

Table I. Contents of tetrahydrocannabinolic acid in fresh samples at different periods

Date of collection (1968)	Sex	Top leaf of stem (%) ^a	Leaf of middle height of stem (%)	Bractlet (%)	Bract (%)	Flower (%)	Flower bud (%)
July, 17	Male	0.65	—	—	2.59	0.45	2.11
June, 19		1.47	0.61	—	—	—	—
July, 17	Female	1.86	1.20	—	4.77	—	—
August, 23		0.21	0.50	1.44	—	2.17	—
September, 17		0.12	0.19	5.62	—	—	—

^a The % values are relative to the air-dried tissue weight and the means of 3 or 4 determinations with the relative mean deviation of $\pm 5\%$.

Table II. Contents of tetrahydrocannabinolic acid in bractlets at different periods

Date of collection (1968)	IX/1	IX/21	IX/28	X/9	X/19	X/30 ^b
Contents (%) ^a	2.68	5.84	6.60	8.45	9.40	10.90

^a The % values are relative to the air-dried tissue weight and the means of 3 or 4 determinations with the relative mean deviation of $\pm 5\%$. ^b The plant bodies were at the onset of withering.

during storage². Since THCA can hardly be extracted with the ordinary organic solvents, the process of decarboxylation of the acid to THC as a preliminary treatment of analysis was essential for the measurement; without the treatment the values of THC obtained from fresh plants were very small. Although the dehydrogenation of THC to cannabinol on smoking was observed to some extent³⁻⁵, the heating process at 110°C for 15 min was unaffected for such transformation.

The amounts of THCA were thus found to be differently distributed in the various sections of the plant body at the different seasons and to be higher in the parts in pros-

perous growth. As shown in Table I, THCA, though determined as a figure of THC, was contained rather highly at the top leaf of stem in younger female plant and at the bract and flower bud in male plant. The remarkable increase of this compound in the bractlet was observed in proportion to the ripening of seeds and was the highest at the end of growth as shown in Table II, contrary to the rapid decrease in the top leaf.

Zusammenfassung. In Abhängigkeit der Entwicklungszeit wird in Wildhanfpflanzen die Verteilung des Tetrahydrocannabinols gaschromatographisch bestimmt.

M. KIMURA and K. OKAMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo (Japan), and Scientific Criminal Laboratory, Hokkaido Police Headquarters, Sapporo (Japan), 1970.

² I. NISHIOKA, Y. SHOYAMA, T. YAMAUCHI, H. ARAMAKI and T. AZUMA, *Chem. pharm. Bull.*, Tokyo 15, 1075 (1967).

³ I. NISHIOKA, Y. SHOYAMA, A. YAMAGUCHI, T. SATO and T. YAMAUCHI, *J. pharm. Soc. Japan* 89, 842 (1969).

⁴ U. CLAUSSEN and F. KORTE, *Tetrahedron Letters* 22, 2067 (1967).

⁵ U. CLAUSSEN and F. KORTE, *Justus Liebigs Annln Chem.* 713, 162 (1968).

Zur Biosynthese der C₉₋₁₀-Einheit der Indolalkaloide

Es ist bekannt, dass die monoterpenoiden Indolalkaloide aus Tryptamin und Secologanin aufgebaut werden^{1,2} und die einzelnen Alkaloidtypen (Corynanthe-, Aspidosperma-, Ibogatyp) durch nachfolgende Umlagerungen entstehen. Mevalonat, Geraniol bzw. Nerol werden spezifisch in das C₉₋₁₀-Fragment inkorporiert. Dagegen ist bisher ungeklärt, auf welche Weise der C₅-Körper bei den Indolalkaloiden entsteht. Ein spezifischer Einbau von Acetat konnte bislang nicht beobachtet werden³⁻⁶. Kürzlich wurde gezeigt^{7,8}, dass Glycin-(2-¹⁴C) spezifisch in die C₉₋₁₀-Einheit des Ipecacuanha-Alkaloids Cephaelin eingebaut wird. Kuhn-Roth-Oxidation und nachfolgender Schmidt-Abbau ergaben, dass 15–18% der Radioaktivität im C-15 lokalisiert waren. Bei einer Applikationszeit von 10 Tagen wurden wesentlich höhere Einbauraten erzielt als bei 21tägiger Fütterungsdauer. Acetat-(2-¹⁴C) ergab eine geringere Einbaurate in das Alkaloid als Glycin. In diesem Fall war die Radioaktivität gleichmässig zwischen C-14 und C-15 verschmiert. Acetat-(2-¹⁴C) wurde aber in

