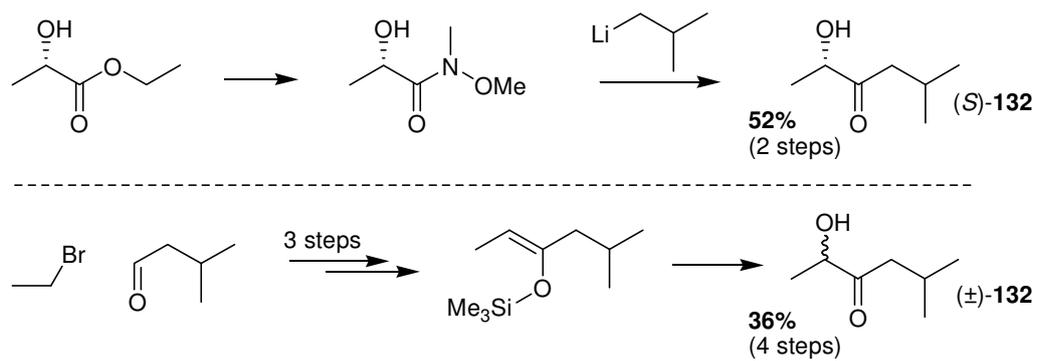
references in hands, it is now possible to characterise further *Stenus* species with respect to the stereoisomeric composition of stenusine, norstenusine and cicindeloin in their pygidial glands. All the above mentioned *Stenus* alkaloids, now available stereochemically pure in sufficient amounts, should be evaluated now in biological and pharmacological assays.

The absolute configuration of the new indole alkaloid (+)-**108**, isolated from the sea anemone *Heteractis aurora*, was assigned by total synthesis of its enantiomer (–)-**108** and comparison of the optical rotations. Compound (–)-**108** was obtained from L-tryptophan (**116**) as starting material in 3 steps with 42% total yield (Scheme 36). This compounds as well as the whole class of aplysinopsine-type alkaloids are of potential pharmacological interest. The used synthetic strategy for **108** should be applicable also for a variety of derivatives of the type **126**.



Scheme 36: Elucidation of the absolute configuration of the new indole alkaloid (+)-**108** by synthesis of its enantiomer (–)-**108** and planned synthesis for derivatives of the type **126**.

The acyloin 2-hydroxy-5-methylhexan-3-one (**132**), so far known as a natural and synthetic flavoring in spirituous beverages, honey and dairy products, was found as an attractant in the floral scent of *Taccarum ulei* in form of its (*S*)-enantiomer. This compound accounts for about 76% of the overall scent emission and showed a high attraction to scarab beetles of the species *Cyclocephala celata* and *C. latericia*. The configuration of this natural product was assigned by comparison with an authentic reference. Since no synthesis for (*S*)-**132** had been published, a simple two step sequence starting from (*S*)-(-)-ethyl lactate was developed (Scheme 37). This synthesis is ideal for the preparation of (*S*)-**132** in the range of 1-10 g. Furthermore, this new approach is much better than an already known four step lab-scale synthesis for **132** leading to the racemate only.



Scheme 37: Comparison of the new synthetic approach for (*S*)-2-hydroxy-5-methylhexan-3-one (**132**) (top) and literature synthesis by TIAN et al.⁹³ (down)

5. Literaturverzeichnis

- ¹ E. Breitmaier, *Alkaloide – Betäubungsmittel, Halluzinogene und andere Wirkstoffe, Leitstrukturen aus der Natur*, Vieweg+Teubner Verlag, 3. Auflage, **2008**.
- ² a) F. W. A. Sertürner, *Journal der Pharmacie* **1805**, 14, 47; b) F. W. A. Sertürner, *Annalen der Physik* **1817**, 55, 56.
- ³ a) J. M. Gulland, R. Robinson, *J. Chem. Soc.* **1923**, 123, 980–998; b) J. M. Gulland, R. Robinson, *Mem. Proc. Manchester Lit. Phil. Soc.* **1925**, 69, 79.
- ⁴ M. Mackay, D. C. Hodgkin, *J. Chem. Soc.* **1955**, 3261–3267.
- ⁵ a) M. Gates, G. Tschudi, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1109–1110; b) M. Gates, G. Tschudi, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1380–1393.
- ⁶ T. Hudlický: J. W. Reed, *The Way of Synthesis – Evolution of Design and Methods for Natural Products*, Wiley-VCH, Weinheim **2007**.
- ⁷ W. Meissner, *J. Chemie und Physik* **1819**, 25, 379.
- ⁸ M. Hesse, *Alkaloide - Fluch oder Segen der Natur*. Wiley-VCH, Zürich **2000**.
- ⁹ A. Ladenburg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, 19, 439.
- ¹⁰ A. Huth, K. Dettner, *J. Chem. Ecol.* **1990**, 16, 2691–2711.
- ¹¹ G. Habermehl, P. E. Hammann, H. C. Krebs, *Naturstoffchemie – Eine Einführung*, Springer Berlin-Heidelberg, 2. Auflage, **2002**.
- ¹² H. Schildknecht, *Angew. Chem.* **1970**, 82, 17–25.
- ¹³ H. Schildknecht, K. Holoubek, *Angew. Chem.* **1961**, 73, 1–7.
- ¹⁴ G. Billard, C. Bruyant, *C. R. Acad. Sci. Soc. Biol.* **1905**, 59, 102–103.
- ¹⁵ *New Scientist* **1964**, (No. 395).
- ¹⁶ H. Schildknecht, *Angew. Chem.* **1976**, 88, 235–272.
- ¹⁷ D. Enders, J. Tiebes, N. De Kimpe, M. Keppens, C. Stevens, G. Smagghe, O. Betz, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4881–4884.
- ¹⁸ I. Lusebrink, D. Burkhardt, T. Gedig, K. Dettner, A. Mosandl, K. Seifert, *Naturwissenschaften* **2007**, 94, 143–147.
- ¹⁹ I. Lusebrink, K. Dettner, K. Seifert, *Naturwissenschaften* **2008**, 95, 751–755.
- ²⁰ I. Lusebrink, K. Dettner, K. Seifert, *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 743–745.
- ²¹ I. Lusebrink, Dissertation, Universität Bayreuth, **2007**
- ²² H. J. Bestmann, O. Kratzer, *Chem. Ber.* **1963**, 96, 1899–1908.
- ²³ A. L. P. Nery, D. Weiß, L. H. Catalani, W. J. Baader, *Tetrahedron* **2000**, 56, 5317–5327.
- ²⁴ R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, 3. Auflage, Elsevier – Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **2004**
- ²⁵ a) M. Schlosser, K. F. Christmann, *Angew. Chem.* **1966**, 78, 115; b) M. Schlosser, K.-F. Christmann, *Synthesis* **1969**, 38–39; c) M. Schlosser, K.-F. Christmann, A. Piskala, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 2814–2820.
- ²⁶ G. Wittig, *Angew. Chem.* **1940**, 53, 241–247.
- ²⁷ Y. Nishikawa, T. Shindo, K. Ishii, H. Nakamura, T. Kon, H. Uno, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 583–593.

- ²⁸ W. C. Still, C. Gennari, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4405–4408.
- ²⁹ a) G. Fouquet, M. Schlosser, *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 50–51; b) J. Matikainen, S. Kaltia, T. Hase, *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 195–201.
- ³⁰ V. J. Lee, A. R. Branfman, T. R. Herrin, K. L. Rinehart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4225–4236.
- ³¹ K. Tanaka, H. Horiuchi, H. Yoda, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 63–70.
- ³² X. Wang, W. Zeng, Y. Zhou, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4922–4924
- ³³ F. Glorius, N. Spielkamp, S. Holle, R. Goddard, C. W. Lehmann, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2910–2913; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2850–2852.
- ³⁴ T. Gedig, K. Dettner, K. Seifert, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2670–2674.
- ³⁵ A. Klapars, X. Huang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7421–7428.
- ³⁶ a) J. Mathieu, P. Gros, Y. Fort, *Chem. Commun.* **2000**, 951–952; b) P. Gros, S. Choppin, J. Mathieu, Y. Fort, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 234–237; c) U. Kiehne, J. Bunzen, H. Staats, A. Lützen, *Synthesis* **2007**, 1061–1069.
- ³⁷ a) K. Tamao, S. Kodama, I. Nakajima, M. Kumada, A. Minato, K. Suzuki, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3347–3354; b) P. Pino, O. Piccolo, B. Straub, G. Consiglio, D. C. Tran, *Helv. Chim. Acta.* **1982**, *65*, 2102–2109.
- ³⁸ Y. Kawai, M. Hayashi, N. Tokitoh, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3007–3013.
- ³⁹ a) C. Neuberg, A. Levite, *Biochem. Z.* **1918**, *91*, 257–266; b) N. Hoffmann, *Chem. Unserer Zeit* **1996**, *30*, 201–213; c) O. Rotthaus, D. Krüger, M. Demuth, K. Schaffner, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 935–938; d) M. Wolberg, I. A. Kaluzna, M. Müller, J. D. Stewart *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2825–2828; e) T. Katoh, S. Mizumoto, M. Fudesaka, M. Takeo, T. Kajimoto, M. Node, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1655–1662; f) X. Wang, J. Cui, W. Ren, F. Li, C. Lu, X. Qian, *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 681–684.
- ⁴⁰ Z. E. Wilson, A. M. Heapy, M. A. Brimble, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5379–5385.
- ⁴¹ J. Mulzer, C. Seilz, W. Reutter, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 957–960.
- ⁴² R. C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations Second Edition*, Wiley, New York, **1999**.
- ⁴³ E. Clemmensen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1913**, *46*, 1837–1843.
- ⁴⁴ L. Wolff, *Liebigs Ann. Chem.* **1912**, *394*, 86–108.
- ⁴⁵ H. Gerlach, E. Huber, *Helv. Chim. Acta* **1968**, *51*, 2027.
- ⁴⁶ a) L. Caglioti, *Tetrahedron* **1966**, *22*, 487–493; b) R. O. Hutchins, C. A. Milewski, B. E. Maryanoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* 3662–3668; c) G. W. Kabalka, J. D. Baker, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1834–1835; d) G. W. Kabalka, S. T. Summers, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1217–1218; e) M. Badioli, R. Ballini, M. Bartolacci, G. Bosica, E. Torregiani, E. Marcantoni, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8938–8942.
- ⁴⁷ J. E. Johnson, R. H. Blizzard, H. W. Carhart, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3664–3665.
- ⁴⁸ H. C. Brown, S. Krishnamurthy, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *95*, 1669–1671.
- ⁴⁹ a) J. Cason, J. S. Correia, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3645–3649; b) K. L. Wooley, C. J. Hawker, J. M. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4252–4261; c) C. Timm, M. Köck, *Synthesis* **2006**, *15*, 2580–2584; d) T. Müller, Diplomarbeit, Universität Bayreuth, **2007**.
- ⁵⁰ J. Krauss, F. Bracher, *Arch. Pharm. Med. Chem.* **2004**, *337*, 371–375.
- ⁵¹ H. B. Henbest, W. R. Jackson, *J. Chem. Soc.* **1962**, 954.
- ⁵² D. Crich, L. Quintero, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1413–1432.
- ⁵³ D. K. Mohapatra, S. R. Chaudhuri, G. Sahoo, M. K. Gurjar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2609–2616.
- ⁵⁴ D. A. Evans, A. S. Kim, R. Metternich, V. J. Novack, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5921–5942.

- ⁵⁵ K. Jones, M. L. Escudero-Hernandez, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2275–2280.
- ⁵⁶ a) A. O. King, N. Okukado, E. Negishi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 683–684. b) S. Huo, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 423–425. c) Y. A. Getmanenko, R. J. Twieg, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 830–839.
- ⁵⁷ D. Ruckdeschel, Diplomarbeit, Universität Bayreuth, **1996**
- ⁵⁸ G. Billard, C. Bruyant, *C. R. Acad. Sci. Soc. Biol.* **1905**, *59*, 102–103.
- ⁵⁹ G. P. Johnson, B. A. Marples, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4115–4118.
- ⁶⁰ a) H. Staudinger, I. Meyer *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635; b) P. H. Lambert, M. Vaultier, R. Carrié, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1224–1225; c) D. R. Williams, D. L. Brown, J. W. Benbow, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1923–1925; d) F. Palacios, C. Alonso, D. Aparicio, G. Rubiales, J. de los Santos, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 523–575.
- ⁶¹ N. de Kimpe, M. A. Keppens, C. V. Stevens, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4693–4696.
- ⁶² a) T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974–5976; b) I. Larrosa, M. I. Da Silva, P. M. Gmez, P. Hannen, E. Ko, S. R. Lenger, S. R. Linke, A. J. P. White, D. Wilton, A. G. M. Barrett, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14042–14043.
- ⁶³ a) L. Horner, H. Hoffmann, H. G. Wippel, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 61–63; b) W. S. Wadsworth, W. D. Emmons, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1733–1738; c) R. Yefidoff, A. Albeck, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8093–8102.
- ⁶⁴ W. M. Tokan, F. E. Meyer, S. Schweizer, P. J. Parsons, A. de Meijere, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 6152–6167.
- ⁶⁵ S. Kang, W. Kim, B. Moon, *Synthesis*, **1985**, 1161–1162.
- ⁶⁶ C. Bürgi, G. Liu, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta.* **1993**, *76*, 1901–1915.
- ⁶⁷ a) A. E. G. Miller, J. W. Biss, L. H. Schwartzman, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 627–630; b) S. Gemma, E. Gabellieri, S. Coccone, F. Martí, O. Tagliatalata-Scafati, E. Novellino, G. Campiani, S. Butini, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2333–2340.
- ⁶⁸ S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, *Synthesis* **1997**, 413–414.
- ⁶⁹ L. F. Tietze, R. R. Singidi, K. M. Gericke, H. Böckemeier, H. Laatsch, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5875–5878.
- ⁷⁰ E. Tyrrell, G. A. Skinner, J. Janes, G. Milsom, *Synlett*, **2002**, *7*, 1073–1076.
- ⁷¹ H. Akao, H. Kiyota, T. Nakajima, T. Kitahara, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 7757–7770.
- ⁷² G. J. Gordon, Dissertation, Universität Bayreuth, **2004**.
- ⁷³ P. L. Anelli, F. Montanari, S. Quici, *Org. Synth.* **1990**, *69*, 212–219.
- ⁷⁴ B. M. Trost, G. D. Probst, A. Schoop, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9228–9236.
- ⁷⁵ J. K. Stille, B. L. Groh, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 813–817.
- ⁷⁶ P. Bury, G. Hareau, P. Kocienski, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8793–8808.
- ⁷⁷ M. Tokumasu, H. Ando, Y. Hiraga, S. Kojima, K. Ohkata, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 489–496.
- ⁷⁸ R. F. Newton, D. P. Reynolds, M. A. Finch, D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *41*, 3981–3982.
- ⁷⁹ a) J. R. Parikh, W. Doering, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5505–5507; b) Q. Zhang, H. Jin, Y. Wu, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11627–11634.
- ⁸⁰ a) D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155–4156; b) S. M. Ceccarelli, U. Piarulli, C. Gennari, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8531–8542.
- ⁸¹ R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. J. Quinn, R. J. Wells, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *1*, 61–64.
- ⁸² D. Bialonska, J. K. Zjawiony, *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 166–183.

-
- ⁸³ J. Baird-Lambert, P. A. Davis, K. M. Taylor, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1982**, *9*, 203–212.
- ⁸⁴ J. Hu, J. A. Schetz, M. Kelly, J. Peng, K. K. H. Ang, H. Flotow, C. Yan Leong, S. B. Ng, A. D. Buss, S. P. Wilkins, M. T. Hamann, *J. Nat Prod.* **2002**, *65*, 476–480.
- ⁸⁵ S. Aoki, Y. Ye, K. Higuchi, A. Takashima, Y. Tanaka, I. Kitagawa, M. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1372–1374.
- ⁸⁶ a) C. Kwon, M. Tahir Iqbal, J. N. D. Wurpel, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1845–1849; b) Z. Sun, C. Kwon, J. N. D. Wurpel, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2841–2845.
- ⁸⁷ Y. Konda-Yamada, C. Okada, K. Yoshida, Y. Umeda, S. Arima, N. Sato, T. Kai, H. Takayanagi, Y. Harigaya, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7851–7861.
- ⁸⁸ S. Weiss, H. Krommer, *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 590.
- ⁸⁹ G. Blaser, J. M. Sanderson, A. S. Batsanov, J. A. K. Howard, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2795–2798.
- ⁹⁰ G. L. Kenyon, G. L. Rowley, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 5552–5560.
- ⁹¹ a) G. Gottsberger, *Plant Syst. Evol.* **1986**, *152*, 29–45; b) P. Bernhardt, *Plant Syst. Evol.* **2000**, *222*, 293–320.
- ⁹² A. C. D. Maia, C. Schlindwein, *Plant Biol.* **2006**, *8*, 529–534.
- ⁹³ H. Tian, H. Ye, B. Sun, Y. Wang, *J. Chem. Res.* **2011**, *35*, 51–52.
- ⁹⁴ G. M. Rubottom, M. A. Vazquez, D. R. Pelegrina, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *49*, 4319–4322.
- ⁹⁵ a) S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818; b) G. P. Luke, J. Morris, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3013–3019.
- ⁹⁶ R. Raguso, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2008**, *39*, 549–569.
- ⁹⁷ E. de la Fuente, R. Valencia-Barrera, I. Martínez-Castro, J. Sanz, *Food Chem.* **2007**, *103*, 1176–1180.
- ⁹⁸ M. Gautschi, L. Ibanez, *Eur. Pat. Appl.* **1999**, EP 952140 .
- ⁹⁹ S. D. Johnson, M. E. Griffiths, C. I. Peter, M. J. Lawes, *Am. J. Bot.* **2009**, *96*, 2080–2086.
- ¹⁰⁰ I. Lusebrink, K. Dettner, A. Schierling, T. Müller, C. Daolio, B. Schneider, J. Schmidt, K. Seifert, *Z. Naturforsch. C* **2009**, *64*, 271–278.

6. Darstellung des Eigenanteils

Da die einzelnen Arbeiten in Zusammenarbeit mit anderen Autoren entstanden, wird im Folgenden der jeweilige Eigenanteil dargelegt.

New Pyridine Alkaloids from Rove Beetles of the Genus *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae)

Inka Lusebrink, Konrad Dettner, Andreas Schierling, Tobias Müller, Cristina Daolio, Bernd Schneider, Jürgen Schmidt, and Karlheinz Seifert*

Z. Naturforsch. C **2009**, *64*, 271-278.

Die Strukturvorschläge der Alkaloide wurden von mir erarbeitet. Alle synthetischen Untersuchungen wurden von mir ausgeführt. Die Teile des Manuskripts, welche Darstellung, Massenspektrometrie und Strukturaufklärung der Alkaloide betreffen, wurden von mir verfasst.

Straightforward Synthesis of all Stenusine and Norstenusine Stereoisomers

Tobias Müller, Konrad Dettner, and Karlheinz Seifert*

Eur. J. Org. Chem. **2011**; published online.

Die Synthesestrategie wurde von mir erarbeitet. Alle präparativen Arbeiten wurden von mir ausgeführt und das Manuskript wurde von mir verfasst.

Cicindeloine from *S. cicindeloides* – Isolation, Structure Elucidation and Total Synthesis

Tobias Müller, Matthias Göhl, Inka Lusebrink, Konrad Dettner, and Karlheinz Seifert*

Chem. Eur. J.; submitted.

Die Käfer von *S. cicindeloides* wurden von Inka Lusebrink gesammelt und der Wehrdrüsenextrakt präpariert. Alle übrigen Untersuchungen wurden von Matthias Göhl und mir ausgeführt. Matthias Göhl erarbeitete die Ergebnisse im Rahmen seiner Bachelor Arbeit und zweier Praktika unter meiner Anleitung. Die Syntheseplanung stammt von mir und ich habe das Manuskript verfasst.

Indole Alkaloids from the Sea Anemone *Heteractis aurora* and Homarine from *Octopus cyanea*

Kamel H. Shaker, Tobias Müller, and Karlheinz Seifert*

Chem. & Biodiv.; to be submitted

Die Synthese zur Aufklärung der Absolutkonfiguration des neuen marinen Indolalkaloids wurde von mir ausgeführt. Die Teile des Manuskripts, welche obige Untersuchungen enthalten, wurden von mir verfasst.

The floral scent of *Taccarum ulei* (Araceae): attraction of scarab beetle pollinators to an unusual aliphatic acyloin

Artur Campos Dália Maia, Stefan Dötterl, Tobias Müller, Karlheinz Seifert, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro, Clemens Schlindwein, and Marc Gibernau

J. Chem. Ecol.; to be submitted.

Die Synthese sowie die Aufklärung der Absolutkonfiguration des neu entdeckten Blütenlockstoffes (*S*)-2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on wurde von mir ausgeführt. Die Teile des Manuskripts, welche die Darstellung und die Klärung der Konfiguration des Naturstoffs betreffen, wurden von mir verfasst.

7. Publikationen und Manuskripte

New Pyridine Alkaloids from Rove Beetles of the Genus *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae)

Inka Lusebrink^a, Konrad Dettner^a, Andreas Schierling^a, Tobias Müller^b, Cristina Daolio^c, Bernd Schneider^c, Jürgen Schmidt^d, and Karlheinz Seifert^{b,*}

^a Department of Animal Ecology II, University of Bayreuth, D-95440 Bayreuth, Germany

^b Department of Organic Chemistry, NW II, University of Bayreuth, D-95440 Bayreuth, Germany. Fax: 49–921–555358. E-mail: karlheinz.seifert@uni-bayreuth.de

^c Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Str. 8, D-07745 Jena, Germany

^d Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Weinberg 3, D-06120 Halle, Germany

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. **64c**, 271–278 (2009); received November 20/December 29, 2008

Three new pyridine alkaloids were detected in the pygidial glands of some *Stenus* species. The chemotaxonomic significance of the occurrence of these alkaloids and stenusine in different *Stenus* species is discussed. The antimicrobial properties of (*Z*)- and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine and the deterrent activities of stenusine and norstenusine were investigated.

Key words: Rove Beetles, *Stenus*, Stenusine, Pyridine Alkaloids

Introduction

The rove beetle genus *Stenus* Latreille belongs to the most species-rich genera of the animal kingdom. Up to now, 2377 taxa including 8 fossil species are known worldwide (Puthz, 2008).

Since the beginning of the last century, *Stenus* beetles have intrigued scientists due to their extraordinary method of locomotion on water surfaces (Piffard, 1901). Upon falling on water they excrete a secretion from their pygidial glands that lowers the surface tension of water and propels the beetle forward very quickly. In the 1970's, this secretion was investigated by Schildknecht *et*

al. (1976) using the common species *S. comma*. They found the alkaloid stenusine [*N*-ethyl-3-(2-methylbutyl)-piperidine, **4**] (Fig. 1) to be the active ingredient in the secretion responsible for this movement on water surfaces, also called skimming.

In the present paper we describe the detection of three new pyridine alkaloids, **1–3**, in *Stenus* species other than *S. comma* (Fig. 1). The chemotaxonomic significance of the occurrence of the alkaloids **1–4** in different *Stenus* species is discussed and the antimicrobial properties of **1** and **2** and the deterrent activities of **4** and **5** are investigated.

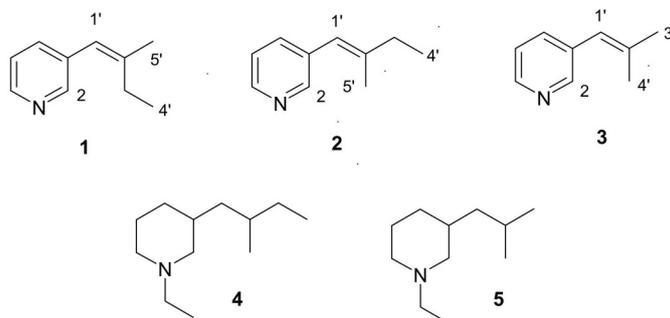


Fig. 1. Chemical structures of (*Z*)- (**1**), (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**), 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**3**), stenusine (**4**), and norstenusine (**5**).

Results and Discussion

Detection, structure elucidation, and synthesis of the pyridine alkaloids

Most previous studies on the chemical composition of the pygidial gland secretion of the rove beetle genus *Stenus* have been carried out using *S. comma*. We analyzed the pygidial gland content of a broader range of species of the subgenus *Hypostenus* (8) and *Metastenus* (2) by means of GC-MS.

All investigated species, except for *S. solutus* and *S. cicindeloides*, showed stenusine (**4**) as their major compound. *S. solutus* and *S. cicindeloides* contained another major compound showing a very similar EI mass spectrum ($m/z = 147$ [M^+], $m/z = 146$, $m/z = 132$ and $m/z = 117$) like actinidine, but they eluted at two different retention times ($t_R = 9.21$ min and $t_R = 9.38$ min). In order to unambiguously assign the retention time of actinidine we used an extract of valerian (*Valeriana officinalis*), a natural source of actinidine, as a reference. Actinidine from valerian showed the typical mass spectrum, but eluted at a third retention time ($t_R = 10.00$ min). As actinidine had been reported from other rove beetles (Huth and Detner, 1990), e.g. from *Philonthus laminatus*, we additionally used an extract of the abdominal glands of *P. laminatus* as a reference, which confirmed the retention time of actinidine from *Valeriana officinalis* (Fig. 2). As a result, we concluded that the substances from the investigated *Stenus* species are not actinidine and might be so far unknown in insects or in animals in general.

Because the unknown substances occurred amongst others in *S. solutus*, we dissected pygidial glands of 80 beetles of this species in order to collect sufficient material for structure elucidation. The crude sample was analyzed by LC-ESIMS and NMR spectroscopy at 500 MHz using a cryogenically cooled probe. Even though the NMR sample was a mixture of all gland contents, we achieved ^1H and 2D NMR spectra (^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC), which suggested the substance to be (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**) (Fig. 1). The ESIHR mass spectrum of **2** exhibited a $[M+H]^+$ peak at m/z 148.1118, consistent with a molecular formula $C_{10}H_{13}N$. The ^1H NMR data showed 4 signals (H-2 δ 8.39, H-4 δ 7.71, H-5 δ 7.39, H-6 δ 8.33) characteristic for an in position 3 substituted pyridine. The ^1H - ^1H COSY correlations H-1' δ 6.27/3H-5' δ 1.87, H-1'/2H-3' δ 2.25

and 2H-3'/3H-4' δ 1.15 were in agreement with the 2-methyl-1-butenyl side chain. The ^{13}C chemical shifts of C-1' δ 120.9, C-3' δ 34.5, C-5' δ 18.0 of the 2-methyl-1-butenyl group were compared with the calculated values (ACD/CNMR: Chem-Sketch Window) δ 119.1, 33.4, 16.1 and led to the assumption of the (*E*)-configuration. For the (*Z*)-isomer δ 119.1, 28.8, 19.9 were calculated.

The (*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**) were synthesized by Wittig olefination from readily available starting materials over two steps (Fig. 3). 2-Bromobutane was converted into the phosphonium salt (Bestmann and Kratzer, 1963) in 68% yield. Subsequent Wittig reaction with nicotinaldehyde under salt-free conditions gave the desired compounds **1** and **2** in 43% yield as a 1.7:1 mixture, which could be separated by MPLC. In accordance with the literature (Brückner, 1996), we obtained predominantly the (*Z*)-isomer.

The (*Z*)- and (*E*)-configuration was exactly assigned by 1D NOE difference measurements of the synthetic compounds. Irradiation on the 5'-methyl group at δ 1.92 of the (*Z*)-isomer **1** indicated clearly an NOE with H-1' δ 6.23. On the other hand, the 5'-methyl group at δ 1.87 of **2** showed NOEs between 5'-CH₃/H-4 δ 7.71 and 5'-CH₃/H-2 δ 8.39 (Fig. 4).

Comparison of the retention times and mass spectra obtained with a mixture of extracts of *S. similis*, *S. solutus*, and *Philonthus laminatus* (Fig. 2) with those of synthetic (*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**) proved the major compounds in *S. similis* to be **1** ($t_R = 9.21$ min) and in *S. solutus* to be **2** ($t_R = 9.38$ min).

Compound **3** with a molecular ion peak in the EI mass spectrum at m/z 133 could be detected by GC-MS in the pygidial glands of *S. solutus*, *S. cicindeloides*, *S. binotatus* and *S. pubescens*. The $[M^+]$ peaks of (*Z*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**1**) and **3** differ by 14 mu.

