

amounts of sodium methylate in dimethylformamide, yield 81%), we cannot exclude its transformation into thalidomide in vivo (e.g. in the alkaline milieu of the intestine). If this ring closure of ingested WU-385 takes place, it would be expected to occur only to a small extent because skeletal malformations, frequently observed with thalidomide, were found only to a very slight degree. It will be interesting to see if the internal malformations observed earlier by us with high doses of thalidomide⁹ will also occur with doses small enough not to produce skeletal effects^{11,12}.

Zusammenfassung. Thalidomid verursacht an trächtigen Neuseeland-Kaninchen nach oraler Verabreichung starke Missbildungen des Wurfes. Geringe strukturelle Abweichungen können die Teratogenie zerstören: Zwei solche Verbindungen, *N*-Methoxy-thalidomid und 2-Phthalimido-glutaramid, sind nicht teratogen, während ein Ester-

amid, ein Thalidomidanalog mit offener Kette, hauptsächlich Missbildungen der inneren Organe erzeugt.

H. M. WUEST, R. R. FOX
and D. D. CRARY

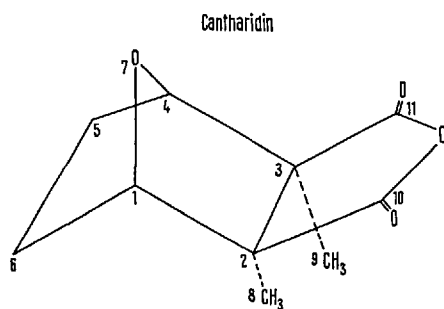
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York City (N. Y. 10021) and The Jackson Laboratory, Bar Harbor (Maine, USA), 13 June 1968.

¹¹ The principles of laboratory animal care as promulgated by the Council of the American Physiological Society are observed in this Laboratory.

¹² This research was supported in part by Public Health Service Research Grants, No. HD-01496 from the National Institute of Child Health and Human Development and No. FR-00251 from the Division of Research Facilities and Resources to The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine; and Public Health Service Grant No. CA-08748 to The Sloan-Kettering Institute for Cancer Research.

Zur Biosynthese des Cantharidins. I

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Biochemie von Insekteninhaltsstoffen haben wir die Abklärung der Biosynthese des Cantharidins in Angriff genommen. Cantharidin ist ein Inhaltsstoff des Käfers *Lytta vesicatoria* (L.) (Coleopt. Meloidae), der sogenannten spanischen Fliege, welche früher in Human- und Veterinärmedizin als Blasenzugsmittel häufig gebraucht wurde und heute noch gelegentlich bei fälschlicher Verwendung als Aphrodisiacum zu Vergiftungen Anlass gibt. Der Wirkstoff wurde im Jahre 1810 von ROBIQUET¹ in kristallisiertem Zustande erhalten. Die Strukturaufklärung hat man GADAMER² zu verdanken. Totalsynthesen publizierten die Arbeitsgruppen von ZIEGLER und SCHENCK³ sowie von STORK⁴.



Die auf der Hand liegende Hypothese der Cantharidin-Biosynthese besteht in einer Schwanz-Schwanz-Verknüpfung von 2 Isopreneinheiten. Gegen diesen Aufbauweg ist allerdings einzuwenden, dass eine solche Verknüpfung zwar bei der Bildung von Squalen aus 2 Farnesylpyrophosphat-Molekeln, nie jedoch auf der Stufe von 2 einzelnen Isopreneinheiten gefunden wurde⁵, obwohl die strukturelle Variabilität der Isoprenabkömmlinge äusserst gross ist.

L. vesicatoria kommt in der Schweiz sehr selten vor. In den Mittelmeerländern tritt das Tier im Frühsommer jeweils während ca. 2 Wochen an bestimmten, leider nur unsicher vorauszusagenden Stellen oft massenhaft auf. Es gelang indessen, im Juli 1966 im Simplongebiet 14 Käfer zu sammeln⁶.

In Äthernarkose injizierte man 6 Tieren (4 ♀ und 2 ♂) insgesamt 1 mc einer Natrium-¹⁴C-1-acetat-Lösung (1,5 mg in 0,1 ml Wasser [*c* = 0,18 *M*]) und 8 Tieren (5 ♀ und 3 ♂) 0,58 mc einer Natrium-SR-¹⁴C-2-mevalonat-Lösung (25 mg in 0,12 ml Wasser [*c* = 1,1 *M*]). Nach 10–24 h wurden die Tiere nach Zugabe von 10 mg inaktivem Cantharidin pro Tier mit Sand zerrieben, in 1 *N* wässriger Salzsäure 1 h gekocht und dann das Ganze kontinuierlich mit Benzol extrahiert. Aus dem Extrakt erhielt man nach Chromatographie, mehreren Umkristallisationen, Hochvakuumsublimationen und Behandlung mit 2 *N* Natronlauge als weiterer Reinigungsoperation schliesslich Cantharidin von konstanter Aktivität. Es zeigte sich, dass weibliche Tiere nicht inmunde waren, radioaktives Cantharidin in messbarer Menge zu synthetisieren, obwohl Versuche an anderen Lyttaweibchen ergaben, dass diese praktisch ebensoviel Cantharidin enthielten wie die Männchen, nämlich 0,5–1%. Die Inkorporierungsrate bei Männchen betrug in beiden Versuchen je ca. 0,2%.

Im radioaktiven Cantharidin wurden die C-Atome 10 + 11 durch Schmidt-Abbau⁷ erhalten. Durch Kuhn-Roth-Oxydation (Gef. 1,4 CH₃[C]) konnten die C-Atome 2 + 8 + 3 + 9 in Form von Essigsäure isoliert werden, welche als *p*-Bromphenacyl ester ausgezählt wurde. Ein Teil der Essigsäure wurde durch Pyrolyse des Lithiumsalzes zu Lithiumcarbonat (C-Atome 2 + 3) und Aceton

¹ M. ROBIQUET, *Annls Chim.* 76, 302 (1810).

² J. GADAMER, *Arch. Pharm., Berl.* 260, 199 (1922); sowie 10 frühere Mitteilungen in *Arch. Pharm., Berl.* 252–260.

³ K. ZIEGLER, G. W. SCHENCK, E. W. KROCKOW, A. SIEBERT, A. WENZ und H. WEBER, *Justus Liebigs Annln Chem.* 551, 1 (1942). – G. W. SCHENCK und R. WIRTZ, *Naturwissenschaften* 40, 581 (1953).

⁴ G. STORK, E. E. VAN TAMELEN, L. J. FRIEDMAN und A. W. BURGSTALLER, *J. Am. chem. Soc.* 75, 384 (1953).

⁵ Vgl. z.B. J. H. RICHARDS und J. B. HENDRICKSON, *The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins* (W. A. Benjamin, New York 1964).

⁶ Wir danken Herrn Dr. V. ALLENSPACH, Wädenswil, sehr für die Angabe dieses Fundortes.

⁷ Der Schmidt-Abbau musste