

and was identified as dihydrovelutinic acid (2); MS, *m/e* (rel. int.): 474 (M⁺, 16.7), 305 (21.7), 275 (17.2) and 207 (34).

Acetylation of dihydrovelutinic acid (2). Dihydrovelutinic acid (2) was treated with Ac₂O-Py (1:1) at room temp. for 12 hr to afford acetyl dihydrovelutinic acid (5); PMR (CDCl₃): δ 0.83 (3H, *d*, *J* = 6 Hz), 0.90 (3H, *s*), 0.95 (6H, *s*), 1.08 (3H, *s*), 1.16 (3H, *s*), 1.21 (3H, *s*), 2.00 (3H, *s*, —OAc) 2.02 (3H, *s*, —OAc), and 4.86 (2H, *m*).

Methylation of acetyl dihydrovelutinic acid (5). Acetyl dihydrovelutinic acid (5) was treated with CH₂N₂ in Et₂O at room temp. overnight to afford acetyl methyl dihydrovelutinate (6); PMR (CDCl₃): δ 0.80 (3H, *d*), 0.92 (3H, *s*), 0.95 (6H, *s*), 1.07 (3H, *s*), 1.15 (3H, *s*), 1.20 (3H, *s*), 1.99 (3H, *s*, —OAc), 2.02 (3H, *s*, —OAc), 3.77 (3H, *s*, —OMe), 4.36 (1H, *s*, *J* = 12 and 3 Hz, H-16) and 4.76 (1H, *m*, H-3).

Acknowledgements—The authors would like to thank Drs R. E. Perdue, Jr., of the Medicinal Plant Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, funded by the NCI, for the provision and identification of the plant materials, B. Weinstein, Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, Washington, for a sample of velutin, and H. Oshio of Takeda Chemical

Industries, Osaka, Japan, for a sample of genkwanin. The plant material used in this study was supplied under contract NO1 CM-22078 with the Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute, Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, MD.

REFERENCES

1. Index Kewensis. (1886–1965) Supplement Vol. II and Supplements I–XIV. Clarendon Press, Oxford.
2. Fukui, Y. (1954) *Yakugaku Zasshi* **74**, 735.
3. Norton, T. R., Bristol, M. R., Read, G. W., Bushnell, O. A., Kashiwagi, M., Okinaga, C. M. and Oda, C. S. (1973) *J. Pharm. Sci.* **62**, 1077.
4. Nicolls, J. M. (1970) *Ann. Botany* **34**, 229.
5. Budzikiewicz, H., Wilson, J. M. and Djerassi, C. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3688.
6. Courtney, J. L. and Shannon, J. S. (1963) *Tetrahedron Letters* 13.
7. Samson, A. S., Stevenson, S. J. and Stevenson, R. (1968) *J. Chem. Soc. Sect. C* 2342.
8. Sengupta, P., Chakraborty, A. K., Duffield, A. M., Durham, L. J. and Djerassi, C. (1968) *Tetrahedron* **24**, 1005.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1445–1448. Pergamon Press. Printed in England.

MISE EN ÉVIDENCE DE DEUX TYPES CHIMIQUES CHEZ LE *CANNABIS SATIVA* ORIGINAIRES D'AFRIQUE DU SUD

FRANÇOISE BOUCHER*, MICHEL PARIS† et LOUIS COSSON‡

*Laboratoire de Matière Médicale, Centre d'Etudes Pharmaceutiques, Université Paris-Sud, 92290-Chatenay-Malabry et Laboratoire du Phytotron, CNRS 91190-Gif-sur-Yvette, France; †Laboratoire de Matière Médicale, Centre d'Etudes Pharmaceutiques, Université Paris-Sud, 92290-Chatenay-Malabry; ‡Laboratoire du Phytotron, CNRS, 91190-Gif-sur-Yvette et Laboratoire de Physiologie Végétale, UER 59, Université Paris VII, France

(Revised received 24 December 1976)

Key Word Index—*Cannabis sativa*; Cannabinaceae; geographic origin; chemotype; cannabinoids; tetrahydrocannabinolic acid; tetrahydrocannabivarolic acid; environmental conditions.

Abstract—Culture in a phytotron of *Cannabis sativa* L. originating from S. Africa revealed the presence of two chemotypes varying in concentration of tetrahydrocannabinolic and tetrahydrocannabivarolic acids. We ascribe this to the genetic heterogeneity of the seeds.