The structure of **3** could be 3-(1-isobutenyl)-pyridine, which was synthesized in the same way as **1** and **2**. 2-Iodopropane reacted with triphenylphosphane to the phosphonium salt in 68% yield. Wittig reaction of the phosphonium salt with nicotinaldehyde under salt-free conditions gave 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**3**) (82%). As expected the ^1H and ^{13}C NMR data of **3** differ only in the side chain from those of **1** and **2**. The methyl groups 3' and 4' were observed in the ^1H NMR spectrum at δ 1.89 and δ 1.81 and in the ^{13}C NMR

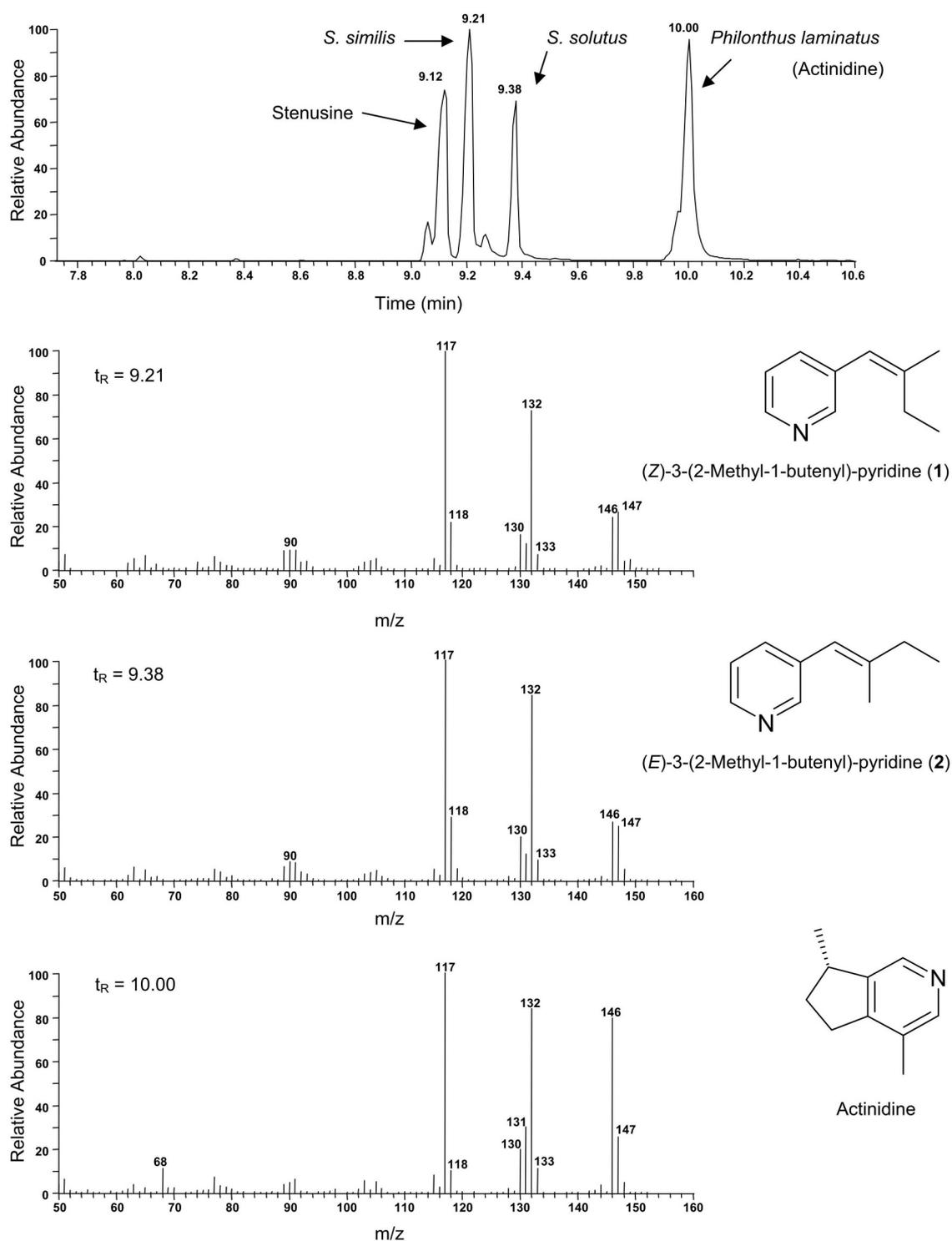


Fig. 2. Partial total-ion chromatogram of the mixed sample of *S. similis*, *S. solutus* and *Philonthus laminatus* and the EI mass spectra of (Z)- (1), (E)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (2) and actinidine.

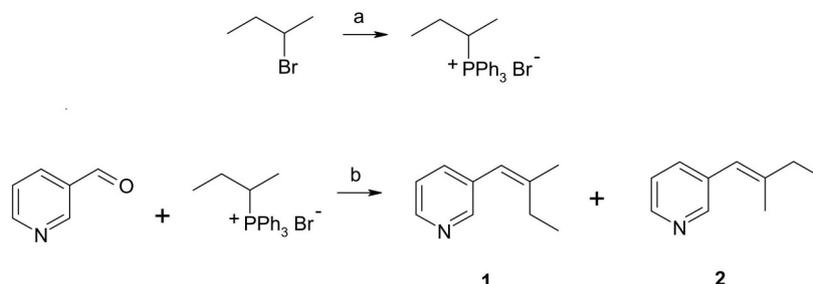


Fig. 3. Synthesis of (*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**). (a) PPh₃, neat, 120 °C, 24 h, 68% (based on PPh₃); (b) NaHMDS, benzene, 2 h, room temperature, 43%.

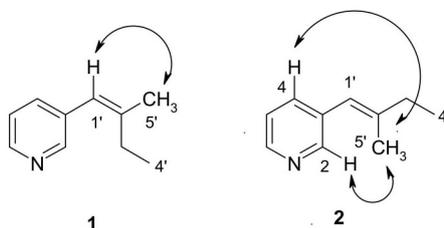


Fig. 4. 1D NOE correlations of (*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**).

spectrum at δ 27.2 and δ 19.6. The retention times ($t_R = 8.41$ min) and mass spectra of compound **3** from the four *Stenus* species and of the synthesized sample were identical. This proved the occurrence of the alkaloid 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**3**) (Fig. 1) in the pygidial glands of *S. solutus*, *S. cindeloides*, *S. binotatus* and *S. pubescens*.

Chemotaxonomic significance

(*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**) represent new natural products which are mainly, but not exclusively, abundant in the subgenus *Hypostenus*. The two investigated *Hypostenus* species *S. fulvicornis* und *S. latifrons* which do not contain the compounds represent exceptions. The pygidial glands of *S. binotatus* and *S. pubescens*, both from the subgenus *Metastenus*, contain both isomers **1** and **2**, and 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**3**) (Table I). *S. cindeloides* was reported to be able to skim on water surfaces (Billard and Bruyant, 1905) even though it hardly contains any stenusine (**4**); one possibility is that 3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine and 3-(1-isobutenyl)-pyridine replace stenusine as spreading alkaloid in this species. In a simple experiment one drop of stenusine (**4**), a

1.7:1 mixture of (*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**) or 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**3**) was given at a water surface on which some small particles of foam polystyrene were swimming. The spreading velocity of **4** was the highest followed by the mixture of **1** and **2**. Compound **3** exhibited the lowest spreading velocity.

The close relationships of the chemical structures of the new alkaloids **1**, **2** and **3** with stenusine (**4**) and norstenusine (**5**) become evident from Fig. 1. Stenusine (**4**) and norstenusine (**5**) are the *N*-ethyl-octahydro products of the new alkaloids **1**, **2** and **3**.

In an earlier study we showed that the ratio of the four stereoisomers of the alkaloid stenusine (**4**) differs with species (Lusebrink *et al.*, 2007). The stereoisomeric ratio [(2'*R*,3*R*)-, (2'*S*,3*R*)-, (2'*S*,3*S*)- and (2'*R*,3*S*)-stenusine] of the German (GER) and Canadian (CDN) *S. comma* (subgenus *Stenus*) differs enormously: GER 17%:37%:43%:3% vs. CDN 0%:0%:55%:45%. Furthermore, the monoterpene isopiperitenol reported for the German *S. comma* (Schildknecht, 1970), was missing in the Canadian specimens, but was always abundant in the German *S. comma*.

Table I. *Stenus* species in which *Z/E*-isomers of 3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**1**, **2**), 3-(1-isobutenyl)-pyridine (**3**), and stenusine (**4**) were detected by GC-MS.

Compound	Subgenus									
	<i>Metastenus</i>	<i>Metastenus</i>	<i>Hypostenus</i>	<i>Hypostenus</i>	<i>Hypostenus</i>	<i>Hypostenus</i>	<i>Hypostenus</i>	<i>Hypostenus</i>	<i>Hypostenus</i>	<i>Hypostenus</i>
	Species									
	<i>S. binotatus</i> Ljungh 1804	<i>S. pubescens</i> Stephens 1833	<i>S. fulvicornis</i> Stephens 1833	<i>S. latifrons</i> Erichson 1839	<i>S. fornicatus</i> Stephens 1833	<i>S. pinguis</i> Casey 1884 CDN	<i>S. tarsalis</i> Ljungh 1804	<i>S. similis</i> Herbst 1784	<i>S. solutus</i> Erichson 1840	<i>S. cicindeloides</i> Schaller 1783
1	+	+	-	-	+	+	++	++	+	+
2	++	++	-	-	+	++	+	+	++	+
3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
4	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+

+ Abundant; ++ abundant in higher amounts.
CDN species collected in Canada.

This indicates that the German and the Canadian *S. comma* show wide differences in the pygidial gland secretions. Morphological and molecular studies could potentially explain the differences in their secondary metabolites. A total inventory of the pygidial gland content, including stereoisomeric ratios of stenusine (**4**), could be promising for a comprehensive chemotaxonomic study.

Biological function

It is well known, that *Stenus* beetles impregnate their body surface with their pygidial gland secretion (Betz, 1999). This behaviour is called secretion grooming and suggests that the secretion involves substances which prevent the beetle from infection by epibiontic microorganisms like bacteria and fungi. The pygidial gland constituents stenusine (**4**) and norstenusine (**5**) have antimicrobial activity. According to our study (Lusebrink *et al.*, 2008), agar diffusion tests with a 57:43 (v/v) blend of (*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**) showed that the blend of **1** and **2** has higher antimicrobial properties at a content of 800 µg/disc than stenusine on in-

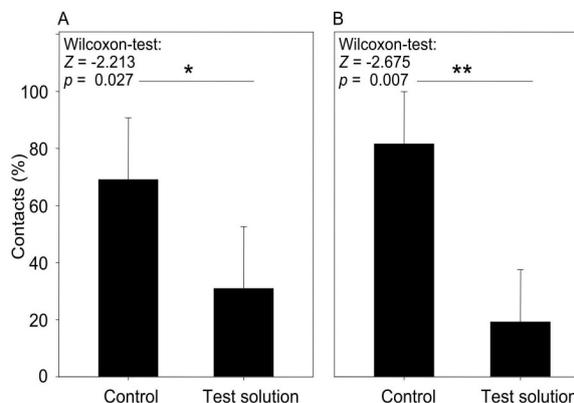


Fig. 5. Deterrencies of (A) stenusine (50 µg/ml milk) and (B) norstenusine (30 µg/ml milk) against *Leptothorax platythorax* ants. Both alkaloids were emulsified with UHT-milk and tested against UHT-milk controls. Bioassay A was conducted with a highly active ant colony, whereas test B was performed several weeks later, when the same colony exhibited a lower activity. Therefore A and B can not be directly compared. Each bioassay consisted of ten replicates. The bar diagram shows the percentile distribution of contacts with the control and test solution, including standard deviation bars. *, Significant difference ($p < 0.05$); **, high significant difference ($p < 0.01$).

sect pathogenic bacteria (Gram-positive: *Bacillus sphaericus*; Gram-negative: *E. coli* and *Serratia entomophila*). Moreover it was obvious, that this blend was considerably more active than the pure (*Z*)-isomer **1**. Thus a mixture of both isomers of 3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine contributes to the defence against epibiotic microorganisms of *S. solutus* and *S. cinctoides* which only contain minor amounts of the antibacterial stenusine (**4**).

Both **4** and norstenusine (**5**) exhibit distinct deterrent activities against *Leptothorax platythorax* ants in feeding experiments. According to Schoonhoven *et al.* (2005) a chemical deterrent inhibits feeding when it is present in a place where insects would normally feed. During a binary choice test, ants were able to choose between test solutions in milk and milk controls (both solutions contained minor amounts of saccharose), and *L. platythorax* ants preferred milk over a test solution of milk with 50 µg/ml **4**. Thus **4** showed high deterrent activities (Fig. 5A). This bioassay was performed with a colony of highly active *L. platythorax* ants that showed lower activity when tested 5 weeks later. Therefore the experiment with norstenusine (**5**) can not be directly compared with the stenusine (**4**) bioassay. However, in this current experiment **5** also exhibited significant deterrence against the ants even at a concentration of **5** in milk as low as 30 µg/ml (Fig. 5B). Because most *Stenus* species emit pygidial gland secretion after molestations, these results show that the secretion also represents a true defensive secretion which is directed against enemies such as predatory arthropods like ants or spiders.

Experimental

General

GC-MS: Finnigan MAT GCQ instrument equipped with a BPX5 column (SGE, length 25 m, diameter 0.22 mm). Oven temperature program: 80 °C for 2 min, raised with 4 °C/min to 125 °C and then with 30 °C/min to 275 °C. LC-ESIMS: Finnigan MAT TSQ instrument equipped with a Ultrasep RP-18E column (length 100 mm, diameter 1 mm, particle size 5 µm). Gradient system starting from H₂O/MeCN 9:1 (each of them containing 0.2% HOAc) to 1:9 within 15 min; flow rate, 50 µl/min. MPLC: Büchi B688 pump and Büchi B687 gradient former. NMR: Bruker Avance DRX 500 and Bruker AC-300 instruments.

Collection and determination of *Stenus* beetles, and extraction of their pygidial glands

S. pinguis was collected near Meanook (Alberta, Canada) and the Canadian *S. comma* in Red Lodge Provincial Park (Alberta, Canada). All other species were collected in the surroundings of Bayreuth, Germany. The species collected in Germany were determined using the determination key of Lohse (1964). The Canadian species were identified by Dr. Volker Puthz (Schlitz, Germany), a *Stenus* specialist, who has described about 50% of all *Stenus* species.

The beetles (all adults) were killed as well as stored in a freezer at a temperature of -20 °C. For each sample, 10 glands of the same species were dissected and transferred into a conically ending vial with 25 µl EtOAc SupraSolv for GC (Merck). Each sample was homogenized by sonication for 5 min. Glands of 80 *S. solutus* beetles were dissected and extracted.

Bioassays

A deterrence bioassay was performed with a laboratory colony of *Leptothorax platythorax* (gift from Prof. Dr. J. Steidle, University of Hohenheim, Germany). Experiments were conducted in a controlled climate chamber with constant humidity (40%) at 25 °C and 16 h light:8 h dark. The behaviour of the ants was studied within a formicarium (46 cm × 31 cm, height 13 cm) lined with cement. The colonies were fed with saccharose- and honey-water and dead insects. Since **4** and **5** are not water-soluble, both alkaloids were emulsified with ultra-high temperature-processed (UHT)-milk (100 ml contained: 1.5 g fat, 3.4 g protein, 4.8 g carbohydrates and 10 g saccharose). During the binary choice the ant colony had 10 min to choose between the test solutions and pure milk controls. From experiment to experiment the positions of test solutions and controls were randomly changed. When the ants visited a droplet and fed at the milk solutions for at least 3 s (after the first mandible contact), the solution was considered as non-deterrent.

Each bioassay comprised of ten replicates and was statistically evaluated with the Wilcoxon-test for paired samples. Autoreplications could not be prevented.

Preparation and spectroscopic data of the alkaloids

(*Z*)- (**1**) and (*E*)-3-(2-methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**): Triphenylphosphane (13.12 g, 50 mmol) and 2-bromobutane (10.96 ml $\hat{=}$ 13.7 g, 100 mmol) were heated for 24 h at 120 °C in a sealed tube. The obtained colourless crystals were finely powdered and washed three times with dry THF and dried under vacuum (13332 Pa) for 2 h yielding 13.58 g (34 mmol, 68%) of 2-butyltriphenylphosphonium bromide, m.p. 225 °C. To a rapidly stirred suspension of 2-butyltriphenylphosphonium bromide (1.00 g, 2.5 mmol) in dry benzene (10 ml) was added at room temperature NaHMDS (1.25 ml, 2 M in THF, 2.5 mmol). After 30 s nicotinaldehyde (0.3 ml, 3.2 mmol) was dropped to the deep red suspension and stirring was continued for 2 h. The resulting pale yellow slurry was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc 3:1 v/v, R_f 0.4) yielding a 1.7:1 mixture of **1** and **2** (158 mg, 1.07 mmol, 43%) as a colourless oil. The mixture of **1** and **2** could be separated by MPLC on silica gel MN Nucleodur 100, particle size 12 μ m (*n*-hexane/EtOAc 19:1 v/v).

(*Z*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridine (**1**): ^1H NMR (300 MHz, MeOH- d_4): δ = 8.35 (1H, d, $J_{2,4}$ = 2.4 Hz, H-2), 8.34 (1H, dd, $J_{5,6}$ = 4.8 Hz, $J_{4,6}$ = 1.5 Hz, H-6), 7.65 (1H, ddd, $J_{4,5}$ = 7.8 Hz, $J_{4,6}$ = 1.5 Hz, $J_{2,4}$ = 2.4 Hz, H-4), 7.38 (1H, ddd, $J_{4,5}$ = 7.8 Hz, $J_{5,6}$ = 4.8 Hz, $J_{2,5}$ = 0.6 Hz, H-5), 6.23 (1H, br. s, H-1'), 2.25 (2H, dq, $J_{3,4}$ = 7.5 Hz, $J_{1,3}$ = 0.6 Hz, 2H-3'), 1.92 (3H, d, $J_{1,5}$ = 1.5 Hz, 3H-5'), 1.10 (3H, t, $J_{3,4}$ = 7.5 Hz, 3H-4'). – ^{13}C NMR (75 MHz, MeOH- d_4): δ = 149.9 (C-2), 147.4 (C-6), 145.8 (C-2'), 137.9 (C-4), 136.3 (C-3), 125.1 (C-5), 122.0 (C-1'), 26.7 (C-3'), 23.9 (C-5'), 13.3 (C-4'). – GC-MS: t_R = 9.21 min. – EI: m/z (%) = 147 (25) [M^+], 146 (24), 132 (71), 130 (15), 118 (22), 117 (100). – ESI-HRMS: 148.1118 [$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}^+$] (calcd. 148.1121).

(*E*)-3-(2-Methyl-1-butenyl)-pyridine (**2**): ^1H NMR (300 MHz, MeOH- d_4): δ = 8.39 (1H, d, $J_{2,4}$ = 2.4 Hz, H-2), 8.33 (1H, dd, $J_{5,6}$ = 4.8 Hz, $J_{4,6}$ = 1.5 Hz, H-6), 7.71 (1H, ddd, $J_{4,5}$ = 7.8 Hz, $J_{4,6}$ = 1.5 Hz, $J_{2,4}$ = 2.4 Hz, H-4), 7.39 (1H, ddd, $J_{4,5}$ = 7.8 Hz, $J_{5,6}$ = 4.8 Hz, $J_{2,5}$ = 0.6 Hz, H-5), 6.27 (1H, br. s, H-1'), 2.25 (2H, dq, $J_{3,4}$ = 7.5 Hz, $J_{1,3}$ = 1.2 Hz, 2H-3'), 1.87 (3H, d, $J_{1,5}$ = 1.5 Hz, 3H-5'), 1.15 (3H, t, $J_{3,4}$

= 7.5 Hz, 3H-4'). – ^{13}C NMR (75 MHz, MeOH- d_4): δ = 150.3 (C-2), 147.2 (C-6), 145.6 (C-2'), 138.2 (C-4), 136.6 (C-3), 125.0 (C-5), 120.9 (C-1'), 34.5 (C-3'), 18.0 (C-5'), 13.2 (C-4'). – GC-MS: t_R = 9.38 min. – EI: m/z (%) = 147 (24) [M^+], 146 (25), 132 (82), 130 (18), 118 (28), 117 (100). – ESI-HRMS: 148.1118 [$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}^+$] (calcd. 148.1121).

3-(1-Isobutenyl)-pyridine (**3**): Triphenylphosphane (14.43 g, 55 mmol) and 2-iodopropane (5.00 ml, 50 mmol) in toluene (12 ml) were heated for 72 h under reflux. The formed colourless crystals were separated, washed with cold toluene and dried under vacuum (13332 Pa) for 2 h giving 14.68 g (34 mmol, 68%) of 2-propyltriphenylphosphonium iodide, m.p. 193 °C. To a stirred suspension of 2-propyltriphenylphosphonium iodide (9.08 g, 21 mmol) in dry THF (100 ml) was dropped NaHMDS (10.5 ml, 2 M in THF, 21 mmol). After 20 min nicotinaldehyde (1.95 ml, 20.7 mmol) was added during 5 min to the deep red solution. The stirring was continued for 14 h, the solvent evaporated, and the residue distributed between H_2O and CH_2Cl_2 . The aqueous phase was extracted two times with CH_2Cl_2 . Silica gel (30 g) was added to the combined organic phases and the solvent was removed. This silica gel was given to the top of a silica gel column. Elution with *n*-hexane/EtOAc 3:1 v/v yielded after evaporation of the solvent **3** (2.25 g, 16.89 mmol, 82%) as colourless oil.

^1H NMR (300 MHz, MeOH- d_4): δ = 8.37 (1H, d, $J_{2,4}$ = 2.1 Hz, H-2), 8.33 (1H, dd, $J_{5,6}$ = 4.8 Hz, $J_{4,6}$ = 1.5 Hz, H-6), 7.64 (1H, ddd, $J_{4,5}$ = 7.9 Hz, $J_{4,6}$ = 1.5 Hz, $J_{2,4}$ = 2.1 Hz, H-4), 7.34 (1H, ddd, $J_{4,5}$ = 7.9 Hz, $J_{5,6}$ = 4.8 Hz, $J_{2,5}$ = 0.7 Hz, H-5), 6.22 (1H, br. s, H-1'), 1.89 (3H, d, $J_{1,3}$ = 1.6 Hz, 3H-3'), 1.81 (3H, d, $J_{1,4}$ = 1.6 Hz, 3H-4'). – ^{13}C NMR (75 MHz, MeOH- d_4): δ = 150.3 (C-2), 147.3 (C-6), 140.0 (C-2'), 137.9 (C-4), 136.3 (C-3), 124.9 (C-5), 122.4 (C-1'), 27.2 (C-3'), 19.6 (C-4'). – GC-MS: t_R = 8.41 min. – EI: m/z (%) = 133 (100) [M^+], 132 (68), 119 (85), 117 (63), 91 (57). – ESIHRMS: 133.0886 [$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}^+$] (calcd. 133.08915).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the German Research Association (DFG) for funding of the project, which is part of the Graduate College 678.

- Bestmann H. J. and Kratzer O. (1963), Reaktionen mit Phosphin-alkylenen, VII. Olefine und Ketone durch Autoxydation von Phosphin-alkylenen. *Chem. Ber.* **96**, 1899–1908.
- Betz O. (1999), A behavioural inventory of adult *Stenus* species (Coleoptera: Staphylinidae). *J. Nat. Hist.* **33**, 1691–1712.
- Billard G. and Bruyant C. (1905), Sur une mode particulier de locomotion de certains *Stenus*. *C. R. Acad. Sci. Paris Soc. Biol.* **59**, 102–103.
- Brückner R. (1996), Reaktionsmechanismen. Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp. 314–315.
- Huth A. and Dettner K. (1990), Defense chemicals from abdominal glands of 13 rove beetle species of subtribe *Staphylinina* (Coleoptera: Staphylinidae, Staphylininae). *J. Chem. Ecol.* **16**, 2691–2711.
- Lohse G. A. (1964), Die Käfer Mitteleuropas. Staphylinidae I, Vol. 4 (Freude H., Harde K. W., and Lohse G. A., eds.). Goecke & Evers, Krefeld.
- Lusebrink I., Burkhardt D., Gedig T., Dettner K., Seifert K., and Mosandl A. (2007), Intrageneric differences in the four stereoisomers of stenusine in the rove beetle genus, *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Naturwissenschaften* **94**, 143–147.
- Lusebrink I., Dettner K., and Seifert K. (2008), Stenusine, an antimicrobial agent in the rove beetle genus *Stenus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Naturwissenschaften* **95**, 751–755.
- Piffard A. (1901), Steni gliding on the surface of water. *Ent. Mo. Mag.* **12**, 99.
- Puthz V. (2008), *Stenus* Latreille und die segensreiche Himmelstochter (Coleoptera, Staphylinidae). *Linzer biol. Beitr.* **40**, 137–230.
- Schildknecht H. (1970), Die Wehrchemie von Land- und Wasserkäfern. *Angew. Chem.* **82**, 17–25.
- Schildknecht H., Berger D., Krauss D., Connert J., Gehlhaus J., and Essenbreis H. (1976), Defense chemistry of *Stenus comma* (Coleoptera: Staphylinidae). *J. Chem. Ecol.* **2**, 1–11.
- Schoonhoven L. M., van Loon J. J. A., and Dicke M. (2005), *Insect-Plant Biology*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, p. 137.

Straightforward Synthesis of All Stenusine and Norstenusine Stereoisomers

Tobias Müller,^[a] Konrad Dettner,^[b] and Karlheinz Seifert*^[a]

Dedicated to Professor Dr. Dr. h.c. Gerhard Bringmann on the occasion of his 60th birthday

Keywords: Alkaloids / Asymmetric synthesis / Synthesis design / Hydrogenation

All the stereoisomers of stenusine (**1**) and norstenusine (**21**) have been efficiently synthesized by the asymmetric hydrogenation of pyridines. The (2*R*,3*S*)- and (2*R*,3*R*)-isomers of **1**, that are difficult to prepare, have been synthesized for the

first time using a chemoenzymatic approach in eight steps with an 8 % total yield. All the target compounds were obtained in good stereochemical purity by using very simple and inexpensive reagents and auxiliaries.

Introduction

The rove beetle genus *Stenus* Latreille belongs to the most species-rich genera of the animal kingdom. To date, 2377 taxa including 8 fossil species are known worldwide.^[1] Since the beginning of the last century,^[2] *Stenus* species, which occupy habitats near ponds or creek banks, have attracted attention because of their extraordinary capability for locomotion on the surface of water.^[3] During the hunting for springtails (Collembola), the beetles often fall onto the water's surface. Here, they release a surface-active fluid from their pygidial glands which tends to spread rapidly on the water.^[3] Because of the immense spreading pressure from the secretion, the beetles are able to jet over the water surface. For *Stenus comma* beetles, weighing about 2.5 mg, velocities of up to 70 cm/s have been observed.^[4]

The compound which is responsible for this property is stenusine (**1**), a piperidine alkaloid, which represents the main compound in the fluid.^[3] Furthermore, 1,8-cineol, isopiperitenol, 6-methyl-5-hepten-2-one,^[5] and the alkaloid norstenusine (**21**)^[6] are the minor components. The structure of the spreading alkaloid stenusine (**1**) was first reported by Schildknecht et al. in 1975.^[3] The alkaloid (6 mg) was isolated by distillation from 1000 beetles of the species *Stenus comma*.^[7] The structure of **1** was elucidated mainly by NMR spectroscopy and mass spectrometry and then finally by total synthesis.^[3,7] The absolute configuration of natural stenusine, produced by *S. comma*, was first determined by the enantioselective synthesis of (2*S*,3*S*)- and

(2*S*,3*R*)-**1** by Enders et al.^[8] This natural stenusine was not diastereo- and enantiomerically pure, but rather was a mixture of all stereoisomers. A stereoisomeric ratio of 43:40:13:4 was found for (2*S*,3*S*)/(2*S*,3*R*)/(2*R*,3*R*)/(2*R*,3*S*) by means of chiral GC data.^[8]

Other *Stenus* species exhibit a completely different stereoisomeric pattern. For instance, *S. clavicornis* produces almost exclusively (95 %) the (2*S*,3*R*)-isomer, whereas stenusine from *S. juno* shows mainly (88 %) the (2*R*,3*R*)-configuration.^[9] The reason for these intrageneric differences is currently unknown. We tested the hypothesis that *Stenus* beetles impregnate the surface of their body with the pygidial gland secretion to defend themselves against microorganisms and found that the isomeric mixture of synthetic stenusine, similar to that of *S. comma* and (±)-norstenusine,^[10] in concentrations occurring in nature, significantly inhibits the growth of bacteria (*Serratia entomophila*) and fungi (*Beauveria bassiana*).^[11] A second function for this secretion, and thus of stenusine (**1**) and norstenusine (**21**), is that it acts as a deterrent against predators like *Leptothorax platythorax* ants, and this could be proven by feeding experiments.^[12] To test the biological activity of the individual stenusine and norstenusine isomers, we are interested in a straightforward synthetic route leading to all stereoisomers.

Besides the above-mentioned, a plethora of syntheses leading to stenusine have been reported.^[13] Surprisingly, none of them lead to the (2*R*,3*S*)- and (2*R*,3*R*)-isomers in a reasonable and economic way, as they employ building block **10**, derived from the chiral pool,^[8,13b,13e] or allow no distinct control of the configuration.^[7,10,13a,13c,13d] As only (*S*)-**10** is commercially available in reasonable amounts, all existing procedures would require the additional preparation of (*R*)-**10** from alcohol (*R*)-**9** (Scheme 2). This could be achieved from (*S*)-methyl 3-hydroxy-2-methylpropionate (Roche ester) in five steps^[14] or by chiral resolution of 2-

[a] Lehrstuhl für Organische Chemie, NW II, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95447 Bayreuth, Germany
Fax: +49-921-55-5358
E-mail: karlheinz.seifert@uni-bayreuth.de

[b] Lehrstuhl für Tierökologie II, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95447 Bayreuth, Germany
Fax: +49-921-55-2743

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201100612>.

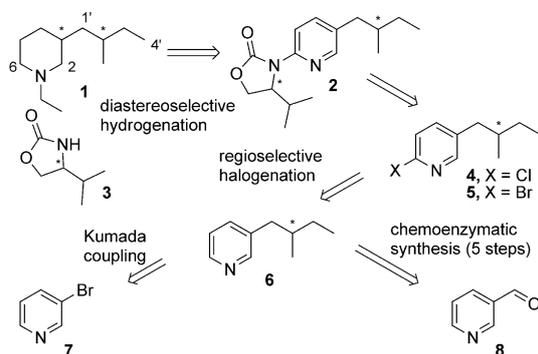
FULL PAPER

T. Müller, K. Dettner, K. Seifert

methylbutanoic acid and subsequent reduction in four steps.^[15] Furthermore, the published syntheses comprise challenging experimental procedures,^[8] suffer from unstable intermediates,^[13a] or employ starting materials which are not commercially available.^[13b,13e] All these facts encouraged us to develop a new approach, suitable to overcome all these difficulties. In this paper, we report a straightforward and inexpensive synthesis providing access to all isomers of **1** and **21**.

