

## Zur Biogenese der Alkaloide, III<sup>1</sup>

### Lysin als Vorstufe des Coniins

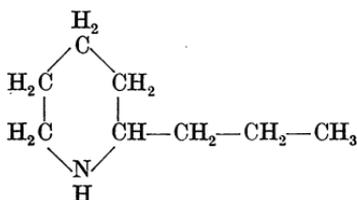
Von

Ulrich Schiedt† und Hans Günther Höss

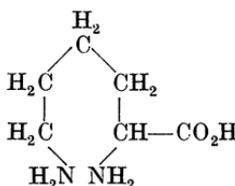
Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. Mai 1962)

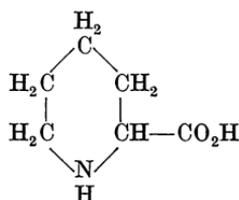
Nach Robinson<sup>2</sup> bilden sich Alkaloide aus Aminosäuren. Eine experimentelle Überprüfung dieser Hypothese war erstmals beim Nicotin<sup>3</sup> und Anabasin<sup>4</sup> möglich, deren nicht aromatische Ringe dem Ornithin bzw. Lysin entstammen. Es erhebt sich aber die Frage, wie weit die für Nicotin und Anabasin gültigen Befunde verallgemeinerungsfähig sind. Wegen seines einfachen Baus bietet sich Coniin (I), das Hauptalkaloid des gefleckten Schierlings (*Conium maculatum* L.), als Modell für die Untersuchung der Biogenese des Piperidinrings in höheren Pflanzen an.



I



II



III

Die wirkungsvolle Applikation von möglichen Vorstufen setzt die Kenntnis der in der Pflanze vorkommenden Aminosäuren und der Veränderung des Alkaloidspiegels während der Vegetationsperiode voraus. Nach Robinsons Hypothese der Alkaloidbiogenese ist als Vorstufe des Coniins (I) Lysin (II) zu vermuten. Das zweidimensionale Papierchromatogramm von Schierlingsextrakten zeigt Lysin neben Alanin, Serin, Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valin, Leucin und Phenylalanin. Von besonderem Interesse ist der Gehalt der Pflanze an Pipecolinsäure (III), die als Umwandlungsprodukt des Lysins ebenfalls

<sup>1</sup> II. Mitteil.: U. Schiedt u. G. Boeckh-Behrens, diese Z. **330**, 58 [1962], voranstehend.

<sup>2</sup> R. Robinson, *Struct. Relations of Natural Products*, Oxford Univ. Press London 1955.

<sup>3</sup> E. Leete u. K. J. Siegfried, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4529 [1957].

<sup>4</sup> E. Leete, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3520 [1956]; **80**, 4393 [1958].

Coniinvorstufe sein kann. Sie läßt sich in der Pflanze in sehr kleinen Mengen papierchromatographisch nachweisen\*.

Zur Ermittlung des Coniingehalts in Pflanzen hat sich für unsere Untersuchungen folgende Mikromethode bewährt: Mindestens 0,1 g getrocknetes Pflanzenpulver wird einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Nach dem Eindampfen der salzsauren Vorlage wird der Rückstand mit einer Mischung aus Formaldehyd und Natronlauge behandelt. Die verschieden starke Bindung des Coniins, seiner Nebenalkaloide und des Ammoniaks an Formaldehyd einerseits, und die kontinuierliche Veränderung des Ansatzes durch Polymerisation des Formaldehyds im alkalischen Milieu, bewirkt eine getrennte Austreibung von Coniin und seinen Nebenalkaloiden. Nach einer Versuchsdauer von 6,5 Stdn. bei 60° wird das übergegangene Alkaloid titrimetrisch bestimmt.

Bei Abschluß dieser Arbeit<sup>6</sup> ist auch eine colorimetrische Bestimmungsmethode für Coniin beschrieben worden<sup>7</sup>.

Mit dem oben beschriebenen Mikroverfahren wurden Gehaltsbestimmungen an einer einheitlichen Pflanzengruppe ausgeführt, die im