INTRODUCTION

Selon l'aire de répartition géographique du *Cannabis sativa* L., on a coutume de distinguer le Chanvre à résine de régions chaudes et sèches et le Chanvre à fibre des zones tempérées. Cette distinction se retrouve au niveau de la composition chimique des plantes: le tétrahydrocannabinol [1] et son précurseur l'acide tétrahydrocannabinolique caractérisant le Chanvre à résine tandis que les constituants majeurs du Chanvre textile sont le cannabidiol et l'acide cannabidiolique [2,3]. Chez le *Cannabis sativa* L. originaire d'Afrique du Sud, les cannabinoides principaux sont le tétrahydrocannabinol et son précurseur; on note l'absence de cannabidiol [4]. De plus, nous avons déjà indiqué l'importance des

composés propyliques [5] homologues du tétrahydrocannabinol et de son acide [6] chez ce Chanvre.

Il nous a paru intéressant d'approfondir l'étude du Chanvre originaire d'Afrique de Sud. Dans ce but, nous avons entrepris de le cultiver dans les salles conditionnées du Phytotron du CNRS de Gif/Yvette selon les techniques déjà utilisées [7]. Nous écartons ainsi tout risque de fertilisation croisée et donc l'hybridation qui ne manque pas de se produire lors des cultures en plein champ de Chanvre de diverses origines [8,9]. Nous avons pu suivre, avec précision, les caractères morphologiques, physiologiques et chimiques des plantes cultivées, pendant trois générations, dans les deux conditions climatiques déjà retenues [7] à savoir: 32° le jour et 12° la nuit d'une part et 22° le jour et 12° la nuit d'autre part.

RESULTATS

Analyse chimique qualitative

Les données de la chromatographie sur couche mince confrontées à celles de la chromatographie en phase gazeuse ont révélé la présence constante de l'acide tétrahydrocannabinolique (ATHC-C₅), du tétrahydrocannabinol (THC-C₅) de l'acide tétrahydrocannabivarolique (ATHC-C₃) et du tétrahydrocannabivarol (THC-C₃) ainsi que celle des acides cannabichroméniques et cannabigéroliques et de leurs dérivés décarboxylés. Nous n'avons pas détecté d'acide cannabidiolique (ABCD-C₅) ou de cannabidiol (CBD-C₅). Il faut noter que dans le matériel végétal frais analysé, les cannabinoïdes sont présents principalement sous leur forme acide, la décarboxylation se produisant pendant le séchage de la plante [11]. La même composition chimique qualitative a été retrouvée chez toutes les plantes quelle que soit l'alternance climatique considérée, la génération des plantes et le sexe de la sommité analysée.

Analyse quantitative

Nous avons dosé les cannabinoïdes majeurs des sommités fleuries des plantes: (ATHC-C₅ + THC-C₅) d'une part (ATHC-C₃ + THC-C₃) d'autre part. Dans un même lot de plantes en expérience nous avons enregistré des différences quantitatives importantes d'une plante à une autre selon l'importance relative des deux principaux groupes de cannabinoïdes. Ces variations individuelles vont même jusqu'à l'inversion du rapport ATHC-C₅/ATHC-C₃. Nous sommes ainsi amenés à considérer des plantes soit ATHC-C₅ dominant, soit ATHC-C₃ dominant. Les individus ATHC-C₅ dominant existent constamment en plus grand nombre à la première et à la deuxième génération. En troisième génération toutes les plantes sont ATHC-C₅ dominant.

Nous avons suivi l'évolution des teneurs en cannabinoïdes des plantes en fonction des générations et sous les deux conditions climatiques. Les résultats sont consignés dans le Tableau 1. Une analyse statistique montre qu'il n'apparaît pas de différence significative entre les générations et selon les conditions puisque, suivant les séries expérimentales considérées, nous relevons en 32-12° des teneurs en cannabinoïdes supérieures à celles enregistrées en 22-12°, et inversement.

DISCUSSION

L'analyse individuelle de chacune des plantes en expérience a révélé la présence de deux types chimiques de plantes au sein d'une population de *Cannabis* d'origine géographique déterminée et cultivée dans les conditions rigoureuses réalisées en Phytotron. Chaque génération est issue du lot de graines récoltées sur les plantes de la génération précédente. Nous attribuons cette observation à l'hétérogénéité génétique des graines, en opposition aux conclusions d'autres auteurs relatives à différentes populations de *Cannabis* [12].