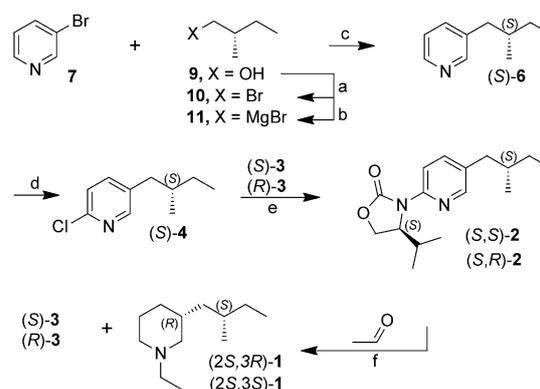
Results and Discussion

Our retrosynthetic approach is outlined in Scheme 1. The key step is the auxiliary-based asymmetric hydrogenation and simultaneous *N*-ethylation of the pyridines **2**, following a procedure from Glorius et al.^[16] who obtained an enantiomeric excess of 95% *ee* (81% yield) using a similar substrate. The inexpensive and easily prepared Evans auxiliary^[17] **3** can be used and recovered unchanged.^[16] The auxiliary is coupled through a Goldberg reaction based on a catalytic system from CuI, the 1,2-diamine ligand, and a base.^[18] As hydrogenation of the substrate having the auxiliary *ortho* to the methylbutyl side chain would form a diastereomeric mixture of **1**,^[16] a clean regioselective halogenation of **6** is important. This can be achieved by employing BuLi-LiDMAE [DMAE = 2-(dimethylamino)ethanolate], a unimetal superbases, which is useful in the regioselective lithiation at C-6 in 3-substituted pyridines.^[19] Subsequently, the lithiated species is halogenated by the addition of a suitable electrophile. As an alternative, compound **6** could be deprotonated using lithium di-*tert*-butyl-(2,2,6,6-tetramethylpiperidino)zincate (TMP-zincate).^[20] Finally, the chiral pyridines **6** must be prepared by different strategies. (*S*)-**6** is obtained simply by a Kumada coupling of 3-bromopyridine (**7**) and the chiral pool derivative **11**.^[21] (*R*)-**6** is available through a five-step chemoenzymatic synthesis, starting from nicotinaldehyde (**8**). Here, the stereogenic center is created by asymmetric hydrogenation of pyridyl enone **12** with the help of *Saccharomyces cerevisiae* (Scheme 3).^[22]

Scheme 1. Retrosynthetic analysis of stenusine (**1**).

The synthesis of (*2S,3R*)- and (*2S,3S*)-stenusine began with commercially available (*S*)-2-methyl-1-butanol [(*S*)-**9**] which was converted into the corresponding bromide (*S*-

10 (71%) and then transformed into Grignard reagent (*S*)-**11**. The subsequent coupling of **11** with 3-bromopyridine (**7**) gave **6** (85%) using a known procedure^[21b] (Scheme 2). After improving the reaction conditions, the regioselective chlorination of **6** by the addition of BuLi-LiDMAE and then C₂Cl₆^[23] succeeded in a moderate yield (53%) which is typical for this type of conversion.^[19c] Bromination of **6** using BuLi-LiDMAE followed by CBr₄ proceeded, but with significantly lower yields of **5** (15–32%). Because of the reduced reactivity of the chlorinated species, the copper-catalyzed amidation of **4** required a much longer reaction time in contrast to that needed for **5** (Scheme 2, e), however, this difference did not affect the yields (88% and 85%, respectively). All attempts to accelerate the reaction at elevated temperatures using microwave conditions led to an increased formation of side products. The diastereoselective hydrogenation of oxazolidinones (*S,S*)-**2** and (*S,R*)-**2** in the presence of acetaldehyde gave after chromatography the target compounds (*2S,3R*)- and (*2S,3S*)-**1** in 74% and 78% yield, respectively (Figure 1). The hydrogenations proceeded



Scheme 2. Synthesis of (*2S,3R*)- and (*2S,3S*)-stenusine. Reagents and conditions: (a) MsCl (methanesulfonyl chloride), NEt₃, DMAP (4-dimethylaminopyridine), CH₂Cl₂, 0 °C 1 h; then LiBr, acetone, reflux overnight, 71%; (b) Mg, Et₂O, room temp., 1 h; (c) Ni(dppe)Cl₂ [dppe = 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane], Et₂O, reflux overnight, 85%; (d) BuLi-LiDMAE, 1 h, 0 °C; then C₂Cl₆, syringe pump, -78 °C → room temp., *n*-hexane, overnight, 53%; (e) (*S*)-**3**, CuI, diamine ligand, K₂CO₃, toluene, 140 °C, sealed tube, 4 d, (*S,S*)-**2** 88%, (*S,R*)-**2** 85%; 16 h, 110 °C, 91% for (*S*)-**5**; (f) Pd(OH)₂/C, MeCHO, H₂ (150 bar), AcOH, 40 °C, 4 d, (*2S,3R*)-**1**, 74%, 91% *de*; (*2S,3S*)-**1**, 78%, 90% *de*.

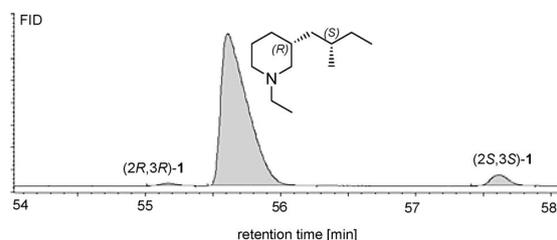
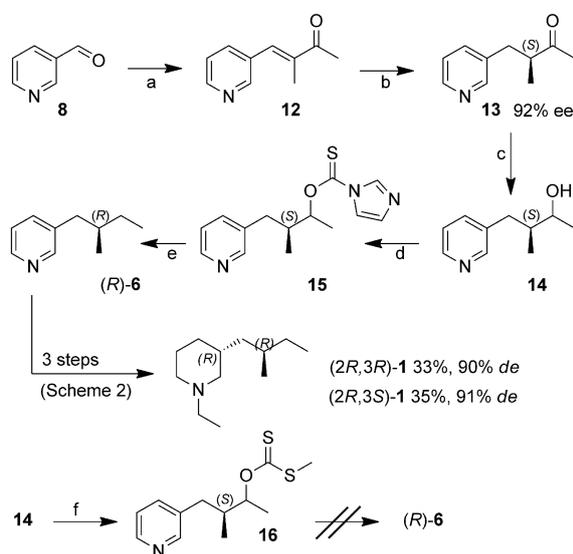


Figure 1. Chiral GC spectrum of synthetic (*2S,3R*)-stenusine. Column: BGB-176SE, 30 m, ID 0.25 mm, film 0.25 μm. Carrier gas: H₂. Oven conditions: 60 °C (20 min isothermal), heating rate 1 °C/min to 100 °C, then 20 °C/min to 210 °C (20 min isothermal).

with good diastereomeric excesses of 91 % and 90 % *de*, respectively, but very long reaction times (4 d) were necessary to obtain complete conversion. A constant hydrogen pressure of no less than 150 bar was crucial for a clean reaction. At temperatures below 40 °C, the hydrogenation reaction proceeded very slowly, but with a slight increase in diastereoselectivity.

For the synthesis of (2*R*,3*R*)- and (2*R*,3*S*)-stenusine, we prepared enone **12** (68 %) from 2-butanone and nicotinaldehyde (**8**) using a slightly modified literature protocol (Scheme 3).^[22] The double bond in enone **12** was subjected to enzymatic hydrogenation to furnish chiral ketone **13**. Applying the original literature protocol and dried baker's yeast type II (YSC-2 Sigma), neither the published yield (76 %) nor the enantiomeric excess value (> 95 % *ee*) could be reproduced. We obtained **13** with 88 % *ee* (52 % yield) in reproducible trials. If fresh baker's yeast was employed, only an *ee* value of 81 % could be achieved. The *ee* values were determined by using chiral GC analysis (see Supporting Information). In addition to the original approach, we developed a new procedure again using dried yeast from Sigma which gave both an acceptable yield (62 %) and enantiomeric excess (92 % *ee*) by changing the reaction medium [DMSO (dimethyl sulfoxide)/water] and slowly adding the sucrose solution. Furthermore, we were able to reduce the amount of required yeast by a factor of five. Ketone **13** was then reduced with sodium borohydride in methanol in excellent yield (91 %). The diastereomeric alcohols **14** were converted into thiocarbamates **15** (82 %) which were sub-



Scheme 3. Synthesis of (2*R*,3*R*)- and (2*R*,3*S*)-stenusine. Reagents and conditions: (a) MEK (methyl ethyl ketone), H₂SO₄, AcOH, 50 °C, 3 h, 68 %; (b) *Saccharomyces cerevisiae*, sucrose, DMSO, tap water, room temp., 48 h, 62 %, 92 % *ee*; (c) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 45 min, 91 %; (d) TCDI (thiocarbonyl diimidazole), THF (tetrahydrofuran), 90 °C, sealed tube, 8 h, 82 %; (e) AIBN [azobis(isobutyronitrile)], Bu₃SnH, toluene, reflux, 3 h, 74 %; (f) NaH, CS₂, MeI, THF, 1 h, 76 %.

sequently subjected to a Barton–McCombie deoxygenation to give (*R*)-**6** (74 %).^[24] To our surprise, **15** underwent clean deoxygenation to (*R*)-**6**, but all attempts to deoxygenate the xanthates **16** failed. (*R*)-**6** was converted into the target compounds (2*R*,3*R*)- and (2*R*,3*S*)-**1** (33 and 35 %, respectively) in three steps analogous to (*S*)-**6** (Scheme 2). The hydrogenations proceeded with 90 % *de* (3*R*) and 91 % *de* (3*S*). The stereochemical purity of (2*R*,3*S*)-**1** could be slightly increased to 93 % *de* by freezing out (*R*,*R*)-**2** from *n*-hexane at –20 °C and lowering the hydrogenation temperature to 30 °C (Figure 2). However, this negatively affected both the yield (62 %) and reaction time (10 d).

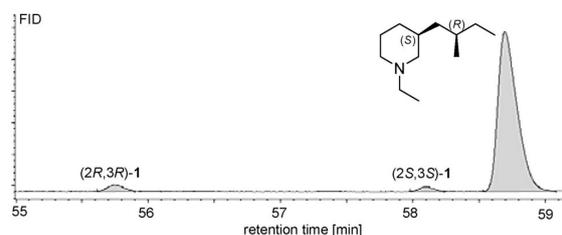
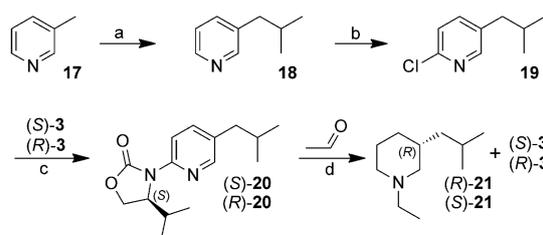


Figure 2. Chiral GC spectrum of synthetic (2*R*,3*S*)-stenusine. Oven conditions are identical as indicated in Figure 1. This target compound was hydrogenated at 30 °C, for 10 d.

The norstenusine isomers (**21**) were analogously prepared (Scheme 4). The preparation of 3-isobutylpyridine (**18**) was achieved starting from 3-picoline (**17**) according to a known procedure (81 %).^[10] Regioselective chlorination (52 %) and the coupling of auxiliaries **3** gave compounds **20** (94 %, 85 %) which were hydrogenated to the desired alkaloids **21** (81 %, 80 %) with *ee* values of 92 % *ee* [(*R*)-**21**] and 90 % *ee* [(*S*)-**21**].



Scheme 4. Synthesis of (*R*)- and (*S*)-norstenusine analogous to Scheme 2. Reagents and conditions: (a) LDA (lithium diisopropylamide), THF, 0 °C; 2-bromopropane, THF, –78 °C → room temp., 81 %;^[10] (b) 52 %; (c) (*S*)-**20**, 94 %; (*R*)-**20**, 85 %; (d) (*R*)-**21**, 81 %, 92 % *ee*; (*S*)-**21**, 80 %, 90 % *ee*.

Conclusions

We have developed a synthetic strategy which provides easy access to all the stereoisomers of stenusine (**1**) and norstenusine (**21**). (2*S*,3*R*)- and (2*S*,3*S*)-**1** were both obtained in a four-step sequence with 29 and 30 % yield, respectively (Scheme 2). A chemoenzymatic approach furnished chiral pyridine (*R*)-**6** (Scheme 3) which led to both the (2*R*,3*R*)-

FULL PAPER

T. Müller, K. Dettner, K. Seifert

and (2*R*,3*S*)-**1** isomers in 8% total yield. The norstenusine enantiomers were easily obtained in the same manner from compound **17** in 32 and 29% yield, respectively. All target compounds were obtained in good stereochemical purity by using very simple and inexpensive reagents and auxiliaries.

Experimental Section

General Remarks: All reactions except for those which led to compounds **1**, **12**, **13**, **14**, and **21** were performed in oven-dried glassware under an argon atmosphere using standard Schlenk techniques. THF and Et₂O were distilled from a sodium/potassium alloy or sodium diphenyl ketyl. Toluene was distilled from LiAlH₄ and CH₂Cl₂ was distilled from P₂O₅. *n*-Hexane (HPLC grade) was distilled from potassium metal. The solvents for chromatography were purchased as technical grade and distilled prior to use. Thin-layer chromatography was carried out on precoated Alugram® SIL G/UV₂₅₄ plates from Macherey–Nagel. Mass spectra were recorded using a Finnigan MAT 95 (EI, 70 eV) and a Bruker APEX IV (ESI-HRMS) fourier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometer. IR spectra were recorded with a Perkin–Elmer FT-IR spectrophotometer equipped with an ATR (attenuated total reflectance) sampling unit. The NMR spectroscopic data were recorded under the indicated conditions with a Bruker Avance 300 spectrometer and referenced for proton resonance to the residual solvent signal (CHCl₃ = 7.26 ppm) and for carbon resonance to the solvent signal (CDCl₃, 77.0 ppm). Chiral GC data were recorded with a Hewlett–Packard 5890 Series II or a Carlo–Erba HRGC 5160 gas chromatograph. All starting compounds were purchased from commercial sources and used as received. Baker's yeast (YSC-2) was purchased from Sigma–Aldrich and stored in a refrigerator. The reactions were monitored by TLC or gas chromatography using a TR-5MS column. For TLC, all aromatic compounds were visualized by UV light (254 nm).

(S)-3-(2-Methylbutyl)pyridine [(S)-6]: A Grignard solution prepared from (S)-1-bromo-2-methylbutane (4.94 mL, 39.9 mmol) and magnesium turnings (1.216 g, 50.0 mmol) in Et₂O (40 mL) was added dropwise over 20 min to a suspension of 3-bromopyridine (7.193 mL, 20.0 mmol) and Ni(dppe)Cl₂ (53 mg, 0.5 mol-%) in Et₂O (10 mL). The resulting bright yellow slurry was heated at reflux conditions overnight and subsequently partitioned between EtOAc (100 mL) and an NH₄Cl solution (100 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 100 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/EtOAc, 3:1; *R*_f = 0.3) to yield (S)-**6** as a colorless oil with a characteristic smell (2.537 g, 17.00 mmol, 85%), spectroscopically identical with that obtained previously.^[10] [α]_D²³ = +8.7 (*c* = 1.0, CHCl₃).

(S)-2-Chloro-5-(2-methylbutyl)pyridine [(S)-4]: To a solution of 2-(dimethylamino)ethanol (1.01 mL, 10 mmol) in *n*-hexane (6.7 mL) cooled to 0 °C was added dropwise *n*BuLi (2.5 M in hexane, 8.04 mL, 20 mmol). Stirring was continued for 1 h, and then (S)-**6** (0.500 g, 3.35 mmol) dissolved in *n*-hexane (3.35 mL) was added dropwise within 10 min. After stirring for 1 h, the resulting deep red solution was cooled to –78 °C, and C₂Cl₆ (2.775 g, 11.7 mmol) dissolved in *n*-hexane (20 mL) was added drop by drop over 1 h using a syringe pump. The resultant grey-brown slurry was allowed to reach room temp. overnight, and afterwards was quenched with water (30 mL). The aqueous layer was extracted with *n*-hexane (3 × 30 mL). The combined organic extracts were filtered through

a plug of cotton wool and concentrated to a volume of about 5 mL. This residue was placed on a short silica gel column (15 cm × 3 cm) and eluted first with *n*-hexane (300 mL) and then with *n*-hexane/methyl *tert*-butyl ether (MTBE, 95:5, 500 mL). The second fraction was evaporated to dryness. Purification by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/MTBE, 98:2) yielded (S)-**4** (0.326 g, 1.78 mmol, 53%) as a colorless oil. *R*_f = 0.4 (*n*-hexane/EtOAc, 19:1). [α]_D²³ = +9.9 (*c* = 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 8.08 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.35 (dd, *J* = 8.1, 2.5 Hz, 1 H, 4-H), 7.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, 3-H), 2.52 (dd, *J* = 13.6, 6.2 Hz, 1 H, 1'-H_a), 2.27 (dd, *J* = 13.6, 8.1 Hz, 1 H, 1'-H_b), 1.53 (m, 1 H, 2'-H), 1.29 (m, 1 H, 3'-H_a), 1.11 (m, 1 H, 3'-H_b), 0.83 (dd, *J* = 7.4 Hz, 3 H, 4'-H), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 5'-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 150.1 (C-6), 148.8 (C-2), 139.3 (C-4), 135.6 (C-5), 123.6 (C-3), 39.3 (C-1'), 36.3 (C-2'), 28.9 (C-3'), 18.6 (C-5'), 11.3 (C-4') ppm. FTIR (ATR): ν̄ = 2960 (m), 2925 (m), 2774 (w), 1584 (w), 1564 (m), 1455 (s), 1381 (s), 1287 (w), 1214 (w), 1137 (m), 1103 (s), 1023 (s), 1023 (m), 966 (w), 928 (w), 845 (w), 817 (m), 767 (m), 737 (m), 676 (m) cm⁻¹. MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 185 (10), 183 (31) [M]⁺, 129 (35), 128 (20), 127 (100), 126 (19), 91 (15), 57 (37), 41 (21). HRMS (EI): calcd. for C₁₀H₁₄ClN [M]⁺ 183.0809; found 183.0802.

(R)-2-Chloro-5-(2-methylbutyl)pyridine [(R)-4]: This compound was analogously prepared as described above from (R)-**6** to yield (R)-**4** (0.314 g, 1.71 mmol, 51%). [α]_D²³ = –9.2 (*c* = 1.0, CHCl₃).

2-Chloro-5-isobutylpyridine (19): This compound was analogously prepared as described above from **18** (452 mg, 3.35 mmol) to yield **19** (296 mg, 1.74 mmol, 52%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 8.07 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.34 (dd, *J* = 8.1, 2.5 Hz, 1 H, 4-H), 7.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, 3-H), 2.35 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, 1'-H), 1.74 (m, 1 H, 2'-H), 0.80 (d, *J* = 6.7 Hz, 6 H, 3'-H and 4'-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 149.8 (C-6), 148.6 (C-2), 139.1 (C-4), 135.4 (C-5), 123.4 (C-3), 41.2 (C-1'), 29.7 (C-2'), 21.8 (3'-C, C-4') ppm. HRMS (ESI): calcd. for C₉H₁₂ClN [M + H]⁺ 170.0731; found 170.0736.

(S)-4-Isopropyl-3-{5-[(S)-2-methylbutyl]pyridin-2-yl}-oxazolidin-2-one [(S,S)-2]: A sealed tube with a stirring bar was charged with CuI (114 mg, 15 mol-%) and finely ground K₂CO₃ (1.106 g, 8.00 mmol). (S)-**4** (735 mg, 4.00 mmol), (S)-4-isopropylloxazolidin-2-one [(S)-**3**, 1.033 g, 8.00 mmol], and *N,N'*-dimethylethylenediamine (130 μL, 30 mol-%) premixed in 5 mL of toluene were added by syringe. The tube was tightly sealed and stirred for 4 d with the oil bath temperature at 140 °C. The resulting red-brown slurry was thoroughly partitioned between water (50 mL) and EtOAc (100 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 80 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/EtOAc, 5:1), to yield (S,S)-**2** (972 mg, 3.52 mmol, 88%) as a white waxy solid. *R*_f = 0.6 (*n*-hexane/EtOAc, 3:1). [α]_D²³ = +62.6 (*c* = 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 8.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, 6'-H), 7.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, 3'-H), 7.42 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1 H, 4'-H), 4.77 (m, 1 H, 4-H), 4.29 (dd, *J* = 8.9 Hz, 1 H, 5-H_a), 4.20 (dd, *J* = 8.9, 4.0 Hz, 1 H, 5-H_b), 2.51 (dd, *J* = 13.7, 6.3 Hz, 1 H, 1''-H_a), 2.40 (m, 1 H, 6-H), 2.26 (dd, *J* = 13.7, 8.1 Hz, 1 H, 1''-H_b), 1.54 (m, 1 H, 2''-H), 1.31 (m, 1 H, 3''-H_a), 1.10 (m, 1 H, 3''-H_b), 0.86 (d, *J* = 7.1 Hz, 3 H, 7-H), 0.83 (dd, *J* = 7.4 Hz, 3 H, 4''-H), 0.78 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 5''-H), 0.76 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, 8-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 155.5 (C-2), 148.5 (C-2'), 147.7 (C-6'), 138.6 (C-4'), 132.3 (C-5'), 113.9 (C-3'), 62.8 (C-5), 58.9 (C-4), 39.5 (C-1''), 36.3 (C-2''), 28.9 (C-3''), 27.6 (C-6), 18.7

(C-5''), 17.9 (C-7), 14.3 (C-8), 11.3 (C-4'') ppm. FTIR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2959 (m), 2929 (w), 2874 (w), 1738 (s), 1602 (m), 1568 (m), 1484 (s), 1406 (s), 1321 (m), 1308 (m), 1200 (s), 1142 (m), 1113 (m), 1050 (m), 1002 (m), 771 (m), 752 (m) cm^{-1} . MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 277 (17), 276 (100) $[\text{M}]^+$, 233 (98), 217 (30), 208 (23), 191 (26), 190 (81), 189 (60), 164 (78), 134 (36), 133 (30), 132 (47), 107 (36), 41 (24). HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 276.1832; found 276.1856.

(R)-4-Isopropyl-3-{5-[(S)-2-methylbutyl]pyridin-2-yl}oxazolidin-2-one [(S,R)-2]: This compound was analogously prepared as described above using (R)-4-isopropylloxazolidin-2-one [(R)-3] to yield (S,R)-2 as a colorless viscous oil (940 mg, 3.40 mmol, 85%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -53.8$ ($c = 1.0$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 8.02$ (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.98 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, 3'-H), 7.42 (dd, $J = 8.6$, 2.3 Hz, 1 H, 4'-H), 4.78 (m, 1 H, 4-H), 4.29 (dd, $J = 8.9$ Hz, 1 H, 5-H_a), 4.19 (dd, $J = 8.9$, 3.9 Hz, 1 H, 5-H_b), 2.51 (dd, $J = 13.7$, 6.2 Hz, 1 H, 1''-H_a), 2.42 (m, 1 H, 6-H), 2.26 (dd, $J = 13.7$, 8.1 Hz, 1 H, 1''-H_b), 1.53 (m, 1 H, 2''-H), 1.32 (m, 1 H, 3''-H_a), 1.11 (m, 1 H, 3''-H_b), 0.85 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H, 7-H), 0.84 (dd, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 4''-H), 0.77 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 5''-H), 0.76 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 8-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 155.2$ (C-2), 148.3 (C-2'), 147.5 (C-6'), 138.3 (C-4'), 132.0 (C-5'), 113.6 (C-3'), 62.6 (C-5), 58.7 (C-4), 39.3 (C-1''), 36.2 (C-2''), 28.8 (C-3''), 27.4 (C-6), 18.5 (C-5''), 17.7 (C-7), 14.1 (C-8), 11.2 (C-4'') ppm.

(S)-4-Isopropyl-3-{5-[(R)-2-methylbutyl]pyridin-2-yl}oxazolidin-2-one [(R,S)-2]: Preparation from (R)-4 (278 mg, 1.52 mmol) and (S)-3 yielded a colorless viscous oil (374 mg, 1.35 mmol, 89%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +51.7$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

(R)-4-Isopropyl-3-{5-[(R)-2-methylbutyl]pyridin-2-yl}oxazolidin-2-one [(R,R)-2]: Preparation from (R)-4 (128 mg, 0.70 mmol) and (R)-3 yielded a white waxy solid (168 mg, 0.61 mmol, 87%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -61.5$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

(S)-3-(5-Isobutylpyridin-2-yl)-4-isopropylloxazolidin-2-one [(S)-20]: Preparation from **19** (676 mg, 4.00 mmol) and (S)-3 (774 mg, 6.00 mmol) yielded a white waxy solid (990 mg, 3.77 mmol, 94%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +66.1$ ($c = 1.0$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 7.99$ (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.96 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, 3'-H), 7.39 (dd, $J = 8.6$, 2.4 Hz, 1 H, 4'-H), 4.75 (m, 1 H, 4-H), 4.26 (dd, $J = 8.8$ Hz, 5-H_a), 4.16 (dd, $J = 8.9$, 3.9 Hz, 5-H_b), 2.38 (m, 1 H, 6-H), 2.32 (d, $J = 7.1$ Hz, 2 H, 1''-H), 1.73 (m, 1 H, 2''-H), 0.82 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 7-H), 0.80 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 3'-H), 0.79 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 4'-H), 0.72 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H, 8-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 155.1$ (C-2), 148.3 (C-2'), 147.4 (C-6'), 138.2 (C-4'), 131.9 (C-5'), 113.5 (C-3'), 62.5 (C-5), 58.6 (C-4), 41.3 (C-1''), 29.6 (C-2''), 27.3 (C-6), 21.9, 21.8 (C-3'' and C-4''), 17.6, 14.9 (C-7 and C-8) ppm. MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 262 (75) $[\text{M}]^+$, 219 (100), 203 (29), 176 (78), 175 (60), 150 (54), 134 (37), 133 (36), 132 (49), 107 (31). HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 262.1676; found 262.1678.

(R)-3-(5-Isobutylpyridin-2-yl)-4-isopropylloxazolidin-2-one [(R)-20]: Preparation from **19** (321 mg, 1.90 mmol) and (R)-3 (490 mg, 3.80 mmol) yielded a white waxy solid (426 mg, 1.62 mmol, 85%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -64.8$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

(E)-3-Methyl-4-(pyridin-3-yl)but-3-en-2-one (12): A 1-L three-necked flask with an internal thermometer, an overhead stirrer, and a dropping funnel was charged with 2-butanone (17.9 mL, 0.201 mol), nicotinic aldehyde (**8**, 9.5 mL, 0.101 mol), and acetic acid (140 mL). As the reaction mixture was stirred, H_2SO_4 (95 %, 16.3 mL, 0.305 mol) was added dropwise over 30 min so that the temperature did not rise over 50 °C. The resulting reddish solution

was stirred for an additional 2.5 h and heated slightly to maintain 50 °C. Afterwards, the solution was transferred into a 2-L flask with the aid of a water rinse (200 mL). An excess amount of Na_2CO_3 (50 g) was added in portions to destroy the H_2SO_4 . The aqueous solution was extracted with MTBE (3×500 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/ MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The remaining traces of acetic acid were removed by coevaporation with toluene (100 mL). Distillation of the crude residue using a Vigreux column (15 cm) afforded ketone **12** (11.071 g, 68.68 mmol, 68 %) as a pale yellow distillate; b.p. 105–106 °C (0.05 mbar). $R_f = 0.3$ (n -hexane/acetone, 3:1). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 8.53$ (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, 2'-H), 8.43 (dd, $J = 4.8$, 1.5 Hz, 1 H, 6'-H), 7.63 (ddd, $J = 7.9$, 2.1, 1.5 Hz, 1 H, 4'-H), 7.35 (s, 1 H, 4-H), 7.23 (dd, $J = 7.9$, 4.8 Hz, 1 H, 5'-H), 2.35 (s, 3 H, 1-H), 1.92 (d, $J = 1.4$ Hz, 3 H, 5-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 199.3$ (C-2), 150.3 (C-2'), 149.9 (C-6'), 139.3 (C-3), 136.1 (C-4'), 135.2 (C-4), 131.5 (C-3'), 123.0 (C-5'), 25.6 (C-1), 12.7 (C-5) ppm. FTIR (ATR): $\tilde{\nu} = 2965$ (w), 1663 (s), 1628 (m), 1565 (w), 1476 (w), 1413 (m), 1364 (m), 1248 (s), 1097 (m), 1002 (m), 877 (w), 804 (m), 758 (w), 708 (s) cm^{-1} . MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 161 (39) $[\text{M}]^+$, 160 (83), 146 (56), 132 (12), 118 (100), 117 (60), 91 (31), 89 (10), 79 (10), 65 (13). HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 162.09134; found 162.09133.