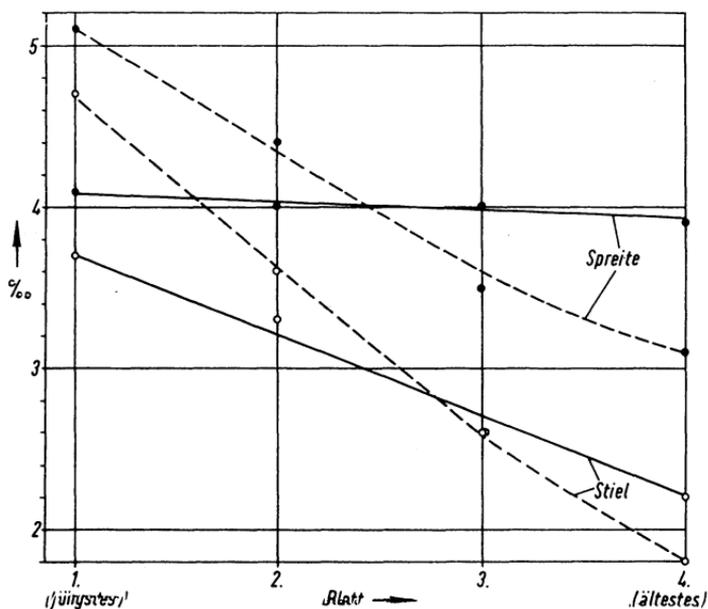


Abb. 1. Coniin-Gehalt von Blattspreiten und -stielen 11—12 Monate alter Pflanzen in Promille.

Auszugene Kurven: vor dem Austreiben; gestrichelte Kurven: bei beginnendem Austreiben.

\* Ein Verfahren zur Darstellung von <sup>14</sup>C-ringmarkierter Pipecolinsäure wurde bereits beschrieben<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> U. Schiedt u. H. G. Höss, diese Z. 308, 179 [1957].

<sup>6</sup> H. G. Höss, Dissert. Univ. München 1959.

<sup>7</sup> J. W. Fairbairn u. S. B. Challen, Biochem. J. 72, 556 [1959].

Gewächshaus aufgezogen wurde. Vor dem Austreiben war der Coniin-gehalt gleich großer Pflanzen gleichen Alters (11–12 Monate) in den jüngsten und ältesten Blattspreiten nahezu gleich (bezogen auf Trockengewicht), dagegen wurde in den jüngsten Blattstielen mehr Coniin gefunden als in den älteren (s. Abb. 1, ausgezogene Kurven). Es zeigt sich hier eine beginnende Differenzierung.

Einen Monat später, zu Beginn der Austreibperiode im Frühjahr, wurden die Pflanzen ins Freie gesetzt. Die jüngsten Blattspreiten und -stiele enthielten nun erheblich mehr Coniin als die älteren (Abb. 1, gestrichelte Kurven).

Zur Blütezeit im Juli ist in der nun 14–15 Monate alten Pflanzen-Gruppe der Coniin-Gehalt in Stengel ( $2\%$  der Trockensubstanz) und Wurzel ( $1\%$  der Trockensubstanz) gering. Die Alkaloidmenge in den jüngsten Blattspreiten ist gegenüber den älteren Blättern um das 1,5fache erhöht. In der Blüte wird am meisten Alkaloid gefunden (etwa  $1\%$  d. Trockensubstanz). Der Coniin-Gehalt geht in allen Teilen blühender Pflanzen gleichmäßig zurück, ausgenommen in Blüte und Knospe. Bevor sich die Blüten öffnen, ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Die unreifen Früchte enthalten  $1,2\%$  Coniin-hydrochlorid (Tab. 1).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß ein rascher Anstieg des Alkaloidgehalts in vegetativen Teilen während keiner Wachstumsperiode festzustellen ist. Dagegen ist der Gehalt in den jüngsten, am stärksten wachsenden Geweben am höchsten. Wahrscheinlich befindet sich dort der Ort der Synthese. Für die Injektion von Vorstufen sollten sich daher die jungen, rasch wachsenden Pflanzenteile eignen. Wäßrige Lösungen von vermuteten Vorstufen lassen sich beim Schierling in die hohlen Blattstiele einjähriger Pflanzen injizieren.

Versuche mit Lysin wurden an einer einheitlichen Pflanzengruppe ausgeführt, die im Gewächshaus überwintert und daher nur Blattrossetten und keine Stengel ausgebildet hatte.

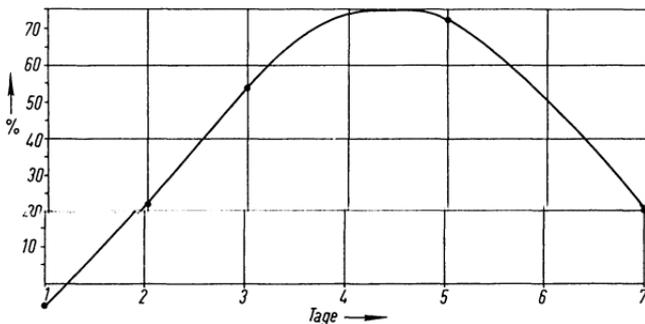


Abb. 2. Prozentuale Zunahme des Coniin-Gehalts junger Blätter nach Lysin-Injektion.

Von der Coniin-Zunahme bei jeder Versuchspflanze wurde die Zunahme bei einer entsprechenden nicht injizierten Kontrollpflanze abgezogen; diese Differenz wurde in Prozent des Anfangs-Coniin-Gehalts bei der Versuchspflanze ausgedrückt.