Au cours de la culture de trois générations successives de plantes, il s'est opéré une 'sélection naturelle' puisqu'à la première et à la deuxième génération nous disposons des deux types de plantes ATHC-C₅ dominant et ATHC-C₃ dominant, tandis qu'à la troisième génération toutes les plantes sont ATHC-C₅ dominant. Divers facteurs peuvent entrer en jeu: les conditions externes, la plus

grande fécondité ou la germination plus aisée de l'un des types etc. . . Dans les conditions de l'expérience, nous n'avons pas été en mesure de corrélér la morphologie des plantes à leur composition chimique propre.

Face à l'existence de ces deux types chimiques, nous avons réalisé des essais de multiplication végétative du Chanvre [11] non encore signalée dans la littérature à notre connaissance. Nous avons pu ainsi disposer de clones qui conservent les caractères des plantes-mères dont ils sont issus et qui nous permettent de montrer la stabilité de ces deux types chimiques (résultats non publiés).

Les premiers dosages indiquent un homogénéité satisfaisante des teneurs en cannabinoïdes des plantes tant pour le clone ATHC-C₅ dominant que pour son homologue propylque (Tableau 2). Sur chacun des clones représentatifs des deux types chimiques mis en évidence, il sera possible d'étudier l'influence des facteurs de l'environnement. Nous pourrons suivre, de façon précise l'évolution des clones obtenus par multiplications végétatives successives et maintenus dans les deux conditions climatiques choisies.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les graines de *Cannabis sativa* L., originaire d'Afrique du Sud, sont fournies par le Laboratoire de la Division des Stupéfiants des Nations Unies à Genève; elles sont notées 'UNC 255'. Pour la deuxième et la troisième génération on utilise les graines récoltées au Phytotron. Les plantes sont obtenues à partir de semis effectués dans la vermiculite selon la technique déjà décrite [7]. Elles sont cultivées, en Phytotron et comparativement, dans deux conditions climatiques: 32° le jour et 22° la nuit d'une part, 22° le jour et 12° la nuit d'autre part; l'éclairage quotidien est de 16 hr, l'humidité relative de 70%. A un stade déterminé de leur développement (7 paires de feuilles) les plantes subissent un passage de 2 semaines en jours courts de 9 hr pour induire la floraison.

On prélève les sommités (1/5 de la hauteur de la plante) des plantes fleuries âgées d'environ 80 et 100 jours depuis leur semis, pour les plantes mâles et femelles, respectivement. L'extraction consiste en une stabilisation extractive par MeOH à l'ébullition suivie d'une évaporation et d'une reprise de l'extrait par de petites quantités répétées du mélange hexane-C₆H₆ (1:4).

L'analyse qualitative est effectuée par CCM de silice, dans hexane-dioxane (4:1) le révélateur est le Bleu Solide B en solution dans NaOH. Cette méthode permet une bonne séparation des cannabinoïdes sous leur forme acide. Après décarboxylation de l'extrait par chauffage au bain marie à 80° pendant 1 hr, le développement de la CCM de silice se fait dans hexane-Et₂O (4:1) spécifique des cannabinoïdes neutres. Le tétrahydrocannabinol (THC-C₅) et son acide (ATHC-C₅) d'une part, le tétrahydrocannabivarol (THC-C₃) et son acide (ATHC-C₃) d'autre part sont dosés par CPG, l'étalon interne étant le 4 androstène 3-17 dione en solution dans EtOH. L'appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne de verre de 2,40 m de long d'un diamètre de 1/8" de pouce renfermant 3% de OV 17 sur varaport 80-100 mesh. Le gaz vecteur est N₂ (débit 25 ml/mm); les températures sont de 240° pour la colonne, 260° pour l'injecteur et le détecteur. L'on se réfère à une gamme étalon de THC-C₅. Technique de bouturage. Les clones sont obtenus par bouturage des sommités fleuries des rameaux axillaires des plantes-mères. L'enracinement des boutures a lieu dans des terrines, le substrat est composé de laine de verre et de vermiculite. Le repiquage a lieu environ 30 jours après le bouturage dans les conditions déjà indiquées [11].

Remerciements—Ce travail fait partie d'un ensemble de recherches bénéficiant d'une aide de l'Inserm.