(S)-3-Methyl-4-(pyridin-3-yl)butan-2-one (13): A 2-L three-necked flask with an overhead stirrer and dropping funnel was charged with **12** (4.200 g, 26.05 mmol), DMSO (100 mL), tap water (350 mL), and dry baker's yeast (50 g). As the reaction mixture was stirred, a solution of sucrose (87.5 g) in tap water (150 mL) was added over 4 h. The batch was stirred additionally for about 48 h at room temp., until GC analysis revealed complete consumption of the starting material. Acetone (1.2 L) was added, and the mixture was vigorously stirred for 5 min, followed by suction filtration of the precipitated yeast. The acetone was removed under reduced pressure, and the resulting aqueous solution was extracted with Et_2O (3×0.8 L). The combined organic extracts were concentrated to a volume of 200 mL, and the resulting mixture was passed through a plug of silica/ MgSO_4 . The solvents were removed under reduced pressure leaving the crude material that was purified by column chromatography (silica gel; n -hexane/acetone, 3:1; $R_f = 0.3$) to yield **13** as a slightly yellow oil (2.626 g, 16.09 mmol, 62 %, 92 % ee). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +8.5$ ($c = 1.0$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 8.38$ (dd, $J = 4.8$, 1.7 Hz, 1 H, 6'-H), 8.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, 2'-H), 7.42 (ddd, $J = 7.8$, 2.2, 1.7 Hz, 1 H, 4'-H), 7.14 (ddd, $J = 7.8$, 4.8, 0.7 Hz, 1 H, 5'-H), 2.94 (dd, $J = 13.7$, 7.0 Hz, 1 H, 4-H_a), 2.76 (m, 1 H, 3-H), 2.50 (dd, $J = 13.7$, 7.3 Hz, 1 H, 4-H_b), 2.05 (s, 3 H, 1-H), 1.05 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 5-H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 210.6$ (C-2), 149.7 (C-2'), 147.1 (C-6'), 136.2 (C-4'), 123.0 (C-5'), 47.9 (C-3), 35.1 (C-4), 28.3 (C-1), 15.9 (C-5) ppm. MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 163 (65) $[\text{M}]^+$, 148 (58), 121 (40), 120 (54), 106 (100), 93 (24), 92 (91), 79 (27), 65 (36), 51 (17). HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}$ $[\text{M}]^+$ 163.0992; found 163.0992.

(S)-3-Methyl-4-(pyridin-3-yl)butan-2-ol (14): To a solution of **13** (5.400 g, 33.08 mmol) in MeOH (150 mL) at 0 °C was added NaBH_4 (1.513 g, 40.00 mmol) in small portions. The solution was stirred for 45 min. The solvent was removed, and the residue was partitioned between MTBE (100 mL) and water (80 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (3×100 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/ MgSO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel; n -hexane/acetone, 3:2; $R_f = 0.4$) to yield a mixture of two diastereomers of **14**

FULL PAPER

T. Müller, K. Dettner, K. Seifert

as a colorless oil (4.957 g, 30.00 mmol, 91 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 8.36 (d, *J* = 2.5 Hz, 2 H, 2'-H), 8.34 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 2 H, 6'-H), 7.45 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 2 H, 4'-H), 7.14 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 2 H, 5'-H), 3.72 (m, 1 H, 2-H) and 3.59 (m, 1 H, 2-H), 3.48 (br. s, 2 H, OH), 2.89 (dd, *J* = 13.6, 4.4 Hz, 1 H, 4-H_a), 2.83 (dd, *J* = 13.6, 5.6 Hz, 1 H, 4-H_a), 2.32 (dd, *J* = 13.6, 9.2 Hz, 1 H, 4-H_b), 2.30 (d, *J* = 13.6, 9.5 Hz, 1 H, 4-H_b), 1.71 (m, 2 H, 3-H), 1.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 6 H, 1-H), 0.80 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, 5-H), 0.75 (d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, 5-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 150.0 (C-2'), 146.6 (C-6'), 136.9 (C-3'), 136.7 (C-4'), 136.6 (C-4'), 123.1 (C-5'), 70.4 (C-2), 69.2 (C-2), 41.9 (C-3), 41.5 (C-3), 35.9 (C-4), 20.0 (C-1), 14.5 (C-5), 13.4 (C-5) ppm. FTIR (ATR): ν̄ = 3313 (br.), 2967 (m), 2931 (w), 2878 (w), 1577 (w), 1423 (m), 1377 (w), 1090 (m), 1028 (m), 928 (w), 712 (s) cm⁻¹. MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 165 (1) [M]⁺, 147 (81) [M - H₂O]⁺, 132 (58), 121 (25), 120 (48), 106 (100), 93 (76), 92 (65), 79 (30), 65 (28), 45 (24). HRMS (ESI): calcd. for C₁₀H₁₃NO [M + H]⁺ 166.12264; found 166.12256.

O-[(S)-1,2-Dimethyl-3-(pyridin-3-yl)propyl] Imidazole-1-carbothioate (15): A sealed tube with a stirring bar was charged with **14** (4.700 g, 28.45 mmol), TCDI (15.200 g, 85.29 mmol), and THF (200 mL). The tube was heated at 90 °C (oil bath temperature) for 8 h. After cooling, the solvent was evaporated to dryness, and the residue was partitioned between CH₂Cl₂ (300 mL) and water (300 mL). The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 200 mL). The combined organic extracts were concentrated to a volume of 80 mL, and the resulting mixture was passed through a plug of silica/MgSO₄ using EtOAc. Both solvents were removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/acetone, 3:2; *R*_f = 0.3) to yield a mixture of two diastereomers of **15** as a slightly yellow oil (6.423 g, 23.33 mmol, 82 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 8.36 (d, *J* = 2.4 Hz, 2 H, 2'-H), 8.35 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 2 H, 6'-H) 8.26 (s, 2 H, 2-H), 7.54 (d, *J* = 1.5 Hz, 2 H, 5-H), 7.44 (ddd, *J* = 7.8, 2.4, 1.6 Hz, 2 H, 4''-H), 7.16 (dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, 2 H, 5''-H), 6.99 (d, *J* = 1.5 Hz, 2 H, 4-H), 5.56 (m, 2 H, 1'-H), 2.80 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1 H, 3'-H_a), 2.76 (dd, *J* = 13.9, 6.0 Hz, 1 H, 3'-H_a), 2.46 (dd, *J* = 13.8, 8.8 Hz, 1 H, 3'-H_b), 2.42 (dd, *J* = 13.6, 9.1 Hz, 1 H, 3'-H_b) 2.28 (m, 2'-H), 2.17 (m, 1 H, 2'-H), 1.40 (d, *J* = 6.4 Hz, 6 H, 5'-H), 1.00 (d, *J* = 6.9 Hz, 3 H, 4'-H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H, 4'-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 182.9 (C-6), 149.9 (C-2'), 149.8 (C-2''), 147.3 (C-6''), 136.2 (C-2), 135.9 (C-4''), 135.8 (C-4'), 134.6 (C-3''), 134.4 (C-3'), 130.3 (C-4), 122.9 (C-5''), 117.3 (C-5), 83.6 (C-1'), 83.0 (C-1''), 39.0 (C-2'), 38.4 (C-2''), 35.8 (C-3'), 15.5 (C-5'), 14.9 (C-5''), 14.1 (C-4') ppm. FTIR (ATR): ν̄ = 3122 (w), 2972 (w), 2934 (w), 1575 (w), 1530 (w), 1463 (m), 1380 (s), 1322 (s), 1280 (s), 1228 (s), 1094 (s), 985 (s), 956 (s), 831 (m), 714 (s) cm⁻¹. MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 147 (17), 132 (22), 106 (100), 93 (40), 92 (55), 68 (26), 65 (43), 45 (58), 41 (71), 40 (43). HRMS (ESI): calcd. for C₁₄H₁₇N₃OS [M + H]⁺ 276.11651; found 276.11657.

(R)-3-(2-Methylbutyl)pyridine [(R)-6]: A solution of **15** (6.665 g, 24.20 mmol), Bu₃SnH (14.50 mL, 53.80 mmol), and AIBN (250 mg, 6.0 mol-%) in toluene (250 mL) was heated at reflux for 3 h. After cooling, the reaction mixture was extracted with aqueous HCl (1 N, 3 × 100 mL). The hydrochloric acid layer was filtered through a P4 frit and then basified with K₂CO₃. The resulting mixture was extracted with MTBE (3 × 150 mL). The MTBE extracts were dried with MgSO₄, and the solvents were evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/EtOAc, 3:1; *R*_f = 0.3) to yield **(R)-6** as a colorless oil with a distinct smell (2.670 g, 17.89 mmol, 74 %), spectroscopically

identical with that obtained previously.^[10] [α]_D²³ = -8.0 (*c* = 1.0, CHCl₃).

(2S,3R)-Stenusine [(2S,3R)-1]: A mixture of wet 20 % Pd(OH)₂/C (w/w, 278 mg, 20 mol-%), substrate (*S,S*)-**2** (0.548 g, 1.98 mmol), acetaldehyde (0.57 mL, 10.0 mmol), and acetic acid (16 mL) was stirred in an autoclave under a hydrogen atmosphere (150 bar) at 40 °C for 4 d. The reaction mixture was diluted with water (50 mL), and the catalyst was removed by suction filtration. As the mixture was cooled, the pH value was adjusted to 10 by the addition of diluted NaOH (2 N). The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). The combined organic extracts were washed with water, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography [silica gel; *n*-hexane/EtOAc/TEA (triethylamine), 75:25:5; *R*_f = 0.5) to yield (*S,R*)-**1** as a colorless oil (269 mg, 1.46 mmol, 74 %, 91 % *de*), spectroscopically identical with that obtained by Enders et al.^[8a] [α]_D²³ = +22.8 (*c* = 1.0, EtOH).

(2S,3S)-1: Preparation from (*S,R*)-**2** (720 mg, 2.61 mmol) yielded a colorless oil (373 mg, 2.04 mmol, 78 %, 90 % *de*), spectroscopically identical with that obtained by Enders et al.^[8a] [α]_D²³ = +11.1 (*c* = 1.0, EtOH).

(2R,3R)-1: Preparation from (*R,S*)-**2** (315 mg, 1.14 mmol) yielded a colorless oil (153 mg, 0.83 mmol, 73 %, 90 % *de*). [α]_D²³ = -10.5 (*c* = 1.0, EtOH).

(2R,3S)-1: Preparation from (*R,R*)-**2** (229 mg, 0.83 mmol) yielded a colorless oil (120 mg, 0.66 mmol, 79 %, 91 % *de*). [α]_D²³ = -20.3 (*c* = 1.0, EtOH).

(R)-Norstenusine (R)-21: Preparation from (*S*)-**20** (610 mg, 2.33 mmol) yielded a colorless oil (320 mg, 1.89 mmol, 81 %, 92 % *ee*). [α]_D²³ = +3.3 (*c* = 1.0, MeOH). The compound was spectroscopically identical with that obtained previously.^[10]

(S)-21: Preparation from (*R*)-**20** (309 mg, 1.18 mmol) yielded a colorless oil (160 mg, 0.945 mmol, 80 %, 90 % *ee*). [α]_D²³ = -3.0 (*c* = 1, MeOH). The compound was spectroscopically identical with that obtained previously.^[10]

Supporting Information (see footnote on the first page of this article): ¹H and ¹³C NMR spectra for the key compounds and chiral GC data are available.

Acknowledgments

Support of this research by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (SE 595/14-1, DE 258/12-1) is gratefully acknowledged. We are also indebted to Dr. Holm Frauendorf and Michael Müller (Institut für Organische und Bioorganische Chemie, Georg-August-Universität Göttingen) for the HRMS measurements. Finally, Dr. Siegfried Kehl (Tierökologie II, Universität Bayreuth) is thanked for taking pictures of *S. bimaculatus*.

- [1] V. Puthz, *Linzer Biol. Beitr.* **2008**, *40*, 137–230.
- [2] G. Billard, C. Bruyant, *C. R. Acad. Sci. Soc. Biol.* **1905**, *59*, 102–103.
- [3] H. Schildknecht, D. Krauß, J. Connert, H. Essenbreis, N. Orfanides, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 421–422; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 427.
- [4] a) H. Müller, *Prax. Naturwiss. Biol.* **1976**, *25*, 132–133; b) K. E. Linsenmair, R. Jander, *Naturwissenschaften* **1963**, *50*, 231; c) K. E. Linsenmair, *Kosmos* **1963**, *59*, 331–334.
- [5] H. Schildknecht, *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 17–25; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 1–9.
- [6] P. Kohler, *Ph.D. Thesis*, Ruprecht Karl University, Heidelberg, **1979**.

- [7] H. Schildknecht, D. Berger, D. Krauß, J. Connert, J. Gehlhaus, H. Essenbreis, *J. Chem. Ecol.* **1976**, *2*, 1–11.
- [8] a) D. Enders, J. Tiebes, N. De Kimpe, M. Keppens, C. Stevens, G. Smagghé, O. Betz, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4881–4884; b) Three of the four conversions must be conducted at temperatures as low as $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Furthermore, liquid ammonia was used.
- [9] I. Lusebrink, D. Burkhardt, T. Gedig, K. Dettner, A. Mosandl, K. Seifert, *Naturwissenschaften* **2007**, *94*, 143–147.
- [10] T. Gedig, K. Dettner, K. Seifert, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2670–2674.
- [11] I. Lusebrink, K. Dettner, K. Seifert, *Naturwissenschaften* **2008**, *95*, 751–755.
- [12] I. Lusebrink, K. Dettner, A. Schierling, T. Müller, C. Daolio, B. Schneider, J. Schmidt, K. Seifert, *Z. Naturforsch. C* **2009**, *64*, 271–278.
- [13] a) C. Stevens, N. De Kimpe, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 132–134; b) L. Micouin, T. Varea, C. Riche, A. Chiaroni, J.-C. Quirion, H.-P. Husson, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2529–2532; c) S. Heilporn, J.-C. Braekman, D. Dalozé, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 193–200; d) E. Poupon, N. Kunesch, H.-P. Husson, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1553–1555; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1493–1495; e) A. Castro-C., J. Juárez-P., D. Gnecco, J. L. Terán, A. Galindo, S. Bernès, R. G. Enríquez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 949–952.
- [14] a) K. Mori, H. Takikawa, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 497–500; b) E. M. Santangelo, A. G. Corrêa, P. H. G. Zarbin, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5135–5137.
- [15] H. J. Bestmann, R. T. S. Frighetto, N. Frighetto, O. Vostrowsky, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 877–880.
- [16] F. Glorius, N. Spielkamp, S. Holle, R. Goddard, C. W. Lehmann, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2910–2913; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2850–2852.
- [17] D. A. Evans, A. S. Kim, in: *Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Chiral Reagents for Asymmetric Synthesis* (Ed.: L. A. Paquette), Wiley, New York, **2003**, p. 57.
- [18] A. Klapars, X. Huang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7421–7428.
- [19] a) J. Mathieu, P. Gros, Y. Fort, *Chem. Commun.* **2000**, 951–952; b) P. Gros, S. Choppin, J. Mathieu, Y. Fort, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 234–237; c) U. Kiehne, J. Bunzen, H. Staats, A. Lützen, *Synthesis* **2007**, 1061–1069.
- [20] a) Y. Kondo, M. Shilai, M. Uchiyama, T. Sakamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3539–3540; b) P. F. H. Schwab, F. Fleischer, J. Michl, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 443–449.
- [21] a) K. Tamao, S. Kodama, I. Nakajima, M. Kumada, A. Minato, K. Suzuki, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3347–3354; b) P. Pino, O. Piccolo, B. Straub, G. Consiglio, D. C. Tran, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 2102–2109.
- [22] Y. Kawai, M. Hayashi, N. Tokitoh, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3007–3013.
- [23] The best yields were obtained by the slow addition of C_2Cl_6 , dissolved in *n*-hexane, over a period of 2 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ using a syringe pump.
- [24] a) D. H. R. Barton, S. W. McCombie, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 1574–1585; b) Z. E. Wilson, A. M. Heapy, M. A. Brimble, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5379–5385.

Received: May 2, 2011
Published Online: ■

Cicindeloinine from *Stenus cicindeloides* – Isolation, Structure Elucidation and Total Synthesis

 Tobias Müller,^[a] Matthias Göhl,^[a] Inka Lusebrink,^[b] Konrad Dettner^[b] and Karlheinz Seifert*^[a]

Abstract: The new piperidine alkaloid cicindeloinine (**3**) has been isolated from the pygidial glands of the beetles *Stenus cicindeloides* and *Stenus solutus*. The structure of **3** could be elucidated by NMR spectroscopy and the absolute configuration by asymmetric synthesis.

A very efficient gram scale synthesis for **3** was developed using an intramolecular aza-Wittig reaction as final step. The synthetic route comprises 12 steps and proceeds in 20% total yield. Nine of the twelve steps can be

conducted without column chromatography.

Keywords: Alkaloids • aza-Wittig reactions • Schiff bases • Structure elucidation • *Stenus* beetles

Introduction

Since the beginning of the last century,^[1] *Stenus* beetles which belong to the genus *Stenus* Latreille, one of most species-rich genera of the animal kingdom,^[2] have attracted attention due to their artful escape mechanism on the water surface. In the case of danger, *Stenus* beetles escape jet-propelled by secreting a surface-active fluid from their pygidial glands, which is adapted for both propulsion and defensive purposes. The release of this surfactant results in a surface tension gradient and the small animal, weighing about 2.5 mg, is therefore propelled forward.^[3] If the fluid is constantly released, *Stenus* beetles travel distances up to 15 m with velocities of 40–75 cm/s by this method, also called skimming.^[4] The responsible compound for this phenomenon is stenusine (**1**).^[3] For some *Stenus* species we found a characteristic fingerprint of **1** in terms of its stereochemical composition.^[5] Furthermore **1** shows antimicrobial properties^[6] and deterrent^[7] activities against predators.

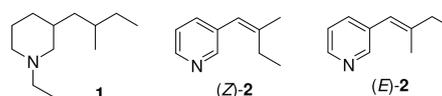


Figure 1. Structures of the *Stenus*-alkaloids stenusine (**1**), and (*Z*)- and (*E*)-3-(2-methylbut-1-enyl)pyridine (**2**).

Results and Discussion

The *Stenus* species *Stenus cicindeloides* and *Stenus solutus* produce no stenusine in their pygidial glands, however *S. cicindeloides* was observed to skim over the water.^[1] We found that their secretions comprise mainly the pyridine alkaloids (*Z*)- and (*E*)-**2**^[7] and the so far unknown compound **3**. The GC-MS (EI) of the pygidial glands extract from *S. cicindeloides* (Figure 2) revealed **3** (Figure 3) as the main compound which showed a molecular ion peak of *m/z* 167 and the molecular formula was determined to C₁₀H₁₇NO by HRMS (ESI).

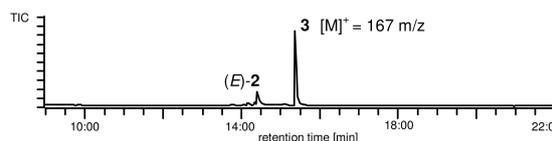


Figure 2. Total ion chromatogram of the crude pygidial gland extract from *S. cicindeloides*.

[a] T. Müller, M. Göhl, Prof. Dr. K. Seifert
 Lehrstuhl für Organische Chemie, NW II, Universität Bayreuth
 Universitätsstraße 30, D-95447 Bayreuth
 Fax: + (49) 921-55-5358
 E-mail: karlheinz.seifert@uni-bayreuth.de

[b] Dr. I. Lusebrink, Prof. Dr. K. Dettner
 Universität Bayreuth
 Lehrstuhl für Tierökologie II
 Universitätsstraße 30, D-95447 Bayreuth, Germany

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemeurj.org/> or from the author.

In order to obtain sufficient material for NMR analysis, the pygidial glands of 60 beetles were dissected, homogenized and the

EtOAc extract was subjected to a very simple acid base extraction. The so obtained CDCl_3 extract was directly transferred to an NMR tube and ^1H , ^1H -COSY, HSQC, and HMBC data sets were acquired. Compound **3** revealed a *sec*-butyl moiety, adjacent to the methine carbon 2 which shows a doublet at δ 2.71 (1H) and δ 67.1 (^{13}C). A strong 3J -HMBC correlation of the 2-H proton at δ 2.71 with the azomethine carbon at δ 164.8 and a weak 2J -HMBC cross peak of the 4-H proton at δ 7.11 with the quaternary bridgehead carbon at δ 55.1 confirm the position of the epoxy group. Three further ^{13}C methylene group signals led to the six membered ring of the new piperidine alkaloid **3** which is to our best knowledge the first epoxy piperidine alkaloid in the nature.

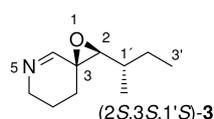
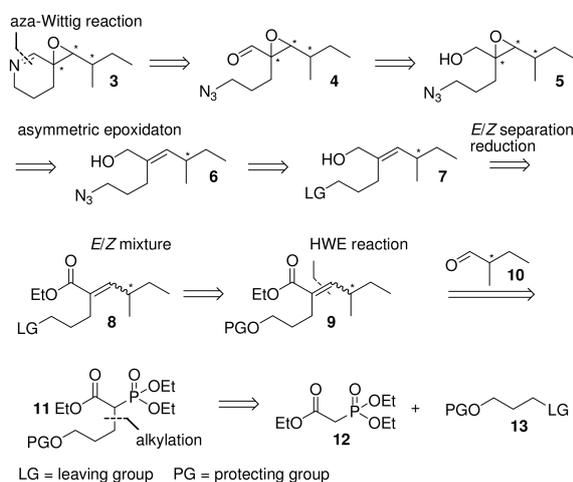


Figure 3. Structure of the *Stenus*-alkaloid cicindeloin (**3**).

In order to determine unambiguously the structure, the unknown absolute configuration, and to have enough material for biological tests a synthetic approach for **3** was developed (Scheme 1). The azomethine moiety should be introduced by the widely used intramolecular aza-Wittig reaction^[8-9] from aldehyde **4**. The epoxy functionality in **5** was planned to be generated by the reliable Sharpless asymmetric epoxidation method^[10] from allylic alcohol **6**, which should be available after functional group interconversions from the α,β -unsaturated ester **9**. Disconnection of the double bond in **9** revealed aldehyde **10** and phosphonoester **11**. Further disconnection of the latter led finally to the commercial compound **12** and the protected C-3 building block **13**.

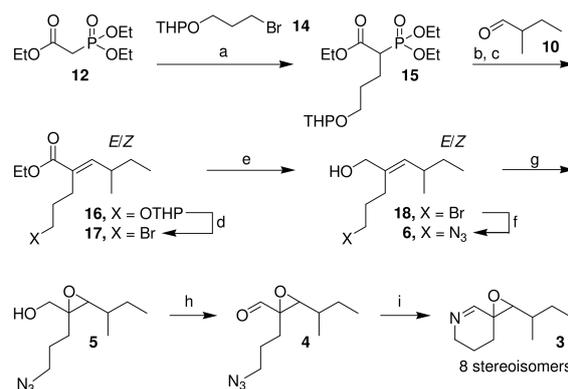


Scheme 1. Retrosynthetic analysis of cicindeloin (**3**).

Since the absolute configuration of **3** was unknown, the first objective was to prepare a sample containing all stereoisomers and to compare it with the natural compound by means of chiral GC. The THP-protected C-3 building block **14** was prepared by monobromination^[11] of 1,3-propanediol and subsequent protection^[12] using known procedures (Scheme 2). The alkylation of triethyl

phosphonoacetate (**12**) with this building block **14** furnished the known ester **15**.^[13] Subsequent HWE reaction under very similar reaction conditions (b) gave (*E/Z*)-**16** as a nearly 1:1 mixture. The THP group in **16** was directly converted into the bromide **17**,^[14] which gave after reduction of the ester moiety the allylic alcohol **18**.^[15] Displacement of the bromine in **18** with NaN_3 in DMSO at room temperature^[16] yielded the terminal azide **6** which was then epoxidized by mCPBA^[17] giving eight stereoisomers of the epoxy alcohol **5**. Subsequent PCC oxidation^[18] of **5** led to the rather unstable aldehyde **4** which had to be cyclized^[8b] rapidly by addition of five equivalents of PPh_3 .

With the desired compound in hands, we proceeded with the elucidation of the absolute configuration of **3**. All isomers of the synthetic mixture were separated by chiral GC (Figure 4). The natural product could be unambiguously identified (t_R 25.46 min) by coinjection of the synthetic and natural sample. The absolute configuration was determined by systematic alternation of the cicindeloin synthesis. At first, (*E/Z*)-**18** was separated by MPLC on normal phase using an *n*-hexane/MTBE gradient. If the synthesis of **3** was carried out again with (*Z*)-**18** (Scheme 2), only the peaks with t_R 22.85–24.40 min appeared in the chiral GC. To clarify the configuration at the side chain (1'-position) of **3**, we repeated its synthesis with aldehyde (*S*)-**10**. This resulted in a group of four diastereomers of **3** which eluted in the GC at t_R 22.85, 24.40, 25.37, and 25.46 (natural compound) min. Even though the HWE olefination of **15** was performed at -78 °C, a significant change from the (4*S*)- to the (4*R*)-configuration of (*E/Z*)-**16** was observed which led to the undesired (1'*R*) diastereomers of **3**. At last, (*E/Z*)-**6** was subjected to Sharpless epoxidation using L-(+)-DET. The formed epoxide **5** was further converted to the target compound **3**. Since the natural product was again included in the group of generated diastereomers (chiral GC: t_R 22.85, 23.30, 25.20, 25.46 min), the configuration of the new alkaloid cicindeloin (**3**) was exactly determined to (2*S*,3*S*,1'*S*). However, it should be noted, that the Sharpless epoxidation of the (*Z*)-olefin **6** proceeded only with a synthetically useless excess of about 25% ee with respect to the (2*R*,3*S*)-configuration of the epoxy group.



Scheme 2. Synthesis of cicindeloin (**3**) (isomeric mixture). Reagents and conditions: (a) NaH, KI, DMF, 80 °C, 24 h, 64%; (b) NaH, DMF, 80 °C, overnight, 90%; (c) KHMDS, THF, -78 °C to room temp., overnight, 83% (d) PPh_3 , Br_2 , CH_2Cl_2 , 0 °C, overnight, 80%; (e) DIBAL-H, CH_2Cl_2 , -78 °C, 3 h, 96%; (f) NaN_3 , DMSO, room temp., 3 h, 95%; (g) mCPBA, CH_2Cl_2 , room temp., 3 h, 71%; (h) PCC, CH_2Cl_2 , room temp., overnight; (i) PPh_3 , THF, room temp., overnight, 34% over two steps.

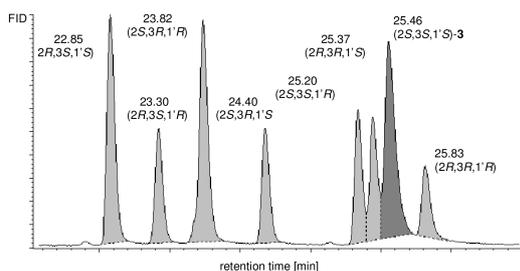
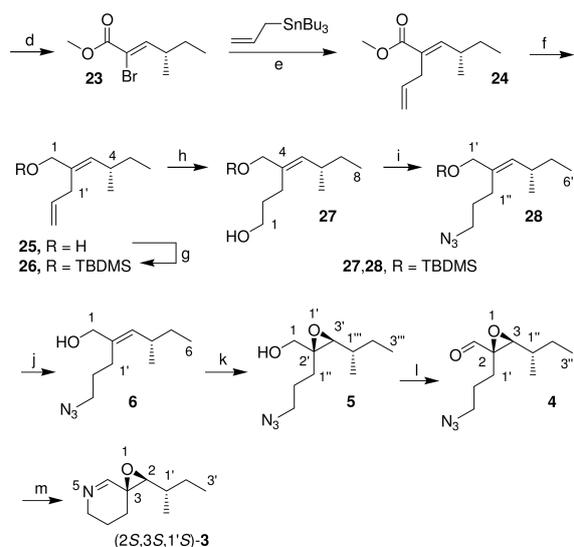
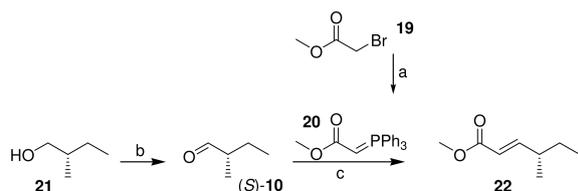


Figure 4. Coinjection of synthetic cicindeloin (**3**) (isomeric mixture, Scheme 2) with the natural sample from *S. cicindeloides* (see Figure 2) on chiral stationary phase (GC). Column: BGB-176SE, 30 m, ID 0.25 mm, film 0.25 μ m. Carrier gas: H₂. Oven conditions: 60 °C, heating rate 3 °C/min to 210 °C (20 min isothermal).

With all this information in mind, we envisioned a direct and racemization free access to the allylic alcohol (*S,E*)-**6** for the final synthesis of (2*S*,3*S*,1'*S*)-**3**. Hence, ester **24** (Scheme 3), originally prepared by Trost et al.^[19] was chosen to act as a precursor for our target compound. Therefore the ester **19** was converted into the stabilized triphenyl phosphonium ylide **20** using a modified literature protocol.^[20] This ylide was allowed to react with the aldehyde (*S*)-**10**,^[21] which had been freshly prepared by oxidation of the primary alcohol (*S*)-**21** using the reliable NaOCl/TEMPO^[22] method, to afford ester **22** in very good yield (77% over two steps). The intermediate isolation of the aldehyde (*S*)-**10** led to dramatically lower yields and should be omitted in any case. *Trans*-bromination and *syn*-dehydrobromination^[19] of **22** gave the (*Z*)-vinyl bromide **23** (79%) as a single geometric isomer. Stille cross coupling of this bromide with allyltributyltin generated the ester **24** in good yield (88%) after distillation, again as a single geometric isomer.^[19,23] Furthermore the often tedious and tricky removal of the toxic tin by-products was rendered redundant due to the applied workup procedure. Ester **24** was subsequently reduced with DIBAL-H, TBDMS-protected and hydroborated-oxidized to afford the alcohol **27** via a three step sequence in excellent yield (79%).^[24] The hydroxy moiety was then converted into the azide **28** via the corresponding methanesulfonate and the TBDMS group was cleaved by hydrofluoric acid^[25] to furnish the allylic alcohol (*S,E*)-**6** (77% over two steps). The synthesis was concluded again by Sharpless epoxidation (94%, 97% de) of (*S,E*)-**6**, oxidation of the so generated epoxy alcohol **5** to the epoxy aldehyde **4** by Dess-Martin periodinane^[26] (83%) and a final aza-Wittig reaction (77%). It is worth noting that the target compound **3** needed no purification by chromatography. The alkaloid has been isolated by acid base treatment with several washings of the acidic aqueous layer with CHCl₃ and Et₂O. The aqueous phase was basified with K₂CO₃, extracted with CHCl₃ and evaporated. The product showed a GC purity of 99.5%. The stereochemical composition was determined as follows: (2*S*,3*S*,1'*S*)-**3**, 97.5%; (2*R*,3*R*,1'*S*)-**3**, 1.5%; (2*S*,3*S*,1'*R*)-**3**, 1.0% (see Figure 5 or supplemental material).