In alle Blattstiele der Versuchspflanzen wurde pro Pflanze 0,2 ml einer 4,5proz. Lösung von L-Lysin-dihydrochlorid injiziert. Eine weitere Gruppe gleich alter Pflanzen diente als Kontrolle. Die Aufarbeitung von je einer unbehandelten und behandelten Pflanze erfolgte 1–7 Tage nach der Injektion, wobei der Gehalt junger und alter Blätter jeweils getrennt bestimmt wurde.

In Blättern unbehandelter Pflanzen und in alten Blättern injizierter Pflanzen war während der Versuchsdauer kein signifikanter Alkaloid-Anstieg zu beobachten. Allein in den jungen, mit Lysin behandelten Blättern, nahm der Gehalt an Coniin etwa bis zum 5. Tag nach der Injektion zu und fiel danach rasch wieder ab (Abb. 2).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Lysin eine Vorstufe der Coniin-Biogenese ist. Es ist aber auch denkbar, daß der Stoffwechsel durch diese Aminosäure allgemein stimuliert wird, und dadurch der Anstieg des Coniin-Gehaltes zu erklären ist. Um dies auszuschließen, wurden Versuche mit L-Lysin-[ $u\text{-}^{14}\text{C}$ ] (uniform markiert) unternommen.

Sieben Pflanzen (12–13 Monate alt) wurden ins Freie gesetzt. Nach drei Wochen injizierte man in alle Blattstiele (pro Pflanze etwa 7) insgesamt 2,2 mg L-Lysin-[ $u\text{-}^{14}\text{C}$ ]-dihydrochlorid mit einer Gesamtaktivität von  $9,8 \cdot 10^6$  Imp./Min. ( $9,8 \cdot 10^8$  Imp./Min. je mMol). Drei Tage danach wurden die ganzen Pflanzen (ohne Wurzel) getrocknet und auf Coniin aufgearbeitet. Man isolierte 118 mg *racem.* Coniin-hydrochlorid mit einer Gesamtaktivität von  $3,1 \cdot 10^3$  Imp./Min. ( $4,3 \cdot 10^3$  Imp./Min. je mMol bzw. 26 Imp./Min. je mg) = 0,032% der eingesetzten Gesamtaktivität; Schmelzpunkt ( $213,5^\circ$ ) und spezif. Aktivität blieben auch nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton konstant. Die Reinheit des isolierten radioaktiven Coniin-hydrochlorids wurde zusätzlich durch eine Craig-Verteilung<sup>8</sup> im System Butanol-(2)/Wasser sichergestellt<sup>9</sup>.

Die geringe Aktivität des isolierten Coniin-hydrochlorids kann einerseits bedingt sein durch die kurze Versuchsdauer und andererseits durch die starke Verdünnung in den blattreichen Pflanzen, die als Ganzes aufgearbeitet wurden. Um eine höhere spezif. Aktivität und gleichzeitig Hinweise auf die Verteilung des aktiven Coniins in der Pflanze, und damit möglicherweise auf den Ort der Synthese, zu bekommen, wurden bei 20 Gewächshauspflanzen (14 Monate alt) alle Blätter bis auf drei entfernt, so daß jede Pflanze nur aus einem jungen, mittleren und älteren Blatt bestand. In den Stiel des mittleren Blattes jeder Pflanze wurde eine Lösung von Lysin-[ $^{14}\text{C}$ ] injiziert.

Die Pflanzen blieben während des Versuchs im Gewächshaus. Nach 5 Tagen wurde aufgearbeitet, getrennt in Wurzeln, Stiele alter Blätter, Stiele mittlerer Blätter, Spreiten alter Blätter, Spreiten mittlerer Blätter und Spreiten + Stiele junger Blätter.

<sup>8</sup> E. Hecker, Verteilungsverfahren im Laboratorium, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1955.

<sup>9</sup> U. Schiedt u. H. G. Höss, Z. Naturforsch. **13b**, 691 [1958].

Das am höchsten markierte Coniin wurde am Injektionsort gefunden (Tab. 2, Stiel des mittleren Blattes). In den jüngsten Blättern sowie in der Blattspreite des injizierten Stieles fanden sich noch etwa 25 Imp./Min. je mg, während in den Wurzeln und alten Blättern die Aktivität gering war (6—10 Imp./Min. je mg). Diese Versuchsergebnisse weisen auf einen raschen Einbau des Lysins in Coniin am Injektionsort hin. Auch bestätigt sich die bei den Gehaltsbestimmungen aufgestellte Vermutung, daß das Alkaloid in den jungen, wachsenden Geweben, nicht in der Wurzel oder in alten Blättern synthetisiert wird.