spezifischer Weise, entsprechend der Isopren-Regel, in β -Sitosterol eingebaut. Die Autoren schliessen daraus, dass zwei verschiedene Monoterpen-Einheiten in der gleichen Pflanze (*Cephaelis acuminata*) aus unterschiedlichen C₂-Vorstufen aufgebaut werden. Markiertes Leucin sowie Glycin-(1-¹⁴C) wurden praktisch nicht in Cephaelin inkorporiert. GARG und GEAR⁹ verfütterten Glycin-(2-¹⁴C) ebenfalls an *Rauwolfia serpentina*-Pflanzen und unterwarfen Ajmalin und Reserpin einem chemischen Abbau. In der Reserpsäure und der 3, 4, 5-Trimethoxybenzoesäure waren 83% bzw. 15,5% der Radioaktivität lokalisiert. Kuhn-Roth-Oxidation und nachfolgender Schmidt-Abbau zeigten, dass das Kohlenstoffatom C-18 vom Ajmalin 15,5% der Radioaktivität enthielt. Die Autoren postulieren, dass Glycin als spezifische Vorstufe für das C₉₋₁₀-Fragment von Alkaloiden anzusehen ist.

Wir haben ebenfalls versucht, dieses Problem zu klären und verschiedene markierte Vorstufen an Sprosse von *Catharanthus roseus* appliziert. Die Fütterungsdauer be-

trug 6 Tage, beim Glycin-(2-¹⁴C)-Versuch 2 Tage. Folgende spezifische Einbauraten in Vindolin (I) wurden gefunden: Leucin-(2-¹⁴C) (0,045%); Glyoxylat-(2-¹⁴C) (11,8%); Glycin-(1-¹⁴C) (1,9%) und Glycin-(2-¹⁴C) (3,4%). Das jeweils isolierte Vindolin wurde bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt, verdünnt und in der früher von uns beschriebenen Weise abgebaut⁶. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt. Bei einem spezifischen Einbau von Glycin-(2-¹⁴C) bzw. Glyoxylat-(2-¹⁴C) sollten 16,6% der Radioaktivität im C-21 lokalisiert sein. Dies ist jedoch bei diesen Verbindungen sowie beim Leucin-(2-¹⁴C) und Glycin-(1-¹⁴C) nicht der Fall. Der verhältnismässig gute Einbau von Glycin-(2-¹⁴C) in die N- und O-Methylgruppe von I ist verständlich, da das α -C-Atom des Glycins durch verschiedene Mechanismen für die Synthese «aktiver» Einkohlenstoffkörper herangezogen werden kann. Leucin wird offenbar in *Catharanthus* nicht zum β -Hydroxy-

β -methylglutaryl-CoA, sondern bis zum Acetyl-CoA abgebaut und wird bevorzugt in die O-Acetylgruppe von Vindolin inkorporiert.

In einem weiteren Versuch applizierten wir Glycin-(2-¹⁴C) an *Strychnos nux vomica*-Pflanzen über die Wurzeln. Nach 4tägiger Applikation wurden die Wurzeln aufgearbeitet und das Alkaloidgemisch getrennt¹⁰. Die spezifische Einbaurate in Strychnin betrug 0,18%. Bei einem spezifischen Einbau im Sinne von GEAR und GARG⁷⁻⁹ sollten 20% der Radioaktivität im C-18 des Strychnins (II) lokalisiert sein. Das radioaktive Strychnin wurde verdünnt, ein Teil zur Indoleninbase (III) abgebaut¹¹ und (III) einer Kuhn-Roth-Oxidation unterworfen. Die erhaltene Essigsäure (C-18, C-19) und Propionsäure (C-18, C-19, C-20), isoliert als Bromphenacyl-ester, waren frei von Radioaktivität. Ein aliquoter Teil des Strychnins wurde nach BOIT¹² in das N-Methyl-tetrahydro-4,5-chanostrychnin (IV) überführt und nach Kuhn-Roth oxidiert. In der resultierenden Essigsäure (C-5, C-6) waren 77,4% der Radioaktivität lokalisiert. Damit ist wahrscheinlich gemacht, dass in Wurzeln von *Str. nux vomica* der überwiegende Teil des Glycins in Serin übergeht und via Tryptophan in Strychnin (II) inkorporiert wird. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis, dass die Wurzel als «Hauptbildungsstätte» der Alkaloide in *Str. nux vomica*-Pflanzen angesehen werden kann¹⁰.

Unsere Ergebnisse an *Catharanthus* und *Strychnos* stehen nicht im Einklang mit den bei *Rauwolfia*⁹ erzielten Resultaten. Weitere Untersuchungen scheinen erforderlich, um die Rolle des Glycins als mögliche Vorstufe der C₉₋₁₀-Einheit der Indolalkaloide zu klären.

Summary. After administration of various C₂-compounds as well as leucine-2-¹⁴C to *Catharanthus roseus* shoots and glycine-2-¹⁴C to *Strychnos nux vomica* plants no specific incorporation into the non-tryptophan C₉₋₁₀ moiety of indole alkaloids was observed. The results indicate that glycine-2-¹⁴C is transformed into serine and is incorporated via tryptophan into strychnine.