Scheme 3. Final synthesis of cicindeloin (**3**). Reagents and conditions: (a) 1. PPh₃, toluene, 2. NaOH, 89%; (b) NaOCl, TEMPO, KBr, CH₂Cl₂, H₂O, room temp., 20 min; (c) CH₂Cl₂, room temp., overnight, 77% over two steps; (d) 1. Br₂, CH₂Cl₂, room temp., overnight, 2. NEt₃, CH₂Cl₂, room temp., overnight, 79%; (e) allyltributylstannane, Pd(PPh₃)₄, DMF/benzene 1:1, 80 °C, overnight, 88%; (f) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C, 3 h; (g) TBDMSCl, imidazole, 4-DMAP, CH₂Cl₂, room temp., 3 h; (h) 1. 9-BBN, THF, 0 °C, overnight, 2. NaOH, H₂O₂ (30%), 0 °C, 1 h, 79% over three steps; (i) 1. MsCl, NEt₃, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h, 2. NaN₃, NaBr, DMSO, 60 °C, 3 h; (j) 5% HF in MeCN/DMF 1:1, room temp., 1 h, 77% over two steps; (k) 1. *L*-(+)-DET, Ti(O*i*Pr)₄, *t*-BuOOH, molecular sieve, CH₂Cl₂, -78 °C to room temp., overnight, 94%, 97% de; (l) Dess-Martin periodinane, CH₂Cl₂, room temp., 30 min, 83%; (m) PPh₃, THF, room temp., overnight, 77%.

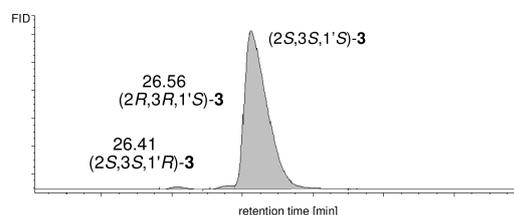


Figure 5. Chiral GC of synthetic cicindeloin (**3**) prepared according to Scheme 3. Oven conditions are identical as indicated in Figure 4.

Conclusion

We were able to add a new member to the group of *Stenus* alkaloids (Figure 1 and 3) which appears in high amount in *S. cicindeloides* and *S. solutus*. Cicindeloin (**3**) is the first epoxy piperidine alkaloid in nature. A synthetic access for this new alkaloid, comprising 12 steps was established. The alkaloid was obtained in an excellent total yield of 20% (Scheme 3) and good stereochemical purity (Figure 5). Furthermore, the absolute configuration of the alkaloid **3** was unambiguously assigned by total synthesis. Biological assays are underway to test if the compound is deployed as “chemical warfare agent” against microorganisms and predators by *Stenus* beetles. The spreading activity of **3** will also be determined.

Experimental Section

General: All reactions were performed in oven-dried glassware under an argon atmosphere using standard Schlenk techniques. THF and Et₂O were distilled from sodium/potassium alloy or sodium diphenyl ketyl, toluene from LiAlH₄ and CH₂Cl₂ from P₂O₅. Solvents for chromatography were purchased technical grade and distilled prior to use. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on precoated Alugram® SIL G/UV₂₅₄ plates from MACHERY-NAGEL. TLC spots were visualized by dipping the plate into molybdophosphoric acid (5% in ethanol) or cerium molybdate solution with subsequent heating. Difficult to stain compounds were visualized by iodine vapor. MPLC separations were conducted on a BÜCHI Sepacore® system with SepacoreControl software and C-620 control unit. Mass spectra were recorded using a FINNIGAN MAT 95 (EI, 70 eV) and a BRUKER APEX IV [HRMS (ESI)] fourier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometer. IR spectra were recorded on a PERKIN-ELMER FT-IR spectrophotometer equipped with an ATR sampling unit. NMR spectra were recorded under conditions as indicated using a BRUKER Avance 300 spectrometer and referenced to the residual solvent signal (CHCl₃ = 7.26 ppm and CDCl₃ = 77.0 ppm). Chiral GC data were recorded on a HEWLETT PACKARD 5890 Series II, or a CARLO ERBA HRCG 5160 gas chromatograph. All starting compounds were purchased from commercial sources and used as received. Reactions were monitored by TLC or gas chromatography using a TR-5MS column.

Isolation of cicindeloides: The pygidial glands from 60 beetles of the species *S. cicindeloides* were dissected, homogenized and extracted with EtOAc (SupraSolv MERCK). This crude extract (1 mL) was transferred to a conical GC vial and allowed to evaporate slowly in the fume hood. The residue was partitioned between CHCl₃ (0.8 mL) and aqueous HCl (5%, 0.8 mL). The CHCl₃ layer was removed via syringe and the aqueous layer was washed with CHCl₃ (2 × 0.8 mL). The aqueous layer was basified by addition of solid NaHCO₃ and extracted with CDCl₃ (0.8 mL). The CDCl₃ layer was directly transferred to the NMR tube via syringe.

(E/Z)-4-Methyl-2-[3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-propyl]-hex-2-enoic acid ethyl ester (16): To a suspension of NaH (60% in mineral oil, 458 mg, 11.5 mmol) in DMF (50 mL) was added under stirring compound **15** (4.000 g, 10.92 mmol). After 15 min, 2-methylbutyraldehyde (**10**) (1.17 mL, 10.9 mmol) was added and the reaction mixture was allowed to stir overnight at 80 °C. The reaction mixture was partitioned between water (200 mL) and MTBE (200 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (2 × 200 mL). The combined organic extracts were washed with brine, passed through a plug of silica/MgSO₄ and evaporated. The resulting crude ester **16** was purified by MPLC (MN-Polygoprep 100-20; *n*-hexane/MTBE gradient from 5% to 10% in 50 min; flow rate 50 mL/min; column: 460 × 36 mm; detection at λ = 245 nm). Yield: (2.931 g, 9.82 mmol, 90%). R_f = 0.4 (*n*-hexane/EtOAc 9:1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 6.46, 5.53 (2 × d, J = 10.4, 10.1 Hz, 1 H, 3-H), 4.51 (2 × m, 1 H, 2''-H), 4.13, 4.12 (2 × q, J = 7.1 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 3.80 (2 × m, 1 H, 6''-H_a), 3.67 (2 × m, 1 H, 3''-H_b), 3.43 (2 × m, 1 H, 6''-H_b), 3.33 (2 × m, 1 H, 3''-H_a), 2.85, 2.38 (2 × m, 1 H, 4-H), 2.28 (2 × m, 2 H, 1''-H), 1.64 (2 × m, 2 H, 2''-H), 1.23 (2 × t, J = 7.1 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.83–1.10 (m, 16 H, 5-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 0.94, 0.91 (2 × d, J = 6.6 Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.80, 0.78 (2 × t, J = 7.4 Hz, 3 H, 6-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 168.1, 167.9 (1-C), 148.2, 147.1 (3-C), 130.6, 130.3 (2-C), 98.6, 98.5 (2''-C), 66.9, 66.8 (3''-C), 62.1 (6''-C), 60.1, 59.8 (OCH₂CH₃), 34.9, 34.5 (4-C), 31.2, 23.5 (1''-C), 30.6 (3''-C), 30.6, 29.9 (2''-C), 30.0, 29.5 (5-C), 25.4 (4''-C), 19.5 (5''-C), 20.2, 19.9 (4-CH₃), 14.1 (OCH₂CH₃), 11.8, 11.7 (6-C) ppm. FT-IR (ATR): ν̄ = 2959 (m), 2873 (w), 1709 (s), 1644 (w), 1455 (w), 1032 (vs) cm⁻¹. GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 214 (17), 197 (31), 169 (47), 152 (29), 123 (26), 95 (20), 85 (100), 81 (19), 67 (24), 55 (30). HRMS (ESI): calcd. for [C₁₇H₃₀O₄ + Na]⁺: 321.2036; found: 321.2038. **(S,E/Z)-16:** To a solution of compound **15** (1.277 g, 3.485 mmol) in THF (20 mL) at 0 °C was slowly added KHMDS (0.9 M in THF, 3.83 mL, 3.45 mmol) and the mixture was stirred for 30 min. The reaction mixture was cooled to -78 °C and aldehyde (**S-10**) (1.30 mL, 12.1 mmol) was added. The reaction mixture was allowed to reach room temp. overnight and partitioned between water (60 mL) and MTBE (60 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (2 × 80 mL). The combined organic extracts were washed with brine, passed through a plug of silica/MgSO₄ and evaporated. The resulting crude ester was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/EtOAc 9:1; R_f = 0.4), yielding **(S,E/Z)-16** as colourless oil (862 mg, 2.89 mmol, 83%).

(E/Z)-2-(3-Bromopropyl)-4-methylhex-2-enoic acid ethyl ester (17): To a solution of PPh₃ (786 mg, 3.00 mmol) in CH₂Cl₂ (12 mL) at 0 °C was added slowly bromine (154 μL, 3.00 mmol). After 30 min of stirring, compound **16** (665 mg, 2.23 mmol), in CH₂Cl₂ (1 mL) was added dropwise and the reaction mixture was allowed to reach room temp. overnight. The reaction mixture was partitioned between water (80 mL) and MTBE (80 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (2 × 80 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, concentrated and passed through a short column of silica using *n*-hexane/EtOAc 9:1 as eluent in order to remove the PPh₃O. After evaporation of the solvent, the resulting crude ester **17** was purified by MPLC (MN-Polygoprep 100-20; *n*-hexane/MTBE 98:2 isocratic with premixed solvent; flow rate 40 mL/min; column: 460 × 26 mm; detection at λ = 225 nm). Yield: (494 mg, 1.78 mmol, 80%). R_f = 0.7 (*n*-hexane/EtOAc 9:1). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 6.53, 5.63 (2 × d, J = 10.5, 10.1 Hz, 1 H, 3-H), 4.15, 4.14 (2 × q, J = 7.1 Hz, 2 H,

OCH₂CH₃), 3.35, 3.34 (2 × t, J = 6.4 Hz, 2 H, 3''-H), 2.89, 2.42 (2 × m, 1 H, 4-H), 2.40, 2.38 (2 × m, 2 H, 1''-H), 1.93 (2 × m, 2 H, 2''-H), 1.33 (2 × m, 2 H, 5-H), 1.25 (2 × t, J = 7.1 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 0.97, 0.93 (2 × d, J = 6.6 Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.82, 0.81 (2 × t, J = 7.4 Hz, 3 H, 6-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 167.8, 167.8 (1-C), 149.2, 148.7 (3-C), 129.4, 128.9 (2-C), 60.3, 60.0 (OCH₂CH₃), 35.1, 34.7 (4-C), 33.4, 25.5 (1''-C), 33.0, 32.8 (3''-C), 32.4, 31.8 (2''-C), 29.9, 29.6 (5-C), 20.2, 20.0 (4-CH₃), 14.2 (OCH₂CH₃), 11.9, 11.7 (6-C) ppm. FT-IR (ATR): ν̄ = 2961 (m), 2929 (w), 2873 (w), 1706 (vs), 1645 (w), 1456 (w), 1273 (m), 1231 (s), 1155 (s), 1095 (m), 1069 (m), 1026 (m), 760 (m) cm⁻¹. GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 278, 276 (11) [M]⁺, 233 (13), 231 (13), 221 (7), 220 (7), 169 (100), 123 (41), 95 (21), 67 (15), 55 (13), 41 (15). HRMS (ESI): calcd. for [C₁₂H₂₁⁷⁹BrO₂ + Na]⁺: 299.0617; found: 299.0622; calcd. for [C₁₂H₂₁⁸¹BrO₂ + Na]⁺: 301.0597; found: 301.0603.

(E)- and (Z)-2-(3-Bromopropyl)-4-methylhex-2-en-1-ol (18): This compounds were prepared in 96% yield from ester **17** in an identical procedure as that described for compound **25**. **(E)- and (Z)-18** were separated by MPLC (MN-Nucleodur® 100-12; *n*-hexane/MTBE gradient; flow rate 30 mL/min; column: 460 × 26 mm; detection at λ = 225 nm). **(E)-18:** ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 5.19 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, 3-H), 3.99 (d, J = 1.1 Hz, 2 H, 1-H), 3.37 (t, J = 6.6 Hz, 2 H, 3''-H), 2.30 (m, 1 H, 4-H), 2.22 (m, 2 H, 1''-H), 1.94 (m, 2 H, 2''-H), 1.39–1.15 (m, 2 H, 5-H), 0.91 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.81 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, 6-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 135.7 (2-C), 134.8 (3-C), 67.0 (1-C), 33.6 (3''-C), 33.5 (4-C), 31.7 (2''-C), 30.1 (5-C), 26.6 (1''-C), 20.8 (4-CH₃), 11.9 (6-C) ppm. **(Z)-18:** ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 5.09 (d, J = 9.9 Hz, 1 H, 3-H), 4.13 (d, J = 11.9 Hz, 1 H, 1-H_a), 4.07 (d, J = 11.9 Hz, 1 H, 1-H_b), 3.39 (t, J = 6.7 Hz, 2 H, 3''-H), 2.32 (m, 1 H, 4-H), 2.24 (m, 2 H, 1''-H), 1.98 (m, 2 H, 2''-H), 1.32 (m, 1 H, 5-H_a), 1.17 (m, 1 H, 5-H_b), 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.80 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, 6-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 136.2 (3-C), 135.1 (2-C), 60.2 (1-C), 33.7 (4-C), 33.4 (3''-C), 33.1 (1''-C), 31.2 (2''-C), 30.2 (5-C), 21.3 (4-CH₃), 11.9 (6-C) ppm. GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 236, 234 (3) [M]⁺, 218, 216 (3), 205, 203 (22), 179, 177 (23), 151, 149 (35), 123, 121 (12), 95 (31), 81 (30), 73 (100), 69 (35), 55 (50), 41 (63). HRMS (ESI): calcd. for [C₁₀H₁₉⁷⁹BrO + Na]⁺: 257.0512; found: 257.0514.

Carbomethoxymethylene-triphenylphosphorane (20): To a solution of PPh₃ (126 g, 0.48 mol) in toluene (750 mL) at room temp., methyl bromoacetate (**19**) (73 g, 0.48 mol) was added dropwise over a period of 30 min and after complete addition the reaction mixture was stirred for additional 24 h. The white precipitate was collected on a Buchner funnel, washed with toluene (250 mL) and then with diethyl ether (500 mL). The remaining solid was dried under reduced pressure yielding carbomethoxymethylene-triphenylphosphonium bromide (182.0 g, 0.438 mol) as a white solid, m.p. 162 °C. This white solid was dissolved in water (3 L). The resulting solution was transferred to a 4 L flask equipped with a SmCo-stirring bar, by suction filtration to remove any insoluble impurities. The solution was cooled to 0 °C and phenolphthalein was added as an indicator. A solution of NaOH (17.6 g in 100 mL H₂O) was added within 20 min until a slight pink colour persisted. The white product was collected by extraction with CH₂Cl₂ (2 × 800 mL). The combined organic extracts were washed with water and concentrated to a volume of 350 mL. In order to gain a fluffy powder, *n*-hexane (350 mL) was added to induce precipitation. The product was isolated by removing the CH₂Cl₂ at normal pressure and evaporating the remaining *n*-hexane in vacuo, yielding **20** as a white amorphous powder; m.p. 165 °C (142.4 g, 0.426 mol, 89 %). Compound **20** was spectroscopically identical to that previously reported.^[20]

(S)-2-Methylbutyraldehyde [(S)-10]: To a solution of (S)-(-)-2-methylbutan-1-ol (**21**) (28.7 mL, 0.267 mol) in CH₂Cl₂ (100 mL) cooled at 0 °C, was added first, TEMPO (1.100 g, 7.04 mmol) and then, a solution of KBr (4.00 g, 33.6 mmol) in H₂O (20 mL). This biphasic mixture was vigorously stirred for 15 min in an ice bath. Afterwards, a NaOCl solution (13% active chlorine, 150 mL) containing NaHCO₃ (6.84 g) was added slowly within 20 min, by means of a dropping funnel. After stirring for 20 min, the reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (200 mL) and H₂O (100 mL) and the two layers were separated. The aqueous layer was further extracted with CH₂Cl₂ (2 × 150 mL). The combined organic extracts were consecutively washed with aq. KI, diluted HCl, aq. Na₂S₂O₃ and H₂O; dried over Na₂SO₄ and filtered through a P4 frit. Since the isolation of the aldehyde (**S-10**) resulted in an enormous loss of material, this crude organic extract was used directly for the next step.

(S,E)-4-Methylhex-2-enoic acid methyl ester (22): To the above obtained crude extract of (**S-10**) was added carbomethoxymethylene-triphenylphosphorane (**20**) (90.0 g, 0.269 mol) and this mixture was allowed to stir at room temp. for 48 h. An equal amount of hexane was added and the CH₂Cl₂ was distilled off at normal pressure to induce precipitation of Ph₃PO. The resulting slurry was filtered, the filter cake washed with sufficient hexane and the filtrate was concentrated and filtered again. The final filtrate was evaporated to dryness and purified by distillation (Kugelrohr), yielding **22** as a colourless oil (31.51 g, 93% GC purity, 0.206 mol, 77% over two steps). B.p. 130 °C oven temperature, 50 mbar. [α]_D²³ = +33.9 (c = 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 6.84 (dd, J = 15.8, 7.8 Hz, 1 H, 3-H), 5.76 (dd, J = 15.8, 1.2 Hz, 1 H, 2-H), 3.70 (s, 3 H, OCH₃), 2.19 (m, 1 H, 4-H), 1.37 (m, 2 H, 5-H), 1.01 (d, J = 6.7 Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.85 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, 6-H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 167.2 (1-C), 154.7 (3-C), 119.3 (2-C), 51.3 (OCH₃), 38.1 (4-C), 28.7 (5-C), 18.8 (4-CH₃), 11.5 (6-C) ppm. FT-IR (ATR): ν̄ = 2963 (w), 2877 (w), 1723 (s), 1656

(m), 1458 (w), 1435 (m), 1380 (w), 1352 (w), 1313 (m), 1271 (m), 1242 (m), 1193 (s), 1179 (s), 1157 (s), 1136 (m), 1085 (w), 1037 (m), 985 (m), 929 (w), 907 (w), 863 (w), 781 (w), 724 (w), 711 (w) cm^{-1} . GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 142 (32) $[\text{M}]^+$, 127 (50), 111 (61), 87 (47), 82 (61), 55 (100).

(S,Z)-2-Bromo-4-methylhex-2-enoic acid methyl ester (23): To a solution of **22** (31.51 g, 93% GC purity, 0.206 mol) in CH_2Cl_2 (100 mL), cooled at 0 °C, was slowly added bromine (15.83 mL, 0.309 mol) and the reaction mixture was stirred overnight. All the volatiles were carefully distilled off. The remainder was again dissolved in CH_2Cl_2 (300 mL), NEt_3 (139 mL, 1.00 mol) was added and the reaction mixture was stirred overnight. The resulting slurry was evaporated to dryness and partitioned between H_2O (250 mL) and hexane (300 mL). The aqueous layer was extracted with hexane (3 \times 100 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The remainder was purified by distillation, using a 15 cm Vigreux column, yielding **23** as colourless oil (36.06 g, 0.163 mol, 79%). B.p. 86–88 °C (10 mbar). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +18.2$ ($c = 3.6$, toluene). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 7.04$ (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, 3-H), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 2.64 (m, 1 H, 4-H) 1.44–1.35 (m, 2 H, 5-H) 1.01 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 4-CH₃) 0.86 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, 6-H) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 163.0$ (1-C), 151.5 (3-C), 114.5 (2-C), 53.1 (OCH₃), 38.4 (4-C), 28.7 (5-C), 18.3 (4-CH₃), 11.6 (6-C) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2963$ (w), 2930 (w), 2875 (w), 1732 (s), 1719 (s), 1622 (w), 1435 (m), 1256 (s), 1233 (s), 1034 (m) 751 (s), 743 (s) cm^{-1} . GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 220, 221 (41) $[\text{M}]^+$, 193 (21), 191 (35) 167 (45), 165 (48), 161 (29), 159 (28), 133 (26), 109 (53), 81 (56), 56 (100).

(S,E)-2-Allyl-4-methylhex-2-enoic acid methyl ester (24): A Schlenk flask (250 mL) with reflux condenser was charged with benzene (50 mL), DMF (50 mL), allyltributylstannane (14.9 mL, 48.1 mmol), compound **23** (7.075 g, 32.00 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (910 mg, 0.787 mmol). This solution was stirred overnight at 85 °C until GC control had shown complete consumption of the starting material. The reaction mixture was partitioned between water (300 mL) and *n*-hexane (300 mL). The aqueous layer was extracted with *n*-hexane (3 \times 150 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, concentrated and subjected to distillation using a 15 cm Vigreux column, yielding **24** as colourless oil (5.132 g, 28.16 mmol, 88%). B.p. 110–112 °C (10 mbar). **Note:** Since the still pot tended to remarkable foaming, the Vigreux column had to be heated constantly using a heat gun. All the non-volatile tin compounds remained in the still as a black tar. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +17.1$ ($c = 1.0$, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 6.60$ (d, $J = 10.4$ Hz, 1 H, 3-H), 5.81 (m, 1 H, 2'-H), 5.05–4.93 (m, 2 H, 3'-H), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 3.06 (m, 2 H, 1'-H), 2.40 (m, 1 H, 4-H), 1.45–1.23 (m, 2 H, 5-H), 0.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 6-H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 168.2$ (1-C), 149.6 (3-C), 135.9 (2'-C), 128.4 (2-C), 115.0 (3'-C), 51.6 (OCH₃), 34.8 (4-C), 30.9 (1'-C), 29.6 (5-C), 19.8 (4-CH₃), 11.9 (6-C) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2961$ (w), 2926 (w), 2874 (w), 1714 (vs), 1638 (w), 1457 (w), 1435 (m), 1278 (s), 1209 (s), 1152 (s), 910 (m), 761 (m) cm^{-1} . GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 182 (57) $[\text{M}]^+$, 167 (27), 153 (22), 150 (29), 135 (58), 127 (33), 107 (48), 93 (100), 81 (47), 79 (51), 77 (43), 67 (44), 59 (31), 55 (33).

(S,E)-2-Allyl-4-methylhex-2-en-1-ol (25): A stirred solution of ester **24** (4.027 g, 22.09 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was cooled to –78 °C and DIBAL-H (1 M in toluene, 50.0 mL, 50.0 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was allowed to reach room temp. overnight and was carefully quenched by addition of water, after the progress had been checked by TLC. The reaction mixture was partitioned between aqueous Rochelle salt solution (200 mL) and CH_2Cl_2 (200 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times 100 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄. Evaporation of the solvent furnished the crude alcohol **25** (3.707 g) which was sufficiently pure for the next step. An analytical sample of **25** was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/MTBE 5:1; $R_f = 0.3$). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +27.7$ ($c = 1.0$, MTBE). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 5.77$ (m, 1 H, 2'-H), 5.25 (d, $J = 9.8$ Hz, 1 H, 3-H), 5.10–4.95 (m, 2 H, 3'-H), 4.04 (d, $J = 1.1$ Hz, 2 H, 1-H), 2.85 (m, 2 H, 1'-H), 2.30 (m, 1 H, 4-H), 1.40–1.17 (m, 2 H, 5-H), 0.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 6-H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 136.4$ (2'-C), 135.1 (2-C), 134.3 (3-C), 115.4 (3'-C), 67.0 (1-C), 33.6 (4-C), 32.6 (1'-C), 30.1 (5-C), 20.7 (4-CH₃), 11.9 (6-C) ppm. GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 154 (5) $[\text{M}]^+$, 136 (3), 125 (12), 123 (10), 121 (14), 113 (10), 107 (28), 97 (20), 95 (45), 79 (45), 73 (72), 69 (60), 67 (45), 55 (100). HRMS (ESI): calcd. for $[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O} + \text{Na}]^+$: 177.1250; found: 177.1251.

[(S,E)-2-Allyl-4-methylhex-2-enyloxy]-tert-butylidimethylsilane (26): The crude alcohol **25** (3.707 g, 24.07 mmol) together with imidazole (3.744 g, 55.00 mmol) and 4-DMAP (134 mg, 5 mol-%) was dissolved in CH_2Cl_2 (80 mL). *tert*-Butylidimethylsilyl chloride (3 M in THF, 8.3 mL, 25 mmol) was added dropwise over a period of 5 min. After 3 h of stirring and positive TLC-control the reaction mixture was partitioned between water (200 mL) and CH_2Cl_2 (200 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times 100 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄. Evaporation of the solvent furnished the crude silyl ether **26** (5.743 g) which was sufficiently pure for the next step. An analytical sample of **26** was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/ CH_2Cl_2 98:2; $R_f = 0.3$). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +19.4$ ($c = 1.0$, MTBE). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 5.76$ (m, 1 H, 2'-H), 5.24 (d, $J = 9.9$ Hz, 1 H, 3-H), 5.07–4.93 (m, 2 H, 3'-H), 4.03 (d, $J = 1.0$ Hz, 2 H, 1-H), 2.79 (m,

2 H, 1'-H), 2.31 (m, 1 H, 4-H), 1.36–1.19 (m, 2 H, 5-H), 0.94 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.91 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 6-H), 0.06 (s, 6 H, Si(CH₃)₂) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 136.5$ (2'-C), 134.6 (2-C), 132.4 (3-C), 115.0 (3'-C), 66.5 (1-C), 33.5 (4-C), 32.4 (1'-C), 30.3 (5-C), 26.0 (C(CH₃)₃), 20.8 (4-CH₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 12.0 (6-C), –5.2 (Si(CH₃)₂) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2959$ (m), 2929 (m), 2856 (m), 1637 (w), 1462 (w), 1361 (w), 1252 (m), 1068 (m), 834 (vs), 773 (s) cm^{-1} . GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 227 (4) $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_7]^+$, 211 $[\text{M} - t\text{-Bu}]^+$, 193 (8), 169 (4), 141 (29), 135 (12), 127 (5), 115 (6), 75 (100), 73 (30). HRMS (ESI): calcd. for $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{OSi} + \text{Na}]^+$: 291.2115; found: 291.2116.

(S,E)-4-[(tert-Butyldimethylsilyloxy)-methyl]-6-methyl-oct-4-en-1-ol (27): The crude silyl ether **26** (5.743 g, 21.4 mmol) was dissolved in THF (20 mL) and 9-BBN (0.5 M in THF, 50.0 mL, 25 mmol) was added at 0 °C over a period of 30 min via syringe pump. The solution was allowed to reach room temp. overnight. To the reaction mixture an aqueous solution of NaOH (3 M in THF, 53 mL, 159 mmol) was added, followed by careful addition of H₂O₂ (30%, 18.1 mL) under ice cooling. After 3 h of stirring the reaction mixture was partitioned between water (200 mL) and MTBE (200 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (2 \times 100 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄. Evaporation of the solvent furnished the crude alcohol **27** (9.07 g) which was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/MTBE 3:1; $R_f = 0.4$) yielding **27** as a colourless oil (4.992 g, 17.42 mmol, 79% over three steps). **Note:** A short flash column (6 cm diameter, 13 cm filling level) was used. The product was found in the fractions 5–10 (50 mL fraction size). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +18.7$ ($c = 1.0$, MTBE). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 5.16$ (d, $J = 10.1$ Hz, 1 H, 5-H), 4.06 (d, $J = 1.5$ Hz, 2 H, SiOCH₂), 3.63 (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H, 1-H), 2.29 (m, 1 H, 6-H), 2.13 (m, 2 H, 3-H), 1.80 (broad, OH), 1.67 (m, 2 H, 2-H), 1.40–1.13 (m, 2 H, 7-H), 0.92 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, 6-CH₃), 0.90 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 8-H), 0.06 (s, 6 H, Si(CH₃)₂) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 136.3$ (4-C), 132.7 (5-C), 67.6 (SiOCH₂), 62.8 (1-C), 33.5 (6-C), 31.8 (2-C), 30.3 (7-C), 25.9 (C(CH₃)₃), 24.4 (3-C), 20.8 (6-CH₃), 11.9 (8-C), –5.3 (Si(CH₃)₂) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3347$ (broad), 2956 (w), 2928 (w), 2857 (w), 1461 (w), 1361 (w), 1253 (m), 1066 (m), 833 (vs), 773 (s) cm^{-1} GC-MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 229 (29) $[\text{M} - t\text{-Bu}]^+$, 199 (4), 185 (5), 173 (5), 159 (6), 145 (20), 137 (12), 119 (10), 109 (9), 97 (12), 95 (67), 81 (46), 75 (100), 73 (37). HRMS (ESI): calcd. for $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Si} + \text{Na}]^+$: 309.2220; found: 309.2221.