Um eine höhere Aktivität des Coniins zu erzielen, wurden aus einer einheitlichen Versuchsgruppe 20 Pflanzen ausgewählt (14 Monate alt). Alle Blätter außer dem jüngsten wurden nach dem Umtopfen entfernt. In die Stiele der Blätter wurde eine Lösung von L-Lysin-[u-<sup>14</sup>C]-dihydrochlorid injiziert. Nach fünftägiger Versuchsdauer im Gewächshaus wurden die Pflanzen aufgearbeitet, getrennt in Wurzel, Blattstiel und Blattspreite.

Durch die Injektion des aktiven Lysins in die noch jüngeren Gewebe, sowie durch das Entfernen der älteren Pflanzenteile, konnte erwartungsgemäß die spezifische Aktivität des Coniins weiter erhöht werden. Aus Tab. 3 geht — neben der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse — deutlich hervor, daß in den jüngsten Teilen der Ort der Synthese liegt, denn der rasche Einbau an der Applikationsstelle tritt noch klarer hervor (Blattstiele: 274 Imp./Min. je mg).

Die physiologische Bedeutung der Alkaloide ist auch heute noch unklar. Bei einer großen Gruppe blühender Schierlingspflanzen wurde in diesem Zusammenhang die interessante Beobachtung gemacht, daß — trotz Nähe eines Bienenstockes — vorwiegend Insekten, die durch Aasgeruch angelockt werden (besonders Fliegen) die Blüte bestäuben. Die zarten Blüten (nicht wie häufig angegeben die ganze Pflanze) riechen deutlich nach Coniin, das einen dem Acetamid ähnlichen Geruch nach Mäuseurin aufweist. Das Coniin könnte zur Anlockung von Aasinsekten dienen und so eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Art spielen.

Herrn Prof. Butenandt möchten wir für das fördernde Interesse an dieser Arbeit herzlich danken. Herrn Dr. Erich Hecker sind wir für die vielen Anregungen und Diskussionen sehr zu Dank verpflichtet.

### Beschreibung der Versuche

**Aufzucht der Schierlingspflanzen:** Man zieht die Pflanzen am besten aus den Samen in Saatkästen und setzt sie nach 4—6 Wochen bei warmer Witterung ins Freie. Dort ist der Schierling anspruchslos und wenig anfällig gegen Schädlinge. Zu Beginn des Winters bedeckt man die Blattrosetten der einjährigen Pflanzen mit Reisig, um Kälteschäden zu vermeiden. Im darauffolgenden Jahr bildet der Schierling einen 2—3 m hohen Stengel und blüht von Anfang Juli bis Mitte September.

Werden die Pflanzen im Gewächshaus gehalten, so treiben sie lange Blattstiele und dünne, dafür aber größere Blattspreiten. Über Winter kann man den Schierling nur unter Schwierigkeiten im Gewächshaus kultivieren. Er benötigt niedrigere Temperaturen (15—17°) und Frischluft. Auch ist für ausreichende Feuchtigkeit zu sorgen. Zentralheizung schädigt die Pflanzen stark und fördert den Schädlingsbefall. Die Pflanzen blühen im 2. Jahr nur, wenn sie im Freien überwintert haben (Kältreiz).

**Aminosäuren in *Conium maculatum* L.:** Sechs Gewächshauspflanzen (6 Monate alt) werden zusammen mit ihren Wurzeln zerkleinert, im Trockenschrank in dünnen Lagen bei 60° getrocknet (20,6 g) und verrieben. Das Pulver wird im Soxhlet-Apparat 6 Stdn. mit 250 ml absol. Petroläther extrahiert, dann mit 200 ml 70proz. Äthanol auf dem Wasserbad erwärmt (4 Stdn.), abfiltriert und nochmals mit 100 ml Äthanol mazeriert. Die vereinigten filtrierten Äthanolösungen werden bei 12 Torr eingedampft. Der Rückstand wird in 100 ml Wasser gelöst und dreimal zur Entfernung des restlichen Chlorophylls mit 20 ml Äther ausgeschüttelt. Von der wäbr. Lösung wird 0,01—0,04 ml auf Papier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) aufgetragen und zweidimensional aufsteigend chromatographiert: 1. System: Pyridin/Butanol-(1)/Wasser 1:1:1, 10 Stdn. Laufzeit; 2. System: Butanol-(2)/88proz. Ameisensäure/Wasser 7,5:1,5:1, 12 Stdn. Laufzeit. Schließlich wird mit 0,05proz. Ninhydrinlösung [wäbr. Butanol-(1)] besprüht und 10 Min. bei 80—100° entwickelt.