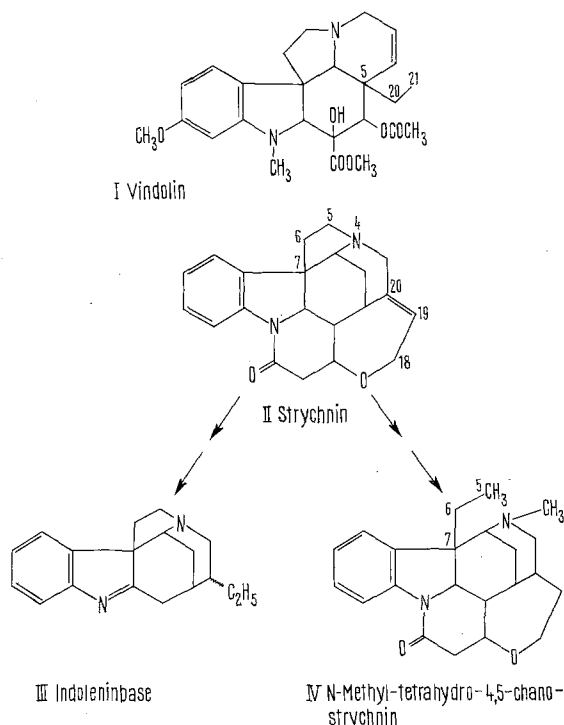
D. GRÖGER, W. MAIER
und P. SIMCHEN

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Institut für Biochemie der Pflanzen,
Halle (Saale, DDR 401), 23. Februar 1970.

Abbau von Vindolin nach Verfütterung verschiedener Vorstufen

Substanz	Aktivitätsverteilung in % bezogen auf Vindolin nach Applikation von			
	Leucin-(2- ¹⁴ C)	Glyoxylat-(2- ¹⁴ C)	Glycin-(1- ¹⁴ C)	Glycin-(2- ¹⁴ C)
Vindolin	100	100	100	100
Desacetylvindolin	16	96	87	96
Desacetylvindolinsäure	n.b. ^a	n.b.	n.b.	91
O-Acetylgruppe	84	3	8	2
Ester-Methylgruppe	n.b.	n.b.	n.b.	4
N- und O-Methylgruppe	n.b.	n.b.	n.b.	30
Propionsäure (C-5, C-20, C-21)	2	4	4	1,5
Essigsäure (C-20, C-21)	n.b.	1	2	1

^a n.b., nicht bestimmt; der relative Fehler der Radioaktivitätsmessungen beträgt etwa 5%.



- ¹ Zusammenfassende Darstellungen: A. R. BATTERSBY, *Pure appl. Chem.* **14**, 117 (1967). – D. GRÖGER, in *Biosynthese der Alkaloide* (Ed. K. MOTHES und H. R. SCHÜTTE; Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1969), p. 459. – D. ARIGONI, 4. Internationales Symposium «Biochemie und Physiologie der Alkaloide», Halle (Saale), Juni 1969, Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin (im Druck). – E. LEETE, *Adv. Enzymol.* **32**, 373 (1969).
- ² A. R. BATTERSBY, A. R. BURNETT und P. G. PARSONS, *Chem. Commun.* **1968**, 1280, 1282.
- ³ A. R. BATTERSBY, R. BINKS, W. LAWRIE, G. V. PARRY und B. R. WEBSTER, *Proc. chem. Soc.* **1963**, 369.
- ⁴ E. LEETE, A. AHMAD und I. KOMPIS, *J. Am. chem. Soc.* **87**, 4168 (1965).
- ⁵ H. GOEGGEL und D. ARIGONI, *Experientia* **21**, 369 (1965).
- ⁶ D. GRÖGER, K. STOLLE und K. MOTHES, *Arch. Pharmacol.* **300**, 393 (1967).
- ⁷ J. R. GEAR und A. K. GARG, *Tetrahedron Letters* **1968**, 141.
- ⁸ A. K. GARG und J. R. GEAR, *Tetrahedron Letters* **1969**, 4377.
- ⁹ A. K. GARG und J. R. GEAR, *Chem. Commun.* **1969**, 1447.
- ¹⁰ CH. SCHLATTER, E. E. WALDNER, H. SCHMID, W. MAIER und D. GRÖGER, *Helv. chim. Acta* **52**, 776 (1969).
- ¹¹ K. BERNAUER, W. ARNOLD, CH. WEISSMANN, H. SCHMID und P. KARRER, *Helv. chim. Acta* **43**, 717 (1960).
- ¹² H. G. BOIT, *Chem. Ber.* **86**, 133 (1953).