[(S,E)-2-(3-Azidopropyl)-4-methylhex-2-enyloxy]-tert-butylidimethylsilane (28): Alcohol **27** (1.180 g, 4.12 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL) and NEt_3 (0.85 mL, 6.1 mmol) together with a catalytic amount of DMAP. To this solution was dropped mesyl chloride (0.35 mL, 4.5 mmol) at 0 °C. After stirring for 1 h, most of the solvent was evaporated and the residue was partitioned between water (80 mL) and MTBE (80 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (2 \times 80 mL). The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure, leaving the crude mesylate which was directly taken up in DMSO. To this solution was added NaN₃ (325 mg, 5.00 mmol) and a catalytic amount of NaBr. This solution was stirred at 60 °C oil bath temperature for about 2 h until TLC control indicated complete consumption of the mesylate (showed the same R_f value as the alcohol **27**). The reaction mixture was partitioned between water (80 mL) and MTBE (80 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (2 \times 80 mL). The combined organic extracts were washed with brine and passed through a plug of silica/MgSO₄. Evaporation of the solvent furnished the crude azide **28** (1.173 g) which was sufficiently pure for the next step. An analytical sample of **28** was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/EtOAc 95:5). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16.7$ ($c = 1.0$, MTBE). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 5.18$ (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, 3'-H), 4.04 (d, $J = 1.2$ Hz, 2 H, 1'-H), 3.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H, 3''-H), 2.27 (m, 1 H, 4'-H), 2.12 (m, 2 H, 1''-H), 1.69 (m, 2 H, 2''-H), 1.41–1.14 (m, 2 H, 5''-H), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, 4''-CH₃) 0.90 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 6''-H), 0.06 (s, 6 H, Si(CH₃)₂) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 135.6$ (2'-C), 133.0 (3'-C), 67.2 (1'-C), 51.4 (3''-C), 33.5 (4'-C), 30.3 (5''-C), 27.9 (2''-C), 25.9 (C(CH₃)₃), 25.2 (1''-C), 20.9 (4''-CH₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 11.9 (6''-C), –5.3 (Si(CH₃)₂) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2956$ (w), 2929 (w), 2857 (w), 2093 (m), 1462 (w), 1253 (m), 1068 (m), 834 (s), 774 (s) cm^{-1} . HRMS (ESI): calcd. for $[\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{OSi} + \text{Na}]^+$: 334.2285; found: 334.2290.

(S,E)-2-(3-Azidopropyl)-4-methylhex-2-en-1-ol (6): The crude compound **28** (1.173 g) obtained above was dissolved in a 1:1 mixture of MeCN and DMF (15 mL each) and hydrofluoric acid (40%, 2.5 mL) was added via syringe. This reaction mixture was stirred for 2.5 h and quenched carefully with NaHCO₃. Under vigorous stirring, MTBE (100 mL) and water (70 mL) were added and the layers separated. The aqueous layer was extracted with MTBE (2 \times 100 mL) and the combined organic layers were washed with brine. The combined organic extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/MTBE 3:1; $R_f = 0.4$), yielding **6** as a colourless oil (628 mg, 3.18 mmol, 77% over two steps). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +24.4$ ($c = 1$, CHCl_3). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 5.17$ (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, 3-H), 3.97 (s, 1 H, 1-H), 3.24 (t, $J = 6.8$ Hz, 2 H, 3'-H), 2.24 (m, 1 H, 4-H), 2.13 (m, 2 H, 1'-H), 1.65 (m, 2 H, 2'-H), 1.38–1.25 (m, 1 H, 5-H), 1.25–1.13 (m, 1 H, 5-H), 0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 4-CH₃), 0.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 6-H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 136.0$ (2-C), 134.4 (3-C), 66.8 (1-C), 51.1 (3'-C), 33.5 (4-C), 30.1 (5-C), 27.7 (2'-C), 25.1 (1'-C), 20.7 (4-CH₃), 11.8 (6-C) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3333$ (broad), 2958 (m), 2926 (w), 2872 (w), 2092 (vs), 1455 (m), 1370 (w), 1346 (w), 1255 (m), 1015 (m), 875

(w) cm⁻¹. MS (CI): *m/z* (%) = 215 (40) [M + NH₄]⁺, 198 (5) [M + H]⁺, 170 (28), 152 (100). C₁₀H₁₉N₃O (197.28); calcd. C 60.88, H 9.71, N 21.30; found C 60.89, H 9.71, N 21.29.

(*S,R,E,Z*)-2-(3-Azidopropyl)-4-methylhex-2-en-1-ol (6) from (*S,R,E,Z*)-18: To a solution of (*S,R,E,Z*)-18 (258 mg, 1.10 mmol) in DMSO (3 mL) was added NaN₃ (78 mg, 1.20 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temp. for about 3 h until TLC showed a complete consumption of the starting material. The reaction mixture was partitioned between water (20 mL) and MTBE (40 mL). The aqueous layer was extracted with MTBE (2 × 30 mL). The combined organic extracts were washed with brine, passed through a plug of silica/MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified in an identical way as described above leaving the azide (*S,R,E,Z*)-6 (206 mg, 1.04 mmol, 95%).

{(2*S*,3*S*)-2-(3-Azidopropyl)-3-[(*S*)-*sec*-butyl]-oxiran-2-yl]-methanol (5): Ti(O*i*Pr)₄ (300 μL, 1.01 mmol) was added to a suspension of 4 Å molecular sieves (0.5 g) in CH₂Cl₂ (30 mL). To this mixture was added at -30 °C L-(+)-diethyl tartrate (192 μL, 1.12 mmol) and *t*-BuOOH (5.5 M in decane, 1 mL, 5.5 mmol). After stirring for 30 min at this temp., the reaction mixture was cooled to -78 °C and substrate 6 (669 mg, 3.39 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) was added. The reaction mixture was left overnight and allowed to reach room temp. slowly. Aqueous tartaric acid (10%, 30 mL) was added and the mixture was stirred vigorously for 5 min. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 30 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel; *n*-hexane/acetone 5:1; R_f = 0.3), yielding 5 as colourless oil (683 mg, 3.20 mmol, 94%). [α]_D²³ = -15.6 (*c* = 1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 3.70 (dd, *J* = 12.3, 4.9 Hz, 1 H, 1-H_a), 3.56 (dd, *J* = 12.3, 7.8 Hz, 1 H, 1-H_b), 3.31 (m, 2 H, 3'-H), 2.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, 3'-H), 2.17 (dd, *J* = 7.8 Hz, 4.9 Hz, 1 H, OH), 1.68 (m, 2 H, 2'-H), 1.64 (m, 2 H, 1'-H), 1.57 (m, 1 H, 2''-H_a), 1.33 (m, 1 H, 1''-H), 1.31 (m, 1 H, 2''-H_b), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3 H, 3''-H), 0.91 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 1''-CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 65.6 (3'-C), 63.9 (1-C) 62.4 (2'-C) 51.4 (3''-C), 33.6 (1''-C), 27.7 (2''-C), 25.5 (1'-C), 24.7 (2'-C), 15.7 (1''-CH₃), 11.1 (3''-C) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3438 (broad), 2962 (m), 2930 (m), 2876 (w), 2093 (vs), 1455 (m), 1259 (m), 1043 (m) 903 (w) cm⁻¹. HRMS (ESI): calcd. for [C₁₀H₁₉N₃O₂ + Na]⁺: 236.1369; found: 236.1375.

{(2*S*,3*S*,*R*)-2-(3-Azidopropyl)-3-[(*S*,*R*)-*sec*-butyl]-oxiran-2-yl]-methanol (5) from (*S,R,E,Z*)-6 : To a solution of (*S,R,E,Z*)-6 (206 mg, 1.04 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added mCPBA (362 mg, 2.10 mmol) and the resulting solution was allowed to stir for 3 h. The reaction mixture was taken up in MTBE (30 mL) and thoroughly washed with half-concentrated aqueous K₂CO₃ (3 × 20 mL). The organic layer was passed through a plug of silica/MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified in an identical way as described above leaving the epoxy alcohol 5 (157 mg, 0.736 mmol, 71%).

(2*R*,3*S*)-2-(3-Azidopropyl)-3-[(*S*)-*sec*-butyl]-oxirane-2-carbaldehyde (4): To a solution of 5 (483 mg, 2.26 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL) was added Dess–Martin periodinane (8.3 mL, 0.3 M in CH₂Cl₂) and the reaction mixture was stirred for about 45 min until TLC showed complete consumption of the starting material. The reaction mixture was then diluted with *n*-hexane (30 mL), concentrated to a volume of 5 mL and passed through a small plug of silica gel. The silica plug was washed with a small amount of solvent (*n*-hexane/MTBE 98:2). After evaporation of the solvent, compound 4 (396 mg, 1.87 mmol, 83%) was obtained as colourless oil, which needed no purification. [α]_D²³ = +125.7 (*c* = 1, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 8.78 (d, *J* = 1.2 Hz, 1 H, CHO), 3.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H, 3'-H), 2.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, 3-H), 1.71 (m, 2 H, 2'-H), 1.69 (m, 2 H, 1'-H), 1.64 (1 H, m, 2''-H_a), 1.45 (m, 1 H, 1''-H), 1.34 (m, 1 H, 2''-H_b), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H, 3''-H), 0.89 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H, 1''-CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 199.8 (CHO), 64.9 (3-C), 64.3 (2-C), 51.1 (3'-C) 34.2 (1''-C), 28.1 (2''-C), 24.5 (2'-C), 21.4 (1'-C), 15.4 (1''-CH₃) 11.1 (3''-C) ppm. FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2965 (m), 2934 (w), 2877 (w), 2094 (vs), 1725 (s), 1460 (m), 1260 (m), 858 (m) cm⁻¹. GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 154 (26) [M - C₄H₉]⁺, 126 (15), 112 (14), 99 (21), 98 (41), 97 (35), 86 (35), 70 (76), 69 (100), 68 (54), 57 (56), 56 (85), 55 (94). HRMS (ESI): calcd. for [C₁₀H₁₇N₃O₂ + Na]⁺: 234.1213; found: 234.1221; calcd. for [C₁₀H₁₇N₃O₂ - H]⁺: 210.1248; found: 210.1248.

Cicindeloine, (2*S*,3*S*)-2-[(*S*)-*sec*-butyl]-1-oxa-5-aza-spiro[2.5]oct-4-ene (3): To a solution of 4 (396 mg, 1.87 mmol) in THF (25 mL) was added PPh₃ (2.50 g, 9.53 mmol) and the reaction mixture was stirred for about 16 h until GC analysis showed complete consumption of the starting material. The solvent was evaporated and the residue was partitioned between aqueous HCl (2%, 80 mL) and CHCl₃ (80 mL). The aqueous layer was washed two times with CHCl₃ (40 mL each) and once again with Et₂O (40 mL), basified with K₂CO₃, and subsequently extracted with Et₂O (3 × 50 mL). The combined organic extracts were washed with water, dried over Na₂SO₄ and evaporated to furnish the title compound 3 (241 mg, 1.44 mmol, 77%) as a colourless oil. [α]_D²³ = -3.2 (*c* = 1, Et₂O). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 7.11 (pst, *J* = 2.4 Hz, 1 H, 4-H), 3.80–3.69 (m, 1 H, 6-H_a), 3.59–3.48 (m, 1 H, 6-H_b), 2.71 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H, 2-H), 1.84 (m, 2 H, 8-H), 1.81 (m, 2 H, 7-H), 1.63 (m, 1 H, 2'-H_a), 1.38 (m, 1 H, 2'-H_b), 1.30 (m, 1 H, 1'-H), 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3 H, 3'-H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H,

1'-CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 164.8 (C-4), 67.1 (C-2), 55.1 (C-3), 49.6 (C-6), 34.1 (C-1'), 27.9 (C-2'), 23.6 (C-8), 21.4 (C-7), 15.5 (1'-CH₃), 11.2 (C-3') ppm. GC-MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 167 (7) [M]⁺, 151 (8), 138 (5), 136 (7), 122 (12), 98 (40), 97 (89), 69 (100), 55 (55), 42 (62). HRMS (ESI): calcd. for [C₁₀H₁₇NO + Na]⁺: 190.1202; found: 190.1203.

(2*S*,3*S*,*R*)-2-[(*S*,*R*)-*sec*-butyl]-1-oxa-5-aza-spiro[2.5]oct-4-ene (3) from epoxy alcohol 5: To a solution of 5 (157 mg, 0.736 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL) was added PCC (800 mg, 3.71 mmol) and the solution was allowed to stir overnight. The reaction mixture was passed through a Florisil® column (2 cm diameter, 6 cm filling level) and evaporated to dryness, leaving the crude aldehyde 4 which was directly taken up in THF (15 mL) and converted to the title compound 3 in the same manner as described above. Yield: 42 mg, 0.25 mmol, 34% over two steps.

Acknowledgements

Support of this research by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SE 595/14-1, DE 258/12-1) is gratefully acknowledged. We are also indebted to Dr. Holm Frauendorf and Michael Müller (Institut für Organische und Bioorganische Chemie, Georg-August-Universität Göttingen) for HRMS measurements. Finally, we like to thank Dr. Siegfried Kehl and Andreas Schierling (Tierökologie II, Universität Bayreuth) for taking pictures of *S. cicindeloides*.

- [1] G. Billard, C. Bruyant, *C. R. Acad. Sci. Soc. Biol.* **1905**, 59, 102–103.
- [2] V. Puthz, *Linzer biol. Beitr.* **2008**, 40, 137–230.
- [3] a) J. Bush, D. Hu, *Annu. Rev. Fluid Mech.* **2006**, 38, 339–369; b) H. Schildknecht, D. Krauß, J. Connert, H. Essenbreis, N. Orfanides, *Angew. Chem.* **1975**, 87, 421–422; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, 14, 427.
- [4] a) H. Müller, *Prax. Naturwiss. Biolog.* **1976**, 25, 132–133; b) K. E. Linsemair, R. Jander, *Naturwissenschaften* **1963**, 50, 231; c) K.E. Linsemair, *Kosmos* **1963**, 59, 331–334.
- [5] I. Lusebrink, D. Burkhardt, T. Gedig, K. Dettner, A. Mosandl, K. Seifert, *Naturwissenschaften* **2007**, 94, 143–147.
- [6] I. Lusebrink, K. Dettner, K. Seifert, *Naturwissenschaften* **2008**, 95, 751–755.
- [7] I. Lusebrink, K. Dettner, A. Schierling, T. Müller, C. Daolio, B. Schneider, J. Schmidt, K. Seifert, *Z. Naturforsch. C* **2009**, 64, 271–278.
- [8] a) P. H. Lambert, M. Vaultier, R. Carrié, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1224–1225; b) D. R. Williams, D. L. Brown, J. W. Benbow, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1923–1925.
- [9] Review: F. Palacios, C. Alonso, D. Aparicio, G. Rubiales, J. M. de los Santos, *Tetrahedron* **2007**, 63, 523–575.
- [10] a) T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5974–5976; b) I. Larrosa, M. I. Da Silva, P. M. Gmez, P. Hannen, E. Ko, S. R. Lenger, S. R. Linke, A. J. P. White, D. Wilton, A. G. M. Barrett, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14042–14043.
- [11] S.-K. Kang, W.-S. Kim, B.-H. Moon, *Synthesis* **1985**, 1161–1162.
- [12] C. Bürgi, G. Liu, P. Rüedi, *Helv. Chim. Acta.* **1993**, 76, 1901–1915.
- [13] R. Yefidoff, A. Albeck, *Tetrahedron* **2004**, 60, 8093–8102.
- [14] P. E. Sonnet, *Synth. Comm.* **1976**, 6, 21–26.
- [15] S. Gemma, E. Gabellieri, S. S. Coccone, F. Martí, O. Tagliatela-Scafati, E. Novellino, G. Campiani, S. Butini, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2333–2340.
- [16] S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, *Synthesis* **1997**, 413–414.
- [17] P. G. Reddy, B. Varghese, S. Baskaran, *Org. Lett.* **2003**, 5, 583–585.
- [18] S. R. V. Kandula, P. Kumar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3268–3274.
- [19] B. M. Trost, G. D. Probst, A. Schoop, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9228–9236.
- [20] G. J. Gordon, PhD thesis, University of Bayreuth, **2004**.
- [21] H. Akao, H. Kiyota, T. Nakajima, T. Kitahara, *Tetrahedron* **1999**, 55, 7757–7770.
- [22] a) P. L. Anelli, F. Montanari, S. Quici, *Org. Synth.* **1990**, 69, 212–219; b) L. Pouységu, M. Marguerit, J. Gagnepain, G. Lyvenc, A. J. Eatherton, S. Quideau, *Org. Lett.* **2008**, 10, 5211–5214.
- [23] J. K. Stille, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 508–524.

- [24] M. Tokumasu, H. Ando, Y. Hiraga, S. Kojima, K. Ohkata, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 489–496.
- [25] a) R. F. Newton, D. P. Reynolds, M. A. W. Finch, D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3981–3982; b) F. Hettche, P. Reiß, R. W. Hoffmann, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4946–4956.
- [26] a) D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155–4156; b) S. M. Ceccarelli, U. Piarulli, C. Gennari, *Tetrahedron* **2001**, 57, 8531–8542.
-

Received: ((will be filled in by the editorial staff))
Revised: ((will be filled in by the editorial staff))
Published online: ((will be filled in by the editorial staff))

Indole Alkaloids from the Sea Anemone *Heteractis aurora* and Homarine from *Octopus cyanea*

by **Kamel H. Shaker, Tobias Müller, and Karlheinz Seifert**^{*)}

Lehrstuhl für Organische Chemie, NW II, Universität Bayreuth, D-95440 Bayreuth (phone: 49-921-553396; fax: 49-921-555358; e-mail: karlheinz.seifert@uni-bayreuth.de)

Two new indole alkaloids 2-amino-1,5-dihydro-5-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-4*H*-imidazol-4-one (1), 2-amino-5-[(6-bromo-1*H*-indol-3-yl)methyl]-3,5-dihydro-3-methyl-4*H*-imidazol-4-one (2), and auramine (3) have been isolated from the sea anemone *Heteractis aurora*. Homarine (4) along with uracil (5), hypoxanthine (6), and inosine (7) have been obtained from *Octopus cyanea*.

Introduction. – Sea anemones are ocean dwelling, solitary members of the phylum Cnidaria and the class Anthozoa invertebrates. The phylum Cnidaria includes anemones, corals, jellyfish, and hydras. Sea anemones have a basic radial symmetry with tentacles surrounding a central mouth opening. The tentacles are used to catch food and transfer it to their mouth. At the tentacles and other parts of the sea anemone are stinging capsules (nematocysts) containing small threads that are forcefully ejected along with the venom when stimulated mechanically or chemically. Sea anemones use nematocysts for capturing prey, as well as for defence purposes against predators [1] and in interspecies aggression [2]. The venom of sea anemones contains a variety of active compounds like toxins affecting voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels, acid-sensing ion channels, pore-forming toxins (actinoporins), and protease inhibitors. The use of toxins affecting voltage-gated ion channels seems logical since these targets are an important component of the action potential in the signal transduction process of vertebrates and invertebrates. Actinoporins are highly toxic to fish and crustaceans which may be the natural prey of sea anemones [1].

The octopuses are cephalopods of the order Octopoda which are characterized by their eight arms usually bearing suction cups. Octopuses are highly intelligent animals whose behaviour is easily modified by experience. They live in many diverse regions of the ocean, especially in holes in rocky areas from the intertidal area to at least 45 m. *Octopus cyanea* occurs in the Indo-Pacific [3]. Octopuses use different toxins for prey acquisition as well as in defence. Cephalotoxins from posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* have a strong paralysing

effect on crabs [4]. Tetrodotoxin appears to be actively applied by the blue-ringed octopus *Hapalochlaena* spp. for acquisition of prey. Tetrodotoxin, the major neurotoxin involved in envenoming, is secreted by the two posterior salivary glands and inoculated during the bite. However, it was detected predominantly in the arms representing about 45% of the body mass by weight, followed by the abdomen, where the posterior salivary glands are located, and the cephalothorax [5].

In this paper the structure elucidation of two new indole alkaloids **1** and **2** together with auramine (**3**), a new naturally compound from the sea anemone *Heteractis aurora* is described. Homarine (**4**), uracil (**5**), hypoxanthine (**6**), and inosine (**7**) have been isolated from *Octopus cyanea*.

Results and Discussion. – The fresh yellow sea anemones of *Heteractis aurora* and one frozen octopus of *Octopus cyanea* were cut, homogenized, and exhaustively extracted with EtOH. Both EtOH extracts were concentrated to dryness. The extract of *Heteractis aurora* was submitted to column chromatography with silica gel to afford three main fractions. The second fraction was chromatographed on a further silical gel column followed by PTLC to yield the compounds **1–3**.

The EtOH extract of *Octopus cyanea* was successively partitioned between H₂O and *n*-hexane, AcOEt, and *n*-butanol. The butanol extract was separated on a silica gel column followed by PTLC to give homarine (**4**), uracil (**5**), inosine (**6**), and hypoxanthine (**7**).

Compound **1** was found to possess the molecular formula C₁₂H₁₂N₄O by HR-ESI-MS (*m/z* 229.1083 [*M* + H]⁺). The ¹H- and ¹³C-NMR data for **1** (*Table 1* in *Exper. Part*) showed the signals of five aromatic protons (δ (H) 6.96, 7.05, 7.14, 7.32 and 7.53), five quaternary carbons (δ (C) 110.1, 127.4, 136.0, 171.9, 188.9), one methine (δ (C) 60.8), and one methylene group (δ (C) 27.4). Comparison of the ¹H- and ¹³C-NMR data of **1** with those reported for (1*H*-indol-3-yl)-oxoacetic acid methyl ester [6] and 2-amino-5-(3-aminopropyl)-1*H*-imidazolin-4-

one [7] led to a 3-substituted indole and a 5-substituted 2-amino-1*H*-imidazolin-4-one of **1**. The HMBC correlations H-C(1')/C(3') and H-C(1')/C(5') confirm the ¹³C assignments of the imidazolinone ring. The HMBC interactions H-C(1')/C(8), H-C(1')/C(3), CH₂(8) (δ (H) 3.11, 2.78)/C-3a, CH₂(8)/C(2), CH₂(8)/C(3), and CH₂(8)/C(5') revealed the connection between the indole moiety in position 3 and imidazolinone ring in position 1' through methylene group 8. Therefore, compound **1** was identified as 2-amino-1,5-dihydro-5-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-4*H*-imidazol-4-one.

Compound **2** showed in the EI-MS two ions at *m/z* 320, 322 with relative intensities 100 : 98 suggesting the presence of one bromine atom. The molecular formula was established as C₁₃H₁₃BrN₄O by HR-ESI-MS (*m/z* 321.0347 [*M* + H]⁺ for ⁷⁹Br). The most remarkable differences in the ¹³C-NMR data of the indole ring of **2** in comparison with **1** were the upfield shift for the signals of C(6) ($\Delta\delta$ - 6.9), the downfield shifts for the signals of C(5) ($\Delta\delta$ + 3.0), and C-(7) ($\Delta\delta$ + 2.5) due to the presence of bromine at C-6. The ¹H - and ¹³C -NMR data of the 6-bromoindol-3-yl ring of **2** showed a good agreement with those reported for (6-bromo-1*H*-indol-3-yl)-oxoacetic acid methyl ester [6]. The ¹³C-NMR shifts of the signals C(3') (δ (C) 157.6) and Me-N(4') (δ (C) 25.7) of the imidazolinone ring of **2** were in good accordance with those reported for the imidazolinone ring of 6-bromo-2'-de-N-methylaplysinopsin C(3') (δ (C) 157.7) and Me-N(4') (δ (C) 25.6) [8]. The HMBC correlations Me-N(4')/C(3'), Me-N(4')/C(5') and H-C(1')/C(5'), H-C(1')/C(3') confirm the position of methyl group at 4'-position and the ¹³C assignment of the imidazolinone ring. The connection between the indol-3-yl and imidazolinon-5-yl moieties through the methylene group 8 of **2** was proved by the HMBC correlations of CH₂(8) (δ (H) 3.08/3.22)/C(5'), CH₂(8)/C(2), CH₂(8)/C(3), CH₂(8)/C(3a) and H-C(1')/C(3). Compound **2** was identified as 2-amino-5-[(6-bromo-1*H*-indol-3-yl)methyl]-3,5-dihydro-3-methyl-4*H*-imidazol-4-one (6-bromo-2'-de-N-methyl-1',8-dihydroaplysinopsin).

Aplysinopsin has been isolated before from the sponge *Aplysinopsis* sp. [9]. Aplysinopsin-type indole alkaloids have previously been obtained from the sponge *Dercitus* sp. [10], and the scleractinian coral *Dendrophyllia* sp. [8]. Aplysinopsin-type indol alkaloids from marine sponge *Hyrtios erecta* [11] showed a selective inhibitory activity against the neuronal isozyme of nitric oxide synthase (nNOS). Nitric oxide (NO) is an important second messenger and regulates many physiological processes, e. g. inflammation, regulation of blood pressure, platelet adhesion, and neurotransmission. An excessive production of NO causes different disease states such as post-ischemic stroke damage, schizophrenia, development of colitis, tissue damage and pathological inflammation. Therefore, a rational control of NO production is assumed to be an efficient approach to treat these diseases [11].

The molecular formula $C_{17}H_{21}N_3$ of compound **3** was determined by HR-EI-MS (m/z 267.1736 M^+) The 1H - and ^{13}C -NMR data of **3** were in good agreement with those reported for auramine [12], which is a yellow dye used in the manufacture of paints, textiles, and rubber products. Auramine together with rhodamine is used as fluorescent dye in the fluorescence microscopy to visualize acid-fast bacteria, like those of *Mycobacteria*. Compound **3** showed bacteriostatic activity against *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* [13]. To our knowledge this the first report on auramine as a natural product.

HR-ESI-MS (m/z 138.0549 [$M+H$] $^+$) of compound **4** led to a molecular formula of $C_7H_7NO_2$. Comparison of the 1H - and ^{13}C -NMR data of **4** with those of homarine [14] showed a full accord. Homarine is a fairly ubiquitous metabolite in marine invertebrates [15] and has been detected before in the mantle, arms, and liver of *Octopus ochellatus* [16] and urine of *Octopus vulgaris* [17]. It has been isolated also from a lot of other organisms like the echiura *Urechis unicintus* [18], the ascidian *Eusynstyela latericius* [19], and corals [14, 15]. Homarine (**4**) has been suggested to serve as an active constituent of the innate immune system in the octocoral *Leptogorgia virgulata*. It may act synergistically with cofactors in this coral to mount a

response to microbial invasion and disease [14]. Homarine from *Leptogorgia virgulata* inhibited significantly the growth of the fouling benthic marine diatom *Navicula salinicola* at naturally occurring concentrations [20]. The Antarctic soft coral *Gersemia antarctica* produces homarine, that is released into the surrounding water column as predator deterrent compound and antibacterial metabolite [15]. Perhaps homarine of *Octopus cyanea* protects its body against bacterial infection.

^1H - and ^{13}C -NMR data of compounds **5-7** were identical with those of authentic samples of uracil, hypoxanthine, and inosine. Hypoxanthine has also been found before as homarine in the urine of *Octopus vulgaris* [15b].

Synthesis and elucidation of the absolute configuration of compound (+)-1. We intended to determine the absolute configuration of (+)-**1** by comparison of the optical rotation with an authentic reference. Thus, compound (*S*)-**1** was prepared using a simple two step sequence based on a literature-known procedure [21] which is outlined in *Scheme 1*. Cbz-protected L-Tryptophan (**8**) was treated with N-hydroxysuccinimid and DCC (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide) to form an activated NHS-ester which was then introduced in an aqueous sodium cyanamide solution, furnishing the protected tautomeric iminohydantoine (**9**). Deprotection of **9** under hydrogenolytic conditions gave the desired compound (*S*)-**1** which was spectroscopically identical to the natural product (+)-**1** in all respects. The $[\alpha]_D^{23}$ value of the synthetic compound (*S*)-**1** was determined as -6.1 , which is opposite in sign to the rotation of the natural compound with $[\alpha]_D^{23} = +6.2$. This clearly indicates that the stereogenic center of (+)-**1** is (*R*) configured.

We thank Dipl.-Chem. *Michael Müller* and Dr. *Holm Frauendorf*, *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen* for ESI/MS measurements.

Experimental Part

General. Column chromatography (CC): silica gel *Si 60 M* (40-63 μm , *Macherey-Nagel*). TLC: silica gel *60 F₂₅₄* precoated plates (*Merck*); detection with 10% molybdophosphoric acid in EtOH. PTLC: silica gel *60 PF₂₅₄* precoated plates (*Merck*). Optical rotations: *Jasco P-1020* polarimeter. ^1H - and ^{13}C -NMR: *Bruker Avance-300* spectrometer, at 300 MHz and 75 MHz, resp., in DMSO- D_6 or CD_3OD , reverse probehead, solvent signals were used as internal standard (^1H : 2.50; ^{13}C : 39.5 for DMSO- D_6 , and ^1H : 3.31; ^{13}C : 49.0 for CD_3OD): δ in ppm, J in Hz. ESI-MS and HR-ESI-MS: *Bruker APEX IV*. EI-MS: *Finnigan MAT-8500*.

Animal Material. The sea anemones of *Heteractis aurora* and the octopus of *Octopus cyanea* were collected in December 2006, near Bali, Indonesia, at a depth of 3-15 meter, and were identified by *F. Pfeifer*, Bayreuth.

Extraction and Isolation. The fresh sea anemones of *Heteractis aurora* (300 g) were sliced, homogenized with EtOH, and exhaustively (4 x) extracted with EtOH. The solvent was removed under reduced pressure to yield the residue (14 g) which was submitted to CC (silica gel; *n*-hexane, *n*-hexane/AcOEt gradient, CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradient) to afford three fractions (*I-III*). *Fr. II* (2.0 g) was separated by CC (silica gel; CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradient 18:1, 18:3) followed by PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 18:3) to give compounds **1** (20 mg), **2** (22 mg), and **3** (30 mg).

The octopus of *Octopus cyanea* (320 g) were frozen, sliced, homogenized with EtOH, and directly extracted (4 x) with EtOH. The extract was evaporated to dryness and the residue (10 g) was successively partitioned between *n*-hexane/ H_2O , AcOEt/ H_2O and *n*-butanol/ H_2O . The *n*-butanol extract (0.8 g) was subjected to CC (silica gel; CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradient) to yield two fractions (*A*, *B*). *Fr. A* (60 mg) gave after purification with PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 21: 3.5:0.5) the compounds **5** (3 mg), **6** (2mg), **7** (15 mg), and *fr. B* (28 mg) compound **4** (15 mg).