**Coniin-Mikrobestimmung:** Je 0,50 g Schierlingsblattpulver (24 Stdn. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet) werden in die Mikrokjeldahlapparatur nach Markham<sup>10</sup> zusammen mit 4 ml Wasser und 2 ml n-Oktanol gebracht. Bei stark schäumenden Pflanzenpulvern ist die Anwendung von 1—2 Tropfen Silikonöl nicht zu umgehen. Nach dem Zusatz von 2 ml 20proz. Natronlauge wird Wasserdampf durchgeleitet, bis 15—25 ml Destillat in die mit 1,0 ml 36proz. Salzsäure besichete Vorlage übergegangen sind. In einem 50-ml-Rundkolben wird das Destillat bei 12 Torr zur Trockene gebracht, die Substanz in Äthanol gesammelt und der Alkohol im Rotationsverdampfer bei 20° und 12 Torr oder über Nacht im Eindampftopf nach Hecker und Karlson<sup>11</sup> bei 40°—50° abgezogen.

Nun gibt man in den Kolben 1,4 ml 40proz. Formaldehyd-Lösung und 2 ml Wasser, schwenkt gut um, damit sich die Substanzen lösen können, stellt einen Glasfuß in jeden Kolben und verschließt leicht mit einem gefetteten Schließstopfen. Nach 3—5 Min. werden 2,8 ml 10proz. Natronlauge zugefügt und ein 5-ml-Weithals-Erlenmeyer-Kolben, der mit 1,0 ml 0,02*n* HCl besichet ist, auf den Glasfuß gestellt. Nach kurzem Umschwenken kann fest verschlossen werden. Die Kolben werden in einen 60° warmen Trockenschrank gestellt. Nach 6,5 Stdn. wird die verbrauchte Säure mit 0,02*n* NaOH bestimmt (Methylrot als Indikator, titriert auf reines Gelb; 1,0 ml 0,02*n* HCl entsprechen 3,274 mg Coniin-hydrochlorid oder 2,544 mg Coniin-Base). Bei 12 Stdn. Versuchsdauer kann der Gesamtbasengehalt bestimmt werden (Abb. 3). Erst nach etwa 30 Stdn. wird Ammoniak frei. Diese Methode läßt sich ab 300  $\gamma$  Coniin-hydrochlorid durchführen. Der mittlere Fehler der Einzelmessung beträgt 5%.

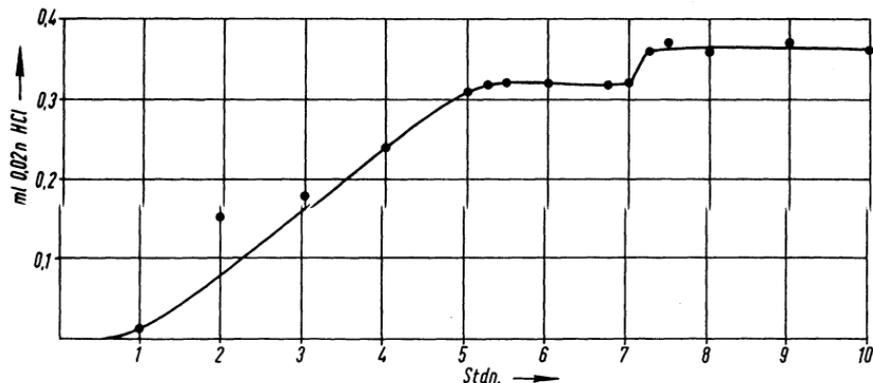


Abb. 3. Flüchtigkeitskurve der Basen eines Schierlingsblattpulvers.

<sup>10</sup> R. Markham, *Biochem. J.* **36**, 790 [1942].

<sup>11</sup> E. Hecker u. P. Karlson, *Chemie-Ing.-Techn.* **25**, 397 [1953].

Gehaltsbestimmungen an Schierlingspflanzen während der Vegetations-Periode: Von einer Reihe gleich großer Pflanzen (11—12 Monate alt) werden jeweils die gleichaltrigen Blätter gesammelt. Dies ergibt 4 Gruppen von Blättern verschiedener Altersstufen, die getrocknet und danach in Blattstiel und -spreite getrennt werden. Auch die Wurzeln werden vereinigt und getrocknet. In 0,50 g Trockenpulver von Stielen, Spreiten und Wurzeln wird der Coniingehalt mit der Mikromethode bestimmt. Die Ergebnisse sind als ausgezogene Kurven in Abb. 1 zusammengefaßt.

Von der oben beschriebenen Pflanzengruppe werden willkürlich 6 Schierlinge (12—13 Monate alt) ausgewählt und ins Freie gepflanzt. Nach drei Wochen werden die gleichaltrigen Blätter und die Wurzeln gesammelt und jeweils getrennt getrocknet. Danach wird wie oben in Blattstiele, Spreiten und Wurzeln aufgeteilt und in jeweils 0,50 g Trockenpulver der Coniingehalt mit der Mikromethode bestimmt (Ergebnisse Abb. 1, gestrichelte Kurven).