Tableau 1. Teneurs en cannabinoïdes du *Cannabis sativa* L., au cours des trois générations, dans les deux conditions climatiques

Teneurs en cannabinoïdes	Conditions climatiques				
	32-12°	32-12°	22-12°	22-12°	
	sommités mâles	sommités femelles	sommités mâles	sommités femelles	
ATHC-C ₅ dominant	n C ₅ C ₃ T R	6 1,40 ± 0,48 0,48 ± 0,26 1,88 ± 0,71 3,29 ± 1,18	5 2,81 ± 1,55 0,80 ± 0,58 3,61 ± 1,69 6,58 ± 5,84	6 1,59 ± 0,64 0,19 ± 0,16 1,78 ± 0,75 12,08 ± 7,69	6 2,57 ± 1,30 0,41 ± 0,31 2,98 ± 1,61 7,27 ± 2,02
	UNC 255 1G	n C ₅ C ₃ T R	3 0,42 ± 0,40 1,46 ± 0,79 1,88 ± 1,18 0,24 ± 0,13	4 0,33 ± 0,12 1,64 ± 0,53 1,97 ± 0,63 0,20 ± 0,04	3 0,54 ± 0,10 1,58 ± 0,12 2,12 ± 0,15 0,34 ± 0,19
	ATHC-C ₅ dominant	n C ₅ C ₃ T R	6 1,85 ± 0,27 0,44 ± 0,31 2,29 ± 0,57 8,51 ± 12	3 2,09 ± 0,27 0,75 ± 0,24 2,84 ± 0,51 2,95 ± 0,81	5 3,29 ± 0,93 0,31 ± 0,01 3,42 ± 0,90 9,82 ± 0,69
	UNC 255 2G	n C ₅ C ₃ T R	3 0,60 ± 0,26 2,34 ± 0,78 2,94 ± 0,97 0,25 ± 0,07	1 1,94 2,80 4,74 0,69	1 0,48 1,25 1,73 0,38
ATHC-C ₅ dominant	n C ₅ C ₃ T R	6 2,03 ± 0,39 0,51 ± 0,08 2,29 ± 0,36 3,53 ± 0,52	6 2,25 ± 0,61 0,59 ± 0,19 2,74 ± 0,44 3,83 ± 1,66	6 2,94 ± 0,91 0,26 ± 0,01 3,07 ± 0,82 9,14 ± 0,53	6 3,25 ± 0,51 0,42 ± 0,64 3,46 ± 0,50 39,60 ± 32,21
	UNC 255 3G	n C ₅ C ₃ T R	6 0,51 0,51 0,51 0,51	6 0,51 0,51 0,51 0,51	6 0,51 0,51 0,51 0,51

n = nombre d'individus, C₅ = ATHC-C₅ + THC-C₅, T = C₅ + C₃, C₃ = ATHC-C₃ + THC-C₃, R = C₅/C₃.
L'erreur standard de chaque moyenne est indiquée.

REFERENCES

1. Gaoni, Y. et Mechoulam, R. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646.
2. Fairbairn, J. W. et Rowan, M. G. (1975) *J. Pharm. Pharmacol.*
3. Krejci, Z., Horak, M. et Santavy, F. (1958) *Acta Univ. Palackianae Olomuc.* **16**, 9.
4. Turner, C. E. et Hadley, C. (1973) *J. Pharm. Sci.* **62**, 251.

Tableau 2. Teneurs en cannabinoïdes des plantes de *Cannabis sativa* L. obtenues par multiplication végétative (exprimées en g p. 100 de matière sèche)

Clones	Conditions climatiques							
	32-12°				22-12°			
	Clone A	Clone B	Clone C	Clone D				
Teneurs en cannabinoïdes	THC-C ₅	THC-C ₃	THC-C ₅	THC-C ₃	THC-C ₅	THC-C ₃	THC-C ₅	THC-C ₃
Plante 1	1,44	0,17	0,29	1,48	2,94	0,58	2,53	0,60
Plante 2	1,74	0,22	0,35	1,68	2,42	0,78	2,21	0,55
Plante 3	1,50	0,18	0,35	1,60	2,64	0,68	2,75	0,77
Plante 4	1,54	0,18	0,40	1,52				
Plante 5	1,62	0,22	0,33	1,76				
m	1,56 ± 0,11	0,19 ± 0,03	0,34 ± 0,04	1,60 ± 0,11	2,67 ± 0,26	0,68 ± 0,10	2,50 ± 0,27	0,64 ± 0,12

m = moyenne.
L'erreur standard de chaque moyenne est indiquée.

5. Paris, M., Boucher, F. et Cosson, L. (1975) *Pl. Med. et Phytoth.* **IX**, 136.
6. Paris, M., Ghirlanda, C., Chaigneau, M. et Giry, L. (1973) *C.R.Ac.Sc. Paris* **276**, 205.
7. Boucher, F. (1972) *Mémoire du DEPS de Chimie des Médicaments naturels*. Paris.
8. Doorenbos, N. J., Fetterman, P. S., Quimby, M. W. et Turner, C. E. (1971) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **191**, 3.
9. Small, E., Beckstead, H. et Chan, A. (1975) *Economic Botany* **29**, 219.
10. Bassaz, F. A., Dusek, D., Seigler, M. S. et Haney, A. W. (1975) *Biochem. Systemat. Ecol.* **3**, 15.
11. Boucher, F. (1976) *Mémoire de D.E.A. de Physiologie Végétale Approfondie*. Paris.
12. Haney, A. et Kitscheid, B. B. (1973) *Econ. Botany* **27**, 193.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1448-1450. Pergamon Press. Printed in England.

TWO NEW 4α -METHYLSTEROLS IN THE SEEDS OF *BRASSICA NAPUS*

T. ITOH, K. UCHIKAWA, T. TAMURA and T. MATSUMOTO

College of Science and Technology, Nihon University, 8, Kanda Surugadai, 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 101 Japan

(Received 31 March 1977)

Key Word Index—*Brassica napus*; Cruciferae; 4α -methylsterols; $4\alpha,14\alpha,24$ -trimethylcholesta-8,24-dien- 3β -ol; $4\alpha,14\alpha,24$ -trimethyl- $9\beta,19$ -cyclocholest-24-en- 3β -ol; seeds.

Our previous paper described the occurrence of 24-methylenolanost-8-en- 3β -ol in the 4,4-dimethylsterol fraction from the seeds of *Brassica napus* [1]. We now report the detection and tentative identification of two new sterols in the 4-monomethylsterol fraction separated from the seeds. 4α -Methylsterols hitherto found in the 4-monomethylsterol fraction from the Cruciferous seeds are 31-norlanostenol and/or 4α -methylzymostenol [2], lophenol [3], 31-norlanosterol [2], obtusifolol [2, 4], gramisterol (24-methylenolophenol) [2, 4] and citrostadienol [2, 4, 5].

The 4-monomethylsterol fraction separated from the unsaponifiable matter of the seeds of *B. napus* [1] was acetylated with Ac_2O -Py. The acetate fraction (108 mg) obtained was separated into six bands by PLC on AgNO_3 -Si gel (1:4) with two developments using $\text{CCl}_4\text{-CH}_2\text{Cl}_2$ (5:1). The fraction (3 mg) recovered from the second band (R_f , 0.47) from the solvent front gave two peaks on GLC. GC-MS of the faster eluted major component (A, 68%) showed that it was an acetate of a C_{30} sterol with two double bonds (m/e 468, M^+ , $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$) of which one was present in the side chain (m/e 341, $\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{17}[\text{SC}] - 2\text{H}$). The fragment ions at m/e 301 ($\text{M}^+ - \text{SC} - \text{C}_3\text{H}_6$)

and 287 (m/e 301 - CH_2) indicated the presence of an additional C_{32} methyl group in the ring system. Furthermore, the fragment ions at m/e 384 ($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_{12}$) and 369 (m/e 384 - Me) showed that the side chain double bond was located either at C-24(28) or at C-24(25) [6]. The RR of the steryl acetate was 1.82 (SE-30), 1.74 (Dexsil-300), 1.76 (OV-17) and 1.79 (OV-210). Since the data from MS, GLC and argentation TLC were identical with those of authentic $4\alpha,14\alpha,24$ -trimethyl- 5α -cholesta-8,24-dien- 3β -yl acetate (**1b**, $\text{R}' = \text{Ac}$) prepared from obtusifolyl acetate (**1a**, $\text{R}' = \text{Ac}$), the steryl acetate A is considered to have the structure **1b**, $\text{R}' = \text{Ac}$.

GC-MS of the slower eluted minor component (B, 32%) showed that it was also an acetate of a C_{30} sterol with two double bonds (m/e 468, M^+). The fragment ions at m/e 341, 384 and 369 and at m/e 301 and 287 indicated the presence of a double bond located at C-24(28) or at C-24(25) in the side chain and an additional C_{32} methyl group in the ring system, respectively. Furthermore, the ion at m/e 285 ($\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2 - \text{Me}$) was probably due to the presence of $9\beta,19$ -cyclopropyl group rather than the double bond in the ring system [7]. The RR of the steryl acetate was 2.09 (SE-30), 2.05 (Dexsil-300), 2.09