(R)-2-Amino-1,5-dihydro-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-4H-imidazol-4-one ((+)-**1**). $[\alpha]_D^{23} = +6.2$ ($c = 1.00$, MeOH). ^1H - and ^{13}C -NMR: Table 1. IR (ATR): 3200 (broad), 1693, 1629, 1571, 1482, 1456, 1308, 1265, 1227, 1093, 1009, 741, 718. EI-MS: 228 (3, M^+), 130 (100), 98 (14). HR-ESI-MS: 229.1083 ($[M + H]^+$, $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}^+$, calc. 229.1084).

6-Bromo-2'-de-N-methyl-1',8-dihydroaplysinopsin (= 2-amino-5-[(6-bromo-1H-indol-3-yl)methyl]-3,5-dihydro-3-methyl-4H-imidazol-4-one; **2**). ^1H - and ^{13}C -NMR: Table 1. EI-MS: 322 (M^+ , 12.7), 320 (13.0, M^+), 208 (100). HR-ESI-MS: 321.0347 ($[M + H]^+$ for ^{79}Br , $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrN}_4\text{O}$, calc. 321.0346).

Auramine (= 4,4'-Carbonimidoylbis[*N,N*-dimethylbenzenamine]; **3**) ^{13}C -NMR (DMSO- D_6): 175.6 (C(5)), 154.7 (C(1)), 134.1 (C(3)), 116.7 (C(4)), 111.6 (C(2)), 39.8 ($\text{Me}_2\text{N-C}(1)$). HR-EI-MS: 267.1736 (M^+ , $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3$, calc. 267.1736).

Homarine (= 2-Carboxy-1-methyl-pyridinium inner salt; **4**). ^{13}C -NMR (CD_3OD): 165.3 (C(8)), 155.6 (C(2)), 147.1 (C(4)), 146.6 (C(6)), 127.7 (C(3)), 127.7 (C(5)), 47.6 (C(7)). HR-ESI-MS: 138.0549 ($[M + H]^+$, $\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_2$ calc. 138.0549).

Synthesis of compound (S)-(-)-**1**. (S)-2-Amino-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-4-oxo-4,5-dihydroimidazole-1-carboxylic acid benzyl ester (**9**). To a solution of **8** (2.000 g, 5.92 mmol) in THF (60 ml) was added DCC (1.236 g, 6.00 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (691 mg, 6.00 mmol). The solution was stirred for 3 h at 0 °C and filtered by suction filtration. The filtrate was added to a solution of monosodium cyanamide (1.236 g, 17.74 mmol) in H_2O (60 ml) at r.t. and stirred overnight. THF was removed under reduced pressure and the solution was basified to pH 12 with diluted NaOH and washed with CH_2Cl_2 (2 × 50 ml). The aqueous layer was acidified to pH 2.2 with diluted HCl and extracted with EtOAc (2 × 80 ml). The combined organic extracts were dried over MgSO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by CC (silica gel; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10) to afford pure **9** (1.330 g, 62%). Amorphous solid. R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10) 0.4. $[\alpha]_D^{23} = +45.62$ ($c = 1.00$, MeOH). IR (ATR): 3394, 1710, 1633, 1456, 1392, 1340, 1294, 1228, 1124, 1024, 745,

699. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-D_6): 10.85 (br., 1 H); 7.73 (br., 1 H); 7.55 (*m*, 2 H, *ortho*- C_6H_5); 7.44 (*m*, 3 H, *meta*- and *para*- C_6H_5); 7.27 (*d*, $J = 8.0$, 1 H, H-C(4)); 7.20 (*d*, $J = 8.0$, 1 H, H-C(7)); 7.00 (*ddd*, $J = 7.6$, $J = 7.6$, $J = 1.0$, 1 H, H-C(6)); 6.83 (*ddd*, $J = 7.6$, $J = 7.6$, $J = 1.0$, 1 H, H-C(5)); 6.75 (*d*, $J = 2.3$, 1 H, H-C(2)); 5.43 (*d*, $J = 12.2$, 1 H, *benzylic*- H_a); 5.32 (*d*, $J = 12.2$, 1 H, *benzylic*- H_b); 4.47 (*m*, 2 H, H-C(1')); 3.38 (*dd*, $J = 14.8$, $J = 5.5$, 1 H, $\text{CH}_2(8)_a$); 3.23 (*dd*, $J = 14.8$, $J = 2.3$, 1 H, $\text{CH}_2(8)_b$). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-D_6): 184.3 (C(5')); 167.5 (C(3')); 150.8 (OCON); 135.7 (C(7a)); 135.1 (*ipso*- C_6H_5); 128.6 (*ortho*-, *meta*-, and *para*- C_6H_5); 127.6 (C(3a)); 123.7 (C(2)); 120.7 (C(6)); 118.4 (C(4)); 118.1 (C(5)); 111.2 (C(7)); 106.9 (C(3)); 68.1 (*benzylic*- CH_2); 62.2 (C(1')); 24.8 (C(8)). HRMS (ESI): calcd. for $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3 + \text{Na}]^+$: 385.1271; found: 385.1267; calcd. for $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3 - \text{H}]^-$: 361.1306; found: 361.1299.

(S)-2-Amino-1,5-dihydro-5-(1*H*-indol-3-ylmethyl)-4*H*-imidazol-4-one ((*S*)-(-)-**1**). A mixture of **9** (1.000 g, 2.76 mmol) and Pd/C 10% (300 mg, 10 mol-%) in MeOH (55 ml) was hydrogenated under atmospheric pressure until TLC showed complete consumption of the starting material (1 h). The catalyst was removed by suction filtration and the filtrate evaporated to dryness. The resultant viscous oil was purified by prep. HPLC (MN Nucleodur[®] C-18, 100-12; MeCN/ H_2O (1% ammonia) gradient 10% to 30%, 45 min). Pure (*S*)-**1** (0.523 g, 83%) was obtained after lyophilization as a white fluffy powder, spectroscopically identical to the natural product. R_f RP-18 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 3:1, 1% ammonia) 0.3. $[\alpha]_D^{23} = -6.1$ ($c = 1.00$, MeOH). HRMS (ESI): calcd. for $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O} + \text{H}]^+$: 229.1084; found: 229.1085; calcd. for $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O} + \text{Na}]^+$: 251.0903; found: 251.0903; calcd. for $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O} - \text{H}]^-$: 227.0938; found: 227.0936.

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR Data of Compounds **1** and **2** in $\text{DMSO-}D_6$. δ in ppm, coupling constants J in Hz. Trivial numbering, see *Formulae*.

	1		2	
	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$	$\delta(\text{H})$
H-C(2)	123.3	7.14, <i>d</i> , 2.3	125.3	7.16, <i>d</i> , 2.1
C(3)	110.1		108.2	
C(3a)	127.4		126.3	
H-C(4)	118.5	7.53, <i>d</i> , 8.0	120.4	7.51, <i>d</i> , 8.5
H-C(5)	118.3	6.96, <i>ddd</i> , 8.0, 8.0, 1.1	121.3	7.09, <i>dd</i> , 8.5, 1.8
H-C(6) or C(6)	120.8	7.05, <i>ddd</i> , 8.0, 8.0, 1.1	113.9	
H-C(7)	111.2	7.32, <i>d</i> , 8.0	113.7	7.52, <i>d</i> , 1.8
C(7a)	136.0		136.8	
CH ₂ (8)	27.4	2.78, <i>dd</i> , 15.0, 7.2 3.11, <i>dd</i> , 15.0, 4.0	26.3	3.08, <i>dd</i> , 14.4, 6.7 3.22, <i>dd</i> , 14.4, 3.4
H-C(1')	60.8	4.00, <i>m</i>	59.9	4.50, <i>m</i>
C(3')	171.9		157.6	
C(5')	188.9		174.7	
Me-N(4')			25.7	2.85

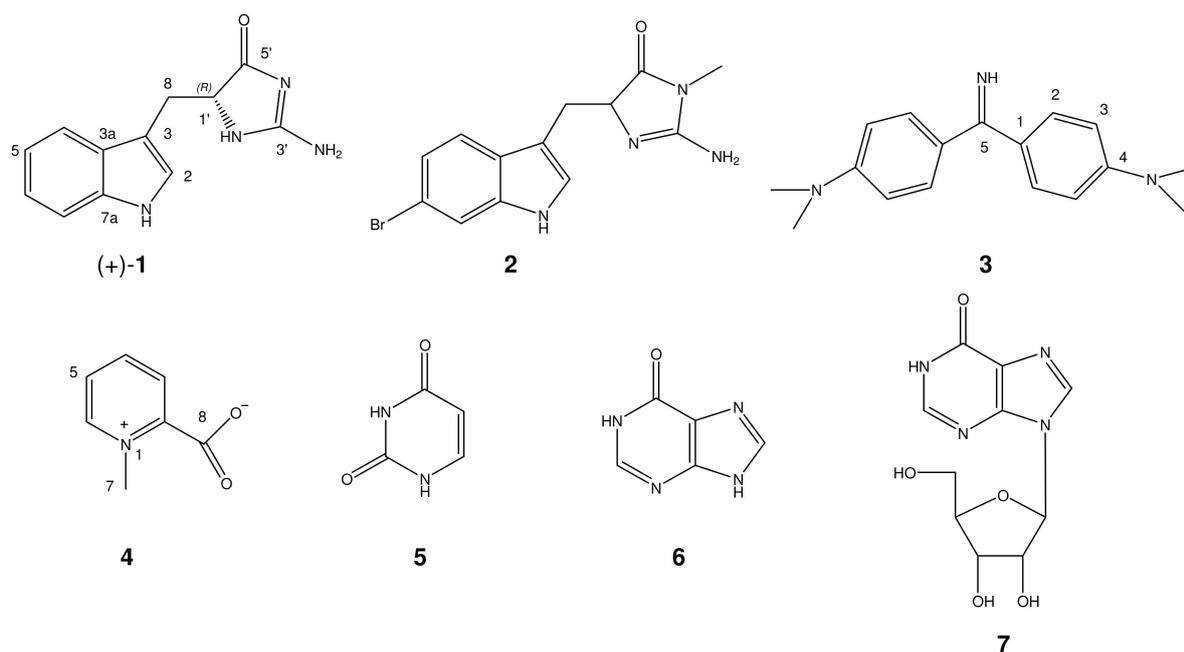


Fig. 1. Structures of compounds 1-7

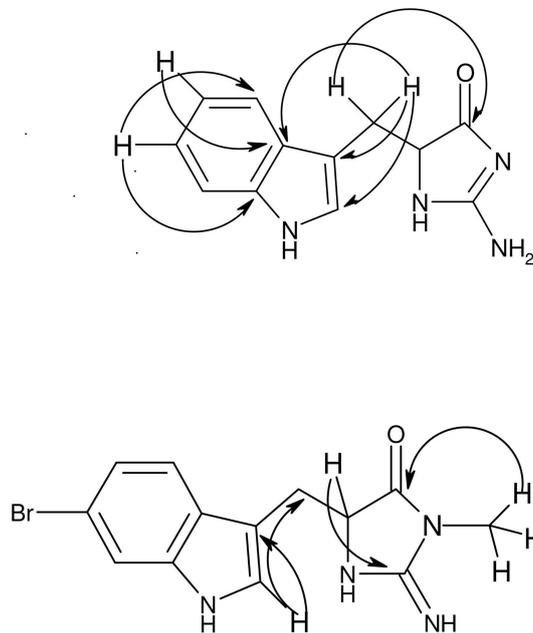
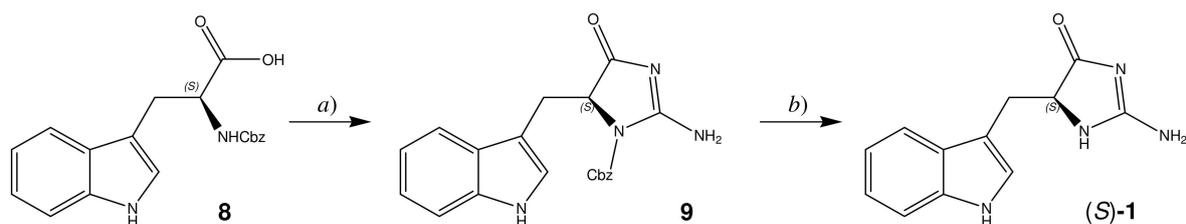


Fig. 2. Selected HMBC correlations of compounds 1 and 2



Scheme 1. Synthesis of compound (S)-1

a) 1. DCC, NHS, 0 °C, 3 h, 2. NaNHCN, r.t., overnight; 62%. b) Pd/C, H₂, r.t., 1 h; 83%.

REFERENCES

- [1] F. Bosmans, J. Tytgat, *Toxicon* **2007**, *49*, 550.
- [2] D. J. Ayre, *Mar. Biol.* **1982**, *68*, 199.
- [3] J. L. Yarnall, *Anim. Behav.* **1969**, *17*, 747.
- [4] L. Cariello, L. Zanetti, *Comp. Biochem. Physiol. C* **1977**, *57*, 169.
- [5] M. Yotsu-Yamashita, D. Mebs, W. Flachsenberger, *Toxicon* **2007**, *49*, 410.
- [6] B. Bao, P. Zhang, Y. Lee, J. Hong, C.-O. Lee, J. H. Jung, *Mar. Drugs* **2007**, *5*, 31.
- [7] A. Olofson, K. Yakushijin, D. A. Horne, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5787.
- [8] G. Guella, I. Mancini, H. Zibrowius, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1444.
- [9] R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. J. Quinn, R. J. Wells, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *1*, 61.
- [10] P. Djura, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 735.
- [11] S. Aoki, Y. Ye, K. Higuchi, A. Takashima, Y. Tanaka, I. Kitagawa, M. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1372.
- [12] M. Suzuki, Y. Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 609.
- [13] E. Fischer, C. Garces, A. Lopez, *J. Bacteriol.* **1946**, *51*, 1.
- [14] J. L. Shapo, P. D. Moeller, S. B. Galloway, *Comp. Biochem. Physiol. B* **2007**, *148*, 65.
- [15] M. Slattery, M. T. Hamann, J. B. McClintock, T. L. Perry, M. P. Puglisi, W. Y. Yoshida, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1997**, *161*, 133.
- [16] K. Fukushima, C. Ajinomoto, *Nipp. Suis. Gakkaishi* **1962**, *28*, 909.
- [17] E. A. Lapan, *Comp. Biochem. Physiol. A* **1975**, *52*, 651.

- [18] B. Moon, H.-S. Chai, S.-K. Chang, Y. Park, I. Kim, *Journal of the Korean Chem. Soc.*, **1999**, *43*, 354.
- [19] D. M. Tapiolas, B. F. Bowden, E. Abou-Mansour, R. H. Willis, J. R. Doyle, A. N. Muirhead, C. Liptrot, L. E. Llewellyn, C. W. W. Wolf, A. D. Wright, C. A. Motti, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1115.
- [20] N. M. Targett, S. S. Bishop, O. J. McConnell, J. A. Yoder, *J. Chem. Ecol.* **1983**, *9*, 817.
- [21] C. Kwon, M. Tahir Iqbal, J. N. D. Wurpel, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1845.

The floral scent of *Taccarum ulei* (Araceae): attraction of scarab beetle pollinators to an unusual aliphatic acyloin

Abstract

The strongly fragrant thermogenic inflorescences of *Taccarum ulei* (Araceae) are highly attractive to night-active scarab beetles of *Cyclocephala celata* and *C. latericia*, effective pollinators of the species in northeastern Brazil. GC-MS analysis of headspace floral scent samples of *T. ulei* revealed that two constituents alone, (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone (an aliphatic acyloin) and dihydro- β -ionone (an irregular terpene), accounted to over 96% of the total relative scent discharge. Behavioral tests with pure synthetic standards of these chemical volatiles showed that male and female *C. celata* and *C. latericia* were attracted to traps baited with a mix of the two compounds, but were also responsive to (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone by itself. Our results enhance the comprehension about specialization in plant-pollinator interactions within the frame of the 'private communication channel' signal model.

Keywords: (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone, *Cyclocephala*, floral volatiles, behavioral tests

Introduction

With over 350 documented species, and many yet to be described, night-active scarab beetles of the tribe Cyclocephalini (Scarabaeidae, Dynastinae) are arguably the most diverse insect group of scent-driven pollinators in the Neotropics [1,2], rivaled only by fragrance-seeking male orchid bees (Apidae, Euglossini) [3].

Male and female cyclocephaline scarabs are attracted at dusk or during the night to fragrant anthetic flowers and inflorescences, which they use as mating aggregation sites and as a reliable source of nutritious food rewards, for which they pay with pollination services [4,5]. Important as the role of chemical attraction is in these highly specialized interactions, little is known about the assortment of volatile compounds that mediate them. Very few studies have actually illustrated the composition of the fragrances of cyclocephaline scarab-pollinated angiosperms in detail [6,7] and it was only recently that the spectrum was broadened to aroid taxa [CHAPTERS I, II, IV].

In the Atlantic Forest of northeastern Brazil, indigenous populations of the widespread Araceae *Philodendron acutatum* and *Caladium bicolor* rely exclusively on male and female *Cyclocephala celata* Dechambre 1980 as an effective pollinator [8,9]. The same scarab species, along with a congeneric (*C. latericia*), is also directly implicated with the reproductive success of syntopic populations of *Taccarum ulei* [CHAPTER IV].

A comparative analysis of the floral bouquet of *C. bicolor* to that of unrelated *Annona* species (Annonaceae) lead to the pioneer identification of a unique behaviorally active compound in pollination systems involving cyclocephaline scarabs [CHAPTER III]. In field experiments, scarab beetles were strongly driven to fragrant baits and easily entrapped for sampling purposes. Such type of paired comparisons, coupled to controlled attractivity biotests, offer a simple strategy to identify other bioactive compounds in similar plant-pollinator mutualisms.

In this study, we investigated the floral scent of *Taccarum ulei* and its implication with the attraction of scarab beetle pollinators, tackling the following questions: (1) what is the chemical composition of the bouquet and how original is it? (2) are the prominent constituents in the floral scent of *T. ulei* also found in other syntopic aroid species sharing the same pollinators? (3) are these prominent compounds directly implicated with the attraction of effective pollinators?

Material and methods

Floral scent composition

Scent samples of *Taccarum ulei* were collected through dynamic *headspace* extraction from three intact individuals dug up from their natural setting (refer to CHAPTER IV for details) and kept inside a greenhouse (n=3). During thermogenic activity in the female phase of anthesis, each inflorescence was enclosed within a PET film oven bag (Bratschlauch, Melitta GmbH, Germany) from which scented air was drawn for 30 min by battery-operated membrane pumps (ASF Thomas, Inc., Germany) at a constant flow rate of ca. 200 ml.min⁻¹. The volatiles in the air were trapped in glass tubes containing 25 mg of adsorbent polymer; a 1:1 mix of Tenax™ TA (80/100 mesh, Macherey-

Nagel 706318) and Carbopack™ X (20/40 mesh, Supelco 1-0435). Immature inflorescences (n=2) and the leaf blade (n=1) were additionally sampled. Blanks were simultaneously collected from empty bags. Immediately following the collections, the traps were eluted with 150 µL acetone (p.a. grade) then kept at -24 °C refrigeration until analysis.

Analyses were conducted by combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) on a Thermo Finnigan Voyager Mass Spectrometer™ coupled with a Thermo Trace GC 2000™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA), equipped with a CP-Wax 52CB column (Varian, Inc.; 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). For each sample, 0.6 µL of the elution was injected on column. GC oven temperature was set at 60 °C for 3 min then increased by 2.5°C min⁻¹ to 240 °C, then held steady for 10 min. Helium carrier gas flow was maintained at a constant pressure of 100 kPa. The MS interface was 200 °C and mass spectra were taken at 70eV (in EI mode) with a scanning speed of 0.5 scan^{-s} from *m/z* 20-350. Compounds were identified by comparison of their mass spectra and retention times with those of authentic reference samples available from the Givaudan SA reference compound collection with the Xcalibur 2.0™ software (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). The peak areas on the chromatograms were integrated for the total ion current signal and their values were used to determine the relative amounts of each compound.

The main peak compound isolated in the analyzed floral scent samples was investigated regarding optical isomerism. Chiral GC-FID analyses were conducted on a HP 5890 Series II gas chromatograph, equipped with a BGB-176SE column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) with H₂ as carrier gas. The temperature program was: 50 °C isothermal for 5 min, 3 °C min⁻¹ to 210 °C, isothermal for 20 min. The chromatogram obtained from the coinjection of the floral scent of *Taccarum ulei* and synthetic (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone showed only one symmetrical peak at 20.5 min, which lead us to the assumption that only this enantiomer was naturally abundant. To prove this hypothesis, we also prepared an analytic sample of racemic 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone from the cyclic DL-lactide (**fig. 1**) which eluted as a double peak at 20.4 and 20.5 min. Finally, the coinjection of the racemic mixture with a small aliquot of the eluted floral scent of *Taccarum ulei* lead to an increased peak at 20.5 min with a shoulder at 20.4 min. Thus we assigned the signals as follows: 20.4 min, (*R*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone; and 20.5 min, (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone.

Authentic standards

The most prominent constituents in the analyzed flower scent samples of *Taccarum ulei* were selected for attractivity biotests. Dihydro-β-ionone was purchased from a commercial supplier in its highest available purity (≥90%; Sigma-Aldrich). A sample of racemic 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone was gently provided by Roman Kaiser (Givaudan Fragrance Research, Switzerland). (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone was prepared in a simple two-step sequence, starting from commercially available (*S*)-(-)-ethyl lactate (**fig. 1**).

Synthesis of (S)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone

For the synthesis of (S)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone (**4**), (S)-(-)-ethyl lactate (**1**) was converted to the Weinreb amide (**2**) by reaction with *N*-methoxymethylamine hydrochloride in the presence of Me₃Al, following standard procedure [10]. The desired compound **4** was obtained by treating the crude amide with commercial isobutyllithium solution in THF at -78 °C in 52% overall yield.

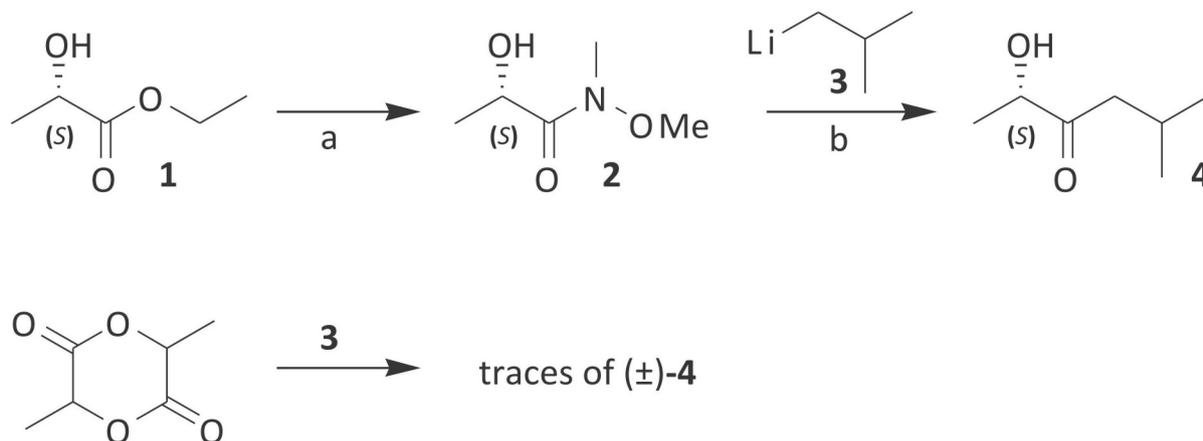


Figure 1. Reagents and conditions: (a) MeONHMe.HCl, Me₃Al, benzene, reflux, 2 h. (b) THF, -78 °C, 2 h, 52% overall.

(S)-2-HYDROXY-N-METHOXY-N-METHYLPROPANAMIDE (**2**): To a suspension of *N*-methoxymethylamine hydrochloride (5.00 g, 51.26 mmol) in benzene (50 mL) at 0 °C under an argon atmosphere, Me₃Al (2M in heptane, 25.70 mL, 51.4 mmol) was slowly added via syringe. The ice bath was removed, and the yellow solution was stirred at r.t. for 1 h. Lactate **1** (2.30 mL, 20.1 mmol) was added via syringe and the resulting solution was allowed to reflux for 2 h. This reaction mixture was cooled to 0 °C and carefully quenched by slow addition of 1N HCl until a clear solution was formed. The layers were separated, the aqueous phase was extracted with MTBE (3 × 80 mL) and the combined extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure, leaving the crude amide **2** (1.953 g), which was pure enough for the next step.

(S)-2-HYDROXY-5-METHYL-3-HEXANONE (**4**): The crude amide **2** obtained above was dissolved in THF (120 mL) under an argon atmosphere and cooled to -78 °C. Isobutyllithium (1.7M in heptane, 25.0 mL, 42.5 mmol) was added dropwise and the resulting solution was stirred for 2 h. The cooled reaction mixture was quenched by introducing it into a rapidly stirred dil. NH₄Cl solution via a thin PTFE tube under a positive argon pressure. The layers were separated, the aqueous phase was extracted with Et₂O (3 × 80 mL) and the combined extracts were passed through a plug of silica/MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure, leaving the crude ketone **4** which was purified by MPLC (Büchi Sepacore®, MN Nucleodur® 100-12, pentane/MTBE gradient from 5:1 to 3:1 in 30 min, UV detection at 278 nm), yielding pure **4** as a colorless oil with a distinct yeasty, old cheese smell (1.358 g, 10.43 mmol, 52% overall). *R*_f = 0.3 (pentane/MTBE 3:1) [*α*]_D²³ = +70.4 (*c* = 2.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 4.18 (dq, *J* = 7.1, 4.7 Hz, 1 H, 2-H), 3.58 (d, *J* = 4.7 Hz, 1

H, OH), 2.42–2.12 (m, 3 H, 4-H, 5-H), 1.35 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H, 1-H), 0.92 and 0.91 ($2 \times$ d, $J = 6.6$ Hz, 6 H, *iPr*) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 212.2$ (C-3), 72.8 (C-2), 46.4 (C-4), 24.5 (C-5), 22.6 and 22.5 (*iPr*), 19.6 (C-1) ppm. FT-IR (ATR): $\nu = 3438$ (broad), 2959 (m), 2873 (w), 1710 (s), 1367 (s), 1130 (s), 1045 (s) cm^{-1} . HRMS (ESI): 153.0884 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd. for $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_2 + \text{Na}]^+$: 153.0886.

Attractivity biotests

Chemical attraction experiments were conducted in the field and in a controlled environment, inside a rearing cage. We manufactured custom “Japanese beetle traps” based on commercially available models (Trécé, Palo Alto, USA). Each trap consisted of a generic clear PET soda bottle (2L), diametrically cut at its upper third to yield a funnel (13 cm x 10 cm \varnothing) and a canister (23.5 cm x 10 cm \varnothing). The funnel was glued to the canister, its tip facing inwards. Four cross-connected vanes (29 cm x 6.5 cm \varnothing) cut from green plastic sheets were then glued to the set, to which a hanging hook was also attached (**fig. 2**). For baiting we used dispensers consisting of 2 mL clear glass vials (12 x 32 mm, Supelco, Bellefonte, USA) half-filled with paraffin oil (Sigma-Aldrich, puriss. grade) to which the desired volatile compound was added then thoroughly stirred. Pieces of sterilized cotton were later pushed into the vials, so that their tips leveled with the rim openings. The dispensers were then inserted in an aperture cut in between the vanes of each trap (**fig. 2**). Control traps contained dispensers without test compounds.

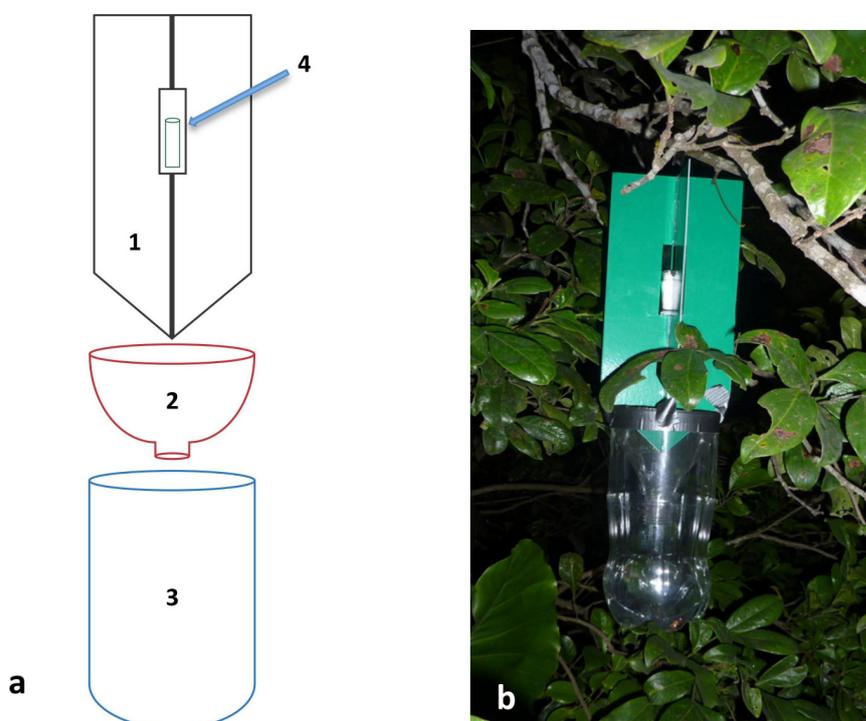


Figure 2. “Japanese beetle trap”, custom built model: (a) Schematic drawing: 1. plastic vanes, 2. funnel, 3. canister, and 4. fragrant bait dispenser. (b) Trap installed in the field.