Von zwei ausgewachsenen, im Freien stehenden Gruppen zu je 4 Pflanzen (14—15 Monate alt) tragen die einen nur Knospen, während die anderen Knospen und Blüten nebeneinander aufweisen. Es werden eine Anzahl gleichaltriger und sich entsprechender Pflanzenteile in beiden Gruppen gesammelt und getrennt getrocknet. In 0,1—0,5 g Trockenpulver wird der Coniingehalt nach der Mikromethode ermittelt (Tab. 1).

Tab. 1. Coniin-hydrochlorid-Gehalt verschiedener Pflanzenteile von blühenden und von knospenden Schierlingen.

Pflanzen- teil	Einwaage, Trockensubstanz [mg]		Verbrauch an 0,02 <i>n</i> HCl [ml]		Coniin-Gehalt-HCl der Trockensubstanz [‰]	
	blüh.	knosp.	blüh.	knosp.	blüh.	knosp.
Frucht unreif . . .	0,10	—	0,37	—	12,1	—
Blüte . . . . .	0,10	—	0,32	—	10,5	—
Knospe . . . . .	0,15	0,15	0,27	0,27	5,9	5,9
junge Blätter . . .	0,15	0,15	0,24	0,29	5,2	6,3
junge Stiele . . . .	0,20	0,25	0,18	0,34	3,0	4,4
mittlere Blätter . .	0,20	0,20	0,25	0,31	4,1	5,1
mittlere Stiele . .	0,20	0,20	0,20	0,25	3,3	4,1
alte Blätter . . . .	0,20	0,20	0,26	0,30	4,2	4,9
alte Stiele . . . . .	0,25	0,20	0,20	0,21	2,6	3,4
Stengel oben . . . .	0,30	0,25	0,14	0,15	1,5	2,0
Stengel Mitte . . . .	0,25	0,25	0,09	0,12	1,2	1,6
Stengel unten . . . .	0,25	0,25	0,12	0,15	1,6	2,0
Wurzel . . . . .	0,40	0,40	0,09	0,12	0,7	1,0

Fütterungsversuch mit *L*-Lysin-dihydrochlorid: 10 Pflanzen (12 Monate alt) mit je 7 Blättern werden im Frühjahr ins Freie gesetzt. Zu Beginn des Austreibens eines Stengels wird der Gehalt junger (max. 8 Tage) und alter (mind. 9 Tage) Blätter nach der Mikromethode bestimmt. Diese Ergebnisse werden als Nullpunkt des Coniingehalts junger und alter Blätter bezeichnet.

Als erster Tag eines Blattes gilt definitionsmäßig der Tag, an dem aus der Scheide eines alten Stiels das junge Blatt vollständig heraustritt. Es wird mit einem farbigen Faden markiert.

Fünf Pflanzen dienen als Kontrolle für die Zunahme des Coniin-Gehalts während der Versuchsdauer, und fünf sind die Versuchsobjekte. In sämtliche Stiele der Versuchspflanzen wird insgesamt 0,2 ml einer Lösung injiziert, die in 1 ml 45 mg *L*-Lysin-dihydrochlorid und 34,5 mg Natriumhydrogencarbonat enthält.

Injiziert wird mit einer Vollglasspritze (Präc.-Tub.-Glasspritze), eingeteilt in  $\frac{1}{100}$  ml und V2A-Kanülen, 10—15 cm lang, 0,6 mm Durchmesser, von der Basis der Blattspreite zur Stielbasis.

Nach der Injektion wachsen die Pflanzen im Freien bei einer Tagestemperatur von  $20^{\circ}$ — $27^{\circ}$ ; nachts tritt Abkühlung auf  $6^{\circ}$ — $10^{\circ}$  ein.

Die jungen und alten Blätter je einer unbehandelten und behandelten Pflanze werden nach 1, 2, 3, 5 und 7 Tagen geerntet und getrennt getrocknet. In 0,25 g Trockenpulver wird der Coniingehalt alter und junger Blätter nach der Mikromethode bestimmt (vgl. Abb. 2).

Quantitative Isolierung von Coniin aus Pflanzenmaterial: Die Pflanzen werden bei  $60^{\circ}$  getrocknet, danach in der Reibschale grob gepulvert und im Exsikkator 24 Stdn. über  $P_2O_5$  getrocknet. 20,0 g Pflanzenpulver werden in 125 ml Wasser eingetragen. Nach 1 Stde. werden 10 ml n-Okтанol und 5 g Kaliumcarbonat zugegeben. Man leitet sofort Wasserdampf durch das Gemisch, bis in die mit 3 ml 36proz. Salzsäure beschickte Vorlage etwa 250—300 ml Wasser übergegangen sind. Aus dem Destillat entfernt man mit zweimal 20 ml Petroläther das n-Okтанol, wäscht den Petroläther mit zweimal 5 ml Wasser und dampft die vereinigten wäbr. Phasen bei Wasserstrahlvakuum zur Trockene ein. Die bei der Destillation im Kolben verspritzte Substanz wird in Äthanol gelöst und der Alkohol im Rotationsverdampfer bei  $20^{\circ}$  abgezogen. Nach scharfem Trocknen über  $P_2O_5$  und Kaliumhydroxyd wird die Substanz durch kräftiges Schütteln mit absol. Chloroform (insgesamt 100 ml) extrahiert. Von ungelösten Ammoniumsalzen wird durch eine Glasfritte abgesaugt. Der im Rotationsverdampfer zur Trockene gebrachte Chloroformextrakt wird aus Aceton umkristallisiert und die Mutterlauge aufgearbeitet.

Injektionsversuche mit L-Lysin-[ $u-^{14}C$ ]: Sieben Pflanzen (12—13 Monate alt) werden ins Freie gesetzt. Kurz vor Bildung eines Stengels wird in sämtliche Blattstiele (etwa 7 pro Pflanze) insgesamt 2,2 mg L-Lysin-[ $u-^{14}C$ ] · 2 HCl mit einer Gesamtaktivität von  $9,8 \cdot 10^6$  Imp./Min. (spezif. Aktivität  $9,8 \cdot 10^8$  Imp./Min. je mMol) injiziert. Beim Injizieren wird die Nadel von der Basis des Stieles zur Blattspreite geführt. Die Pflanzen bleiben während der Versuche im Freien. Nach drei Tagen wird, wie oben beschrieben, aufgearbeitet.

Die spezif. Aktivitäten des Coniin-hydrochlorids betragen nach dem Umkristallisieren aus Aceton:

1. Umkristallisieren  $4,4 \cdot 10^3$  Imp./Min. je mMol
2. Umkristallisieren  $4,1 \cdot 10^3$  Imp./Min. je mMol
3. Umkristallisieren  $4,4 \cdot 10^3$  Imp./Min. je mMol

Zwanzig 14 Monate alte Schierlingspflanzen werden so zugeschnitten, daß sie aus je drei Blättern bestehen: Ein jüngstes (2—4 cm Stiellänge), ein mittleres (12—14 cm Stiellänge) und ein älteres (18—20 cm Stiellänge).

Die Pflanzen werden zwei Tage vor Versuchsbeginn in größere Töpfe umgesetzt. In die Stiele der mittleren Blätter werden bei 20 Pflanzen im Gewächshaus insgesamt 0,5 ml einer Lösung injiziert, die 2,2 mg L-Lysin-[ $u-^{14}C$ ]-dihydrochlorid mit einer Gesamtaktivität von  $10,2 \cdot 10^6$  Imp./Min. oder spezif. Aktivität  $10,2 \cdot 10^8$  Imp./Min. je mMol enthält.

Während der fünftägigen Versuchsdauer herrschte warmes sommerliches Wetter. Die Temperaturen im gelüfteten und beschatteten Gewächshaus betragen am Tag 25— $35^{\circ}$ , in der Nacht  $20^{\circ}$ .

Die Aufarbeitung erfolgt nach der Trennung in alte, mittlere, junge Blattspreiten, deren Stiele und die Wurzeln, wie oben angegeben (Tab. 2).

Bei zwanzig Pflanzen (14 Monate alt) werden alle Blätter bis auf das jüngste entfernt (Stiellänge 8 cm). 0,5 ml einer Lösung, die 2,2 mg L-Lysin-[ $u-^{14}C$ ]-dihydrochlorid mit einer Gesamtaktivität von  $10,2 \cdot 10^6$  Imp./Min. oder spezif. Aktivität  $10,2 \cdot 10^8$  Imp./Min. je mMol enthält, werden in die Stiele injiziert.

Der kleine Durchmesser der jungen Stiele macht eine Injektion von der Basis der Blattspreite zur Stielbasis notwendig.

Der Versuch läuft 5 Tage im Gewächshaus unter gleichen Bedingungen wie oben. Bei der Aufarbeitung wird in Wurzeln, Stiele und Blätter getrennt (Tab. 3).

Tab. 2. Meßergebnisse nach Injektion von insgesamt 2,2 mg Lysin-[u-<sup>14</sup>C]-di-hydrochlorid mit einer Gesamtaktivität von  $10,2 \cdot 10^6$  Imp./Min. in zwanzig 14 Monate alte Schierlingspflanzen mit je 3 Blättern (Versuchsdauer 5 Tage).