The field experiment was conducted on February 28th 2010 and February 24th 2011 in a small forest fragment (ca. 350 ha) located at Usina São José S/A sugarcane industry, municipality of Igarassu (7°48′-7°49′S; 35°01′-35°02′W; altitude approx. 110 m) (refer to CHAPTER IV for details). We tested traps baited with 50 µl undiluted (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone (*HE*), undiluted dihydro-β-ionone (*DI*) and mix based on the relative percentage of these compounds in the floral scent of *T. ulei* (4:1 racemic 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone: dihydro-β-ionone; *HE/DI*). The traps were hung chest-high from tree branches along the border of the fragment, no less than 25 m apart from each other. Each experimental trap was paired with an unbaited control. Sampling took place between 17h30-21h00, when the crepuscular/nocturnal cyclocephaline scarab beetles are most active.

A rearing cage consisting of a wood frame covered with a fine plastic mesh (2,5 x 2,5 x 3,0 m) was built at a private forested area in municipality of Camaragibe, ca. 40 km from Igarassu. The cage was shaded throughout the entire day and protected from artificial lights at night, and clear fiberglass roofing shielded its interior from the rain. Its bottom consisted of 50 cm forest soil layered over concrete. We collected male and female scarab beetles of the species *Cyclocephala celata* (ca. 20 individuals) and *C. latericia* (ca. 30 individuals) inside inflorescences of *T. ulei* and *Philodendron acutatum* Schott. (Araceae) and released them inside the cage. The beetles were provided with a diet of exotic fruits (apples and plantains) and left undisturbed for 48h to adapt to the new environment. Attractivity tests were conducted in two non-consecutive evenings, from 17h00-20h30. Food was taken out of the cages at least 4h prior to each test. The setup consisted of four traps (2 experimental; 2 control) hung from the top corners of the cage at random. We tested the same compounds and compound mix used in the field experiments, but reduced their volume to 20 µl per dispenser.

Differences in beetle attraction in the controlled environment were analyzed using a general linear model with a Poisson error (count data, χ^2 statistics; GLIM v.3.77). The factor ‘treatment’ including the four treatments (*HE*, *DI*, *HE/DI* and ‘control’) was fitted to the data (fullmodel). Afterwards, simplified models grouping certain treatments were adjusted to the data and only those that were not significantly different from the main model were retained (simplified models; χ^2 test). Analyses were corrected for variations among the different repetitions of the experiment by including a ‘repetition’ factor. The focus being the attractivity of the tested compounds to cyclocephaline scarab beetles in general rather than the specificity of the attraction, no distinction among beetle species were made and counts for *Cyclocephala celata* and *C. latericia* were equally pooled.

Results

Floral scent composition

During the female phase of anthesis, *Taccarum ulei* inflorescences emanated a peculiar aroma, characterized by agreeable floral notes accompanied by a pungent, fermented-like odor, which resembled that of old cheese. Scent emission became stronger with the setting of thermogenesis when it could be easily perceived in the air by human nose up to 15 meters away from the warmed up inflorescences.

Chemical analysis of the floral bouquet of *T. ulei* led to the identification of 13 volatile compounds classified according to Knudsen *et al.* [6] among aliphatics (4), C5-branched chain compounds (3) and terpenoids (6) (**table 1**). Olfaction tests with authentic standards of the major constituents in analyzed floral scent samples revealed that the characteristic fermented-like notes were mainly attributed to 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone. The (*S*)-isomer of this aliphatic acyloin, along with the irregular terpene dihydro- β -ionone, together accounted to over 96% of the total relative scent emission of female phase inflorescences of *T. ulei* (76.4 and 19.9%, respectively; **table 1**). Samples taken from immature inflorescences and leaves of *T. ulei* did not yield detectable volatiles.

Biotests

In the field experiment we recovered six specimens of *Cyclocephala latericia* in traps baited with *HE* and one specimen of *C. celata* in a trap baited with *HE/DI*. No captures were recorded in traps baited with *DI* or in the paired controls (**fig. 3**). Three out of ten traps baited with *HE* effectively captured males and females of *C. latericia*, averaging 1.7 ± 0.6 (SD) captures per successful trap. None of the fourteen control traps captured any *Cyclocephala* (**fig. 3**). The number of captured beetles in the *HE* baits was significantly higher ($\chi^2_1 = 8.32$; $p = 0.004$) than in 'control'. (**fig. 3**).

The biotests conducted inside the rearing cage showed that traps baited with *HE* and *HE/DI* were significantly more attractive to both species of *Cyclocephala* than the controls, whereas the traps baited with *DI* were not (**fig. 3**). Three out of four traps baited with *HE/DI* effectively captured males and females of *C. celata* and *C. latericia*, averaging 3.7 ± 2.3 (SD) captures per successful trap. Two out of four traps baited with *HE* also yielded captures of the two species of *Cyclocephala*, averaging 3.0 ± 1.4 (SD) captures per successful trap. Captures with *DI* and 'control' traps were noticeably lower and restricted to few individuals of *C. celata* (**fig. 3**).

The number of captured beetles in the cage experiments (**fig. 3**) varied significantly among the four treatments ($\chi^2_3 = 12.32$; $p = 0.006$). In fact, the treatments *HE* and *HE/DI* captured significantly more beetles (overall mean 2.12 ± 2.2) than 'control' and *DI* (overall mean 0.58 ± 0.9) ($\chi^2_1 = 6.28$; $p = 0.012$). There was no difference in beetle captures between *HE* and *HE/DI* or between *DI* and 'control' ($\chi^2_2 = 6$; $p = 0.05$). We thus consider that (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone is attractive to the two species of pollinating cyclocephaline scarabs in pure form or mixed with dihydro- β -ionone.

Table 1. Chemical composition (and relative amounts of compounds) of the floral scent of *Taccarum ulei* (Araceae) and two other syntopic species of aroids pollinated by cyclocephaline scarab beetles (Scarabaeidae, Dynastinae).

Compound	<i>mw</i>	Relative amounts \pm [SD] (%)		
		<i>T. ulei</i>	<i>C. bico</i> ¹	<i>P. acut</i> ²
Aliphatics				
Acetic acid	60	---	---	0.03
Propionic acid	74	---	0.5	0.07
Isobutyric acid	88	---	0.2	0.01
2-Hydroxy-3-hexanone	116	0.02	---	0.04
Acetyl Isovaleryl	128	0.06 \pm [0.02]	---	---
2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone	130	76.39 \pm [11.96]	---	23.11
3-hydroxy-5-methyl-2-hexanone	130	0.08 \pm [0.01]	---	0.02
Pent-3-yl acetate	130	---	0.5	---
C5-branched chain compounds				
Isoamyl alcohol	88	1.02 \pm [0.54]	---	---
Ethyl isovalerate	130	0.02	---	---
2-Methylbutyl isobutyrate	158	0.02	---	---
Benzenoids and phenylpropanoids				
<i>p</i> -Vinylanisole	134	---	---	0.01
1,2-Dimethoxybenzene	138	---	0.1	---
Methyl salicylate	152	---	18.1	0.02
Methyl 2-methoxybenzoate	166	---	0.5	---
1,3,5-Trimethoxybenzene	168	---	43.0	---
N/S containing compounds				
4-Methyl-5-vinyl-thiazole	125	---	19.8	---
2-Methoxy-3-isopropylpyrazine	152	---	---	0.34
Miscellaneous cyclic compounds				
Jasmone	150	---	4.4	---
Terpenoids				
Myrcene	136	0.03	---	---
Limonene	136	0.02 \pm [0.01]	---	---
(<i>E</i>)-Ocimene	136	---	---	0.02
(<i>E</i>)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene	150	---	---	0.28
(<i>Z</i>)-4,8-Dimethyl-1,3,7-nonatriene	150	---	---	0.19
Geraniol	154	0.02	---	---
Linalool	154	---	7.8	0.03
4-Terpinenol	154	---	---	0.02
Dehydrodihydro- β -ionone	192	---	---	0.01
Dihydro-β-ionone	192	19.85 \pm [12.05]	---	74.41
β -Ionone	192	---	---	0.79
Dihydro- α -ionone	194	0.01 \pm [0]	---	0.20
Dihydro- β -ionol	194	---	---	0.14
Dihydro- β -ionone epoxide	208	---	---	0.02
unid. ethyl (x,y)-dodecadienoate	224	1.90 \pm [0.42]	---	---

Note. *mw* = molecular weight. Odor samples of *Taccarum ulei* recovered by dynamic headspace from fragrant inflorescences during the female phase of anthesis (n=3). In bold fonts, shared prominent compounds. Superscript numbers: ¹*Caladium bicolor* (Maia and Schlindwein [8]); ²*Philodendron acutatum* (Maia et al. [9]).

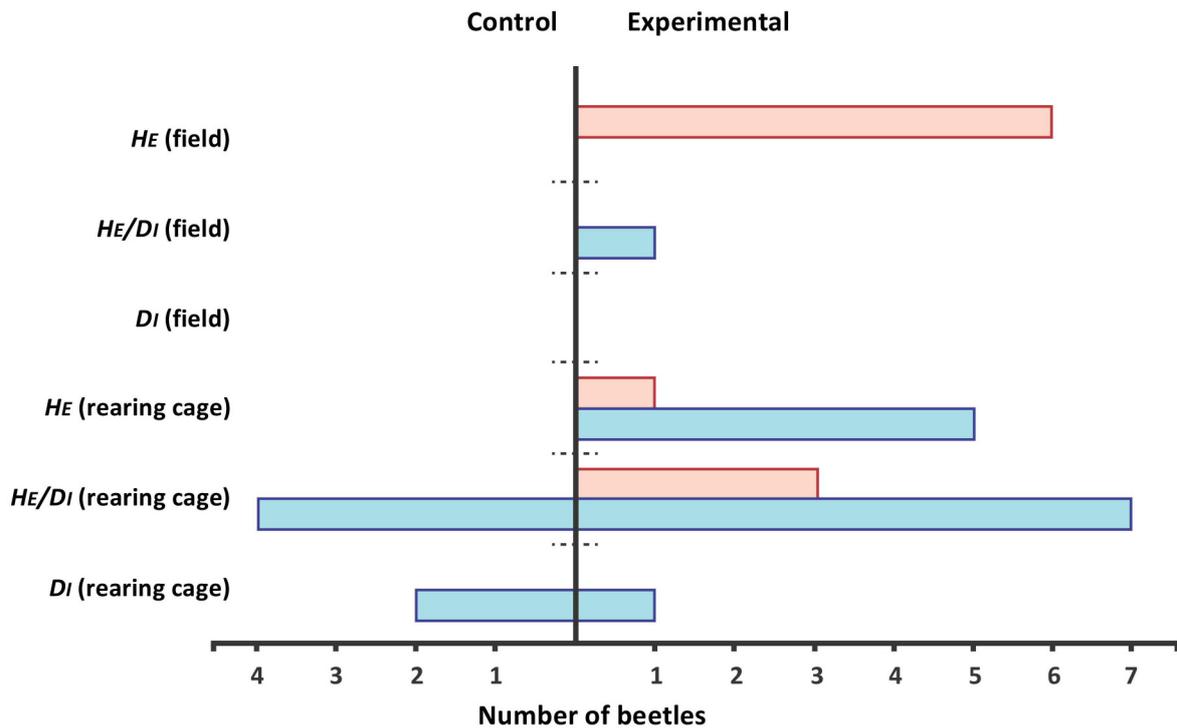


Figure 3. Attractivity of pollinating cyclocephaline scarab beetles (Scarabaeidae, Dynastinae) of the species *Cyclocephala latericia* (red horizontal columns) and *C. celata* (blue horizontal columns) to authentic standards of the most prominent constituents in the floral scent of *Taccarum ulei* (Araceae) in field experiments and controlled biotests inside a rearing cage. *HE* = (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone; *DI* = dihydro- β -ionone; *HE/DI* = 4:1 hydroxy-5-methyl-3-hexanone: dihydro- β -ionone. For statistical difference significations refer to the **Results** section.

Discussion

Most floral fragrances consist of complex chemical blends of diverse biosynthetic origins [11] and most known physiological responses of pollinators are triggered by volatile compounds acting synergistically according to strict relative ratios in the overall floral bouquets [12]. These intricate ‘floral filters’ ensure pollinator selectivity and are thought to be the major molding force behind the diversification of the mutualists involved [7,13]. Among some highly specialized pollination systems, nonetheless, it has been shown that occasionally single compounds induce direct attractive response of flower-visiting insects [14,15].

Fragrance seeking male euglossine bees, best known as pollinators of Neotropical orchids (Orchidaceae), are easily lured to pure standards of selected volatile compounds identified in the bouquets of their preferred hosts, mostly benzenoids and monoterpenes [16]. Maia *et al.* [CHAPTER III] showed similar responses of pollinating cyclocephaline scarabs to a selected floral volatile isolated from flowers of four species of *Annona* and *Caladium bicolor*.

The comparative investigation of the floral scent of *Taccarum ulei* uncovered an ample divergence from the fragrant bouquet of syntopic *C. bicolor*, clearly suggesting that the two species make use of distinct olfactory signals to attract closely related effective pollinators. In parallel, we found a remarkable analogy between the two prominent compounds of *T. ulei* and *Philodendron acutatum*.

None of the compounds identified in the floral scent of *T. ulei* are present in the contrasting fragrance of *Caladium bicolor*, dominated by benzenoids and 4-methyl-5-vinylthiazole, a nitrogen and sulfur-containing heterocyclic molecule. The floral scent of *P. acutatum*, however, is dominated by 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone and dihydro- β -ionone, the same prominent constituents of the bouquet of *T. ulei* (**table 1**). Interestingly, those two biosynthetically diverse compounds appear in reverse relative proportions in the scents of the two species, affecting their overall fragrance to the human nose [PERSON. OBSERV.].

Regarding their reproductive biology, it is assumed that the Philodendreae have evolved and diversified in close association with pollinating cyclocephaline scarabs [17]. Although a recent paper by Maia *et al.* [9] provides the only published data on floral scents of the large genus *Philodendron*, it is speculated that the fragrant bouquets of its more than 700 species are rather diverse and directly associated with pollinator selectivity and reproductive isolation [17,18].

The Spathicarpeae are comprised by 13 genera allegedly associated with a broad spectrum of specialized insect visitors, including flies [19], cyclocephaline scarabs [20] and small beetles (e.g. Nitidulidae) [PERSON. OBSERV.]. According to a phylogeny based on molecular markers and strongly supported by biogeographical information [21], cyclocephaline scarab-pollinated taxa are among the most basal within the Spathicarpeae. Diversification of pollinator strategies arose with the colonization of different habitats and deep adaptations of general floral buildup, notably the reduction of the inflorescences [21]. At first this information might seem abstruse, but flowers visited by the large cyclocephaline scarab beetles must be robust enough to endure intense mechanical damage [4,5]. Curiously enough, *Taccarum* is unmistakably assigned as a derived taxon within the tribe [21], closely associated with *Asterostigma*, whose smaller inflorescences are unlikely to be visited by insects as large as the smallest of the known species of the Cyclocephalini [22].

The compositional similarities in the floral scents of *T. ulei* and *P. acutatum* could be interpreted as a convergence towards the attraction of specialized pollinators. The monoterpene (*E*)-carvone oxide, a known attractant of male euglossine bees [23], is only found floral scents of orchids [24] and a handful of unrelated Euphorbiaceae [25], Annonaceae [26], Gesneriaceae [27], Araceae [28] – all of which pollinated by this particular group of specialized flower visitors. Similarly, 4-methyl-5-vinylthiazole seems to be a predictor of cyclocephaline scarab beetle pollination in at least two distinct angiosperm families [CHAPTER III].

Our results show that (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone is an attractant of *C. celata* and *C. latericia*, and is most likely the main odoriferous signal applied by both *T. ulei* and *P. acutatum* for luring effective pollinators. This aliphatic acyloin was rarely isolated in floral scents, but as it is known among unrelated lineages of extant angiosperms there is no evidence that its rarity is associated to phylogenetic constrain [9,29,30]. Such observation might also suggest that the occurrence of this compound in complex fragrant blend has been overlooked or misinterpreted, particularly because it was previously only isolated as a minor or secondary constituent in floral scents. Its identification in GC-MS analyses of natural scents is exclusively attributed to the work of notorious specialist Dr. R. Kaiser, from Givaudan Fragrance Research.

Although not particularly rare in flowers, dihydro- β -ionone is usually found at significantly lower relative concentrations than those documented for *T. ulei* and *P. acutatum*, in association with more widespread ionones [31]. Some of these irregular terpenoids, notably β -ionone, are known to be behaviorally active in the attraction of fragrance seeking male euglossine bees (Apidae, Euglossini) [19], leaf-miner flies (Agromyzidae) [32] and flower scarabs (Scarabaeidae, Rutelinae) [33]. However, our own biotests showed that by itself dihydro- β -ionone does not trigger attractivity responses from neither species of *Cyclocephala* implicated with the pollination of *T. ulei*.

The seemingly low number of captures observed in our field experiments are not to be undermined and might be related to low concentrations of (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone applied to the baits. While some plant species might apply only a few micrograms of released volatiles for effective pollinator attraction [11], cantharophilous angiosperms are remarkably fragrant and have been known to promote scent discharges at over 5,000 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}$, observed among Central American phytelphantoid palms (Arecaceae) [34]. Maia *et al.* [CHAPTER III] demonstrated that the release of 4-methyl-5-vinylthiazole by thermogenic inflorescences of *C. bicolor*, given its relative amount in the overall floral bouquet, was over 500 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}$.

These observations suggest that pollinating cyclocephaline scarab beetles also respond to high concentrations of attractive volatile compounds in the air, something also observed among other groups of nocturnal pollinators (e.g. moths, bats) [7,11]. In order to maximize attractiveness, surveys of male euglossine bees usually involve the use of high amounts of pure standards of behaviorally active compounds in the baits [19]. Attractiveness of cyclocephaline scarab beetles to the fragrant baits must also be influenced by the relative density of these insects within the radius of scent dispersal and the availability of host plants during the implementation of the experiment. The latter case is easily confirmed when evaluating the natural average number of insects recovered from inside thermogenic inflorescences during the short-lasting flowering period of a given species, many times higher than our own captures with fragrant lures [CHAPTER IV]. The heat generated by the spadix not only intensifies the volatilization of attractive compounds and their rapid dispersion over a wider radius, but it is also an energetic reward sought by the night-active pollinators [35].

The fact that *Cyclocephala celata* responds to at least two distinct scent-oriented attraction systems lead to some questions regarding mechanisms of plant-pollinator specialization involved. Based on the current experimental design, it is uncertain whether this observation is the result of a plastic response of the beetles to different plant host odors or if it is related to some level of sympatric segregation associated to preferences for a certain host plant. Because there is not a total overlap of the flowering periods of *C. bicolor*, *P. acutatum* and *T. ulei*, some level of temporal specialization could be expected, even for a potentially generalist pollinator. This would allow syntopic populations of the three species of aroids to explore the same provider of pollination services, something already speculated by Maia *et al.* [9].

It is unclear at the moment why *C. latericia* is exclusively found in inflorescences of *T. ulei*. We believe that the main olfactory signal provided by (*S*)-2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone is influenced by other constituents in the fragrance of *P. acutatum* and their relative concentrations in the blend, thus becoming less attractive to beetles of this species. Behaviorally active compounds from the

scents of orchids might attract relatively large numbers of species when applied singly, but their combination often results in significantly more constricted assortments of lured insects [19]. Further investigation about the olfactory orientation of cyclocephaline scarab beetles are still needed to better understand the processes of host specialization and, more generally, the chemical aspects of plant-pollinator coevolution in systems involving these insects.

Literature cited

- [1] Endrödi S. (1985) *The Dynastinae of the World*. Dr. W. Junk Publishers, Budapest.
- [2] Ratcliffe B.C., and R.D. Cave (2006). The dynastine scarab beetles of Honduras, Nicaragua, and El Salvador. *Bulletin of the University of Nebraska State Museum* **21**, 1-424.
- [3] Dressler R.L. (1982). Biology of the orchid bees (Euglossini). *Ann Rev Ecol Syst* **13**, 373-394.
- [4] Gottsberger G. (1986). Some pollination strategies in neotropical savannas and forests. *Plant Syst Evol* **152**, 29-45.
- [5] Bernhardt P. (2000). Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. *Plant Syst Evol* **222**, 293-320.
- [6] Knudsen J.T., R. Eriksson, J. Gershenzon, and B. Ståhl (2006). Diversity and distribution of floral scent. *Bot Rev* **72**, 1-120.
- [7] Dobson H.E.M. (2006). Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. Pages 148-198 in N. Dudareva, and E. Pichersky eds. *Biology of Floral Scent*. CRC Press, Boca Raton.
- [8] Maia A.C.D., and C. Schlindwein (2006). *Caladium bicolor* (Araceae) and *Cyclocephala celata* (Coleoptera, Dynastinae): a well-established pollination system in the northern Atlantic rainforest of Pernambuco, Brazil. *Plant Biol* **8**, 529-534.
- [9] Maia A.C.D., C. Schlindwein, D.M.A.F. Navarro, and M. Gibernau (2010). Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic Forest of northeastern Brazil: a single scarab beetle species guarantees high fruit set. *Int J Plant Sci* **171**, 740-748.
- [10] Luke G.P., and J. Morris (1995). Titanium and boron mediated aldol reactions of β -hydroxy ketones. *J Org Chem* **60**, 3013-3019
- [11] Knudsen J.T., and J. Gershenzon The chemical diversity of floral scent. Pages 27-52 in N. Dudareva, and E. Pichersky eds. *Biology of Floral Scent*. CRC Press, Boca Raton.
- [12] Raguso R. (2008). Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annu Rev Ecol Syst* **39**, 549-569.
- [13] Fenster C.B., W.S. Armbruster, P. Wilson, M.R. Dudash, and J.D. Thomson (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annu Rev Ecol Syst* **35**, 375-403.
- [14] Dötterl S. *et al.* (2006). Nursery pollination by a moth in *Silene latifolia*: the role of odours in eliciting antennal and behavioural responses. *New Phytol* **169**, 707-718.
- [15] Schiestl F.P., and R. Peakall (2005). Two orchids attract different pollinators with the same floral odour compound: ecological and evolutionary implications. *Funct Ecol* **19**, 674-680.
- [16] Dodson C.H., R. Dressler, H. Hills, R. Adams, and N. Williams (1969). Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* **164**, 1243-1249.

-
- [17] Croat T.B. (1997). A revision of *Philodendron* subgenus *Philodendron* (Araceae) for Mexico and Central America. *Ann Missouri Bot Gard* **84**, 311-704.
- [18] Schatz G.E. (1990). Some aspects of pollination biology in Central American forests. Pages 69-84 in K.S. Bawa, and M Hadley eds. *Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants*. Parthenon, Paris.
- [19] Bogner J., and E.G. Gonçalves (1999) The genus *Gearum* (Araceae: Tribe Spathicarpeae). *Aroideana* **22**, 20-29.
- [20] Gibernau M. (2011). Pollinators and visitors of aroid inflorescences: an addendum. *Aroideana* **34**: in press.
- [21] Gonçalves E.G., S.J. Mayo, M.A. Van Sluys, and A. Salatino (2007). Combined genotypic-phenotypic phylogeny of the tribe Spathicarpeae (Araceae) with reference to independent events of invasion to Andean regions. *Mol Phylogenet Evol* **43**, 1023-1039.
- [22] Gonçalves, E.G. 2002. *Sistemática e evolução da tribo Spathicarpeae (Araceae)*. PhD Thesis. Universidade de São Paulo.
- [23] Whitten W.M., N.H. Williams, W.S. Armbruster, and M.A. Battiste (1986). Carvone oxide: an example of convergent evolution in euglossine pollinated plants. *Syst Botany* **11**, 222-228.
- [24] Kaiser R. (1993). *The Scents of Orchids: Olfactory and Chemical Investigations*. Elsevier, Amsterdam.
- [25] Armbruster W.S., S. Keller, M. Matsuki, and T.P. Clausen (1989). Pollination of *Dalechampia magnoliifolia* (Euphorbiaceae) by male euglossine bees. *Am J Bot* **76**, 1279-1285.
- [26] Teichert H., S. Dötterl, B. Zimma, M. Ayasse, and G. Gottsberger (2009). Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biol.* **11**, 29-37.
- [27] Gerlach G., and R. Schill (1991). Composition of orchid scents attracting euglossine bees. *Bot Acta* **104**, 379-391.
- [28] Schwerdtfeger M., G. Gerlach, and R. Kaiser (2002). Anthecology in the neotropical genus *Anthurium* (Araceae): a preliminary report. *Selbyana* **23**, 258-267.
- [29] Shuttleworth A., and S.D. Johnson (2010). The missing stink: sulphur compounds can mediate a shift between fly and wasp pollination systems. *Proc R Soc B* **277**, 2811-2819.
- [30] Johnson S.D, M.E. Griffiths, C.I. Peter, and M.J. Lawes (2009). Pollinators, "mustard oil" volatiles, and fruit production in flowers of the dioecious tree *Drypetes natalensis* (Putranjivaceae). *Am J Bot* **96**, 2080-2086.
- [31] Kaiser R. (2006). *Meaningful Scents Around the World: Olfactory, Chemical, Biological, and Cultural Considerations*. Wiley-VCH, Zurich.
- [32] Wei M., X. Deng, and J. Du (2005). Analysis and identification of *Liriomyza sativae*-attractants from cowpea and kidney bean volatiles. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **16**, 907-910.
- [33] Donaldson J.M.I., T.P. McGovern, and T.L. Ladd Jr (1990). Floral attractants for Cetoniinae and Rutelinae. *J Econ Entomol* **83**, 1298-1305.
- [34] Ervik F., Tollsten L., and J.T. Knudsen (1999). Floral scent chemistry and pollination ecology in phytelephantoid palms (Arecaceae). *Plant Syst Evol* **217**, 279-297.
- [35] Seymour R.S., C.R. White, M. Gibernau (2003). Heat reward for insect pollinators. *Nature* **426**, 243-244.

8. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. KARLHEINZ SEIFERT für die Möglichkeit zur Promotion und das mir anvertraute Forschungsprojekt. Mein besonderer Dank gilt ihm für die nicht selbstverständliche Menge investierter Zeit für wissenschaftliche Diskussion, Unterstützung und das entgegengebrachte uneingeschränkte Vertrauen. Ich danke auch den Kooperationspartnern Prof. Dr. KONRAD DETTNER und PD Dr. STEFAN DÖTTERL für die exzellente und ergiebige Zusammenarbeit im Rahmen der Gemeinschaftsprojekte.

Prof. Dr. RAINER SCHOBERT gilt Dank für die Bereitstellung eines Labors während der Bauarbeiten im Gebäude NW II.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. HANS GERLACH für zahlreiche fruchtbare und begeisternde Diskussionen und praktische Tipps.

Ich bedanke mich bei Dr. INKA LUSEBRINK, ANDREAS SCHIERLING, CAROLIN LANG und Dr. SIEGFRIED KEHL für die unkomplizierte und sehr kollegiale Zusammenarbeit bei den jeweiligen *Stenus*-Projekten.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen MATTHIAS GÖHL, JOHANNES KALDUN, LIENHARD MACK, NADJA NAGEL, MARC-ANDRÉ SCHNEIDER und ISABEL WITTMANN für die stets angenehme, kollegiale und schöne Zeit in der Arbeitsgruppe OC NW II.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei Mitarbeitern der Zentralen Technik, insbesondere bei Dr. WILLY THURN und MARKUS SCHERM für ihr Engagement beim Aufbau der Laborräume und bei KLAUS NÜSSEL für die stets schnelle und kompetente Hilfe bei technischen Problemen. Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der wissenschaftlichen Werkstätten, besonders bei MICHAEL DITTRICH und allen Beschäftigten des Glasgerätebaus für die kompetente Bearbeitung des Großauftrages und unermüdliche Reparatur gewaltiger Mengen beschädigter Glasgeräte.

Ich danke allen Mitarbeitern der benachbarten Arbeitsgruppen MC II und MC I für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die sehr effiziente und unbürokratische Zusammenarbeit bei chemischen Problemen.

Danken möchte ich an dieser Stelle all meinen Praktikanten JULIAN LANG, MARINA BEHR, DANIEL KLUGE, CHRISTOPH O. HOLLFELDER, MARC-ANDRÉ SCHNEIDER, JOHANNES KALDUN, ANIELA HEIDEBRECHT, ANNA KUNZ, und CAROLIN MAURER für ihrer Beiträge zu dieser Arbeit, viel zerbrochenes Glas :-)) und unvergessliche Erlebnisse.

Besonderer Dank gilt den ehemaligen Bachelor-Studenten und Studentinnen MATTHIAS GÖHL, NADJA NAGEL, ISABEL WITTMANN und JOHANNA STEINL für ihre Beiträge zu dieser Arbeit. Insbesondere MATTHIAS GÖHL hat einen erheblichen Anteil an der Synthese von Cicindeloïn.

Ich danke KERSTIN HANNEMANN und Dr. ULRIKE LACHER für zahlreiche NMR- und MS-Messungen

Danken möchte ich Dr. OLEG TOK und Dr. PETER THOMA für die Hilfe bei der Messung „anderer“ Kerne und bei für mich nicht alltäglichen NMR-Experimenten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. HOLM-FRAUENDORF und meinem ehemaligen Laborkollegen MICHAEL MÜLLER (Universität Göttingen) für das Messen hochaufgelöster Massenspektren.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bei Fachlehrer CHRISTIAN SOMMER (Berufsschule I) für die persönliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt natürlich den elterlichen Sponsoren für ihre drei Jahrzehnte währende persönliche und finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Bayreuth, den 30.09.2011

Tobias Müller

(Tobias Müller)