	Trocken- Gew. [g]	isoliertes Coniin·HCl [mg]	spezif. Akt.		tot. Akt. Imp./Min.	% d. inges. tot. Akt.
			Imp./Min. mg	Imp./Min. mMol		
junges Blatt, Stiel+Spreite	4,8	33,0	23	$3,8 \cdot 10^3$	760	0,0075
Stiel des mittl. Blattes	3,45	6,7	124	$2,0 \cdot 10^4$	831	0,0082
Spreite des mittl. Blattes	5,8	22,6	25	$4,1 \cdot 10^3$	567	0,0056
Stiel des alten Blattes	4,05	9,5	6	$3,7 \cdot 10^2$	57	0,0006
Spreite des alten Blattes	5,8	18,4	6	$3,7 \cdot 10^2$	111	0,001
Wurzel	21,8	18,9	10	$1,6 \cdot 10^3$	189	0,0018

Isoliert 2515  $\frac{\text{Imp./Min.}}{109 \text{ mg}} = 23 \frac{\text{Imp./Min.}}{\text{mg}} = 0,026\%$  der eingesetzten totalen Aktivität.

Tab. 3. Meßergebnisse nach Injektion von insgesamt 2,2 mg Lysin-[u-<sup>14</sup>C]-di-hydrochlorid mit einer Gesamtaktivität von  $10,2 \cdot 10^6$  Imp./Min. in zwanzig 14 Monate alte Schierlingspflanzen mit je einem Blatt (Versuchsdauer 5 Tage).

	Trocken- Gew. [g]	isoliertes Coniin·HCl [mg]	spezif. Akt.		tot. Akt. Imp./Min.	% d. inges. tot. Akt.
			Imp./Min. mg	Imp./Min. mMol		
Wurzel . . .	27,0	20,7	6	$3,7 \cdot 10^2$	124	0,0012
Blattstiel . . .	1,2	2,0	274	$4,5 \cdot 10^4$	548	0,0054
Blattspreite .	4,7	26,8	80	$1,3 \cdot 10^4$	2140	0,020

Isoliert 2810  $\frac{\text{Imp./Min.}}{50 \text{ mg}} = 56 \frac{\text{Imp./Min.}}{\text{mg}} = 0,028\%$  der eingesetzten totalen Aktivität. Coniin-hydrochlorid v. Stiel u. Spreite =  $2688 \frac{\text{Imp./Min.}}{28,8 \text{ mg}} = 93 \frac{\text{Imp./Min.}}{\text{mg}} = 0,026\%$ .

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Verfahren zur präparativen Isolierung von Coniin aus Pflanzenmaterial beschrieben. Die daraus entwickelten quantitativen Bestimmungsmethoden für Coniin erlauben, den Alkaloidgehalt in 0,1–10 g (Mikromethode) und in 10 bis 100 g (Makromethode) Schierlingstrockenpulver titrimetrisch bzw. gravimetrisch zu ermitteln.

Mit Hilfe dieser Bestimmungsmethoden wird der Coniingehalt des Schierlings während der Wachstumsperiode untersucht.

Der Gehalt an Aminosäuren in *Conium maculatum* wird qualitativ ermittelt und gezeigt, daß neben Alanin, Serin, Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valin, Leucin und Phenylalanin auch Lysin und Pipercolinsäure vorkommen.

Die Applikation von uniform markiertem Lysin-[ $^{14}\text{C}$ ] in verschiedenen große Pflanzen ergibt radioaktives Coniin. An der Injektionsstelle und in den jungen wachsenden Geweben weist das isolierte Coniin die höchste spezifische Aktivität auf. Dies deutet auf einen raschen Einbau des Lysins in Coniin in wachsendem Gewebe hin. Lysin ist eine Vorstufe des Piperidinrings des Coniins.

### Summary

New procedures are described for the preparative isolation and the quantitative estimation of coniine from plant material. The coniine content of 0.1–10 g. (micromethod) or 10–100 g. (macromethod) of dry hemlock powder can be determined titrimetrically or gravimetrically.

The coniine content of hemlock was studied over the growth period, using this method.

The amino acid content of *Conium maculatum* was studied qualitatively. Lysine and pipercolic acid were found, together with alanine, serine, glycine, glutamic acid, aspartic acid, valine, leucine and phenylalanine.

Injection of generally labelled [ $^{14}\text{C}$ ]lysine into plants of different size gave radioactive coniine. The coniine of highest specific activity was isolated from the site of injection and the young, growing tissues. This indicates a rapid incorporation of lysine into coniine in growing tissues. Lysine is a precursor of the piperidine ring of coniine.

Privat-Dozent Dr. Erich Hecker, Max-Planck-Institut für Biochemie, 8 München 15, Goethestraße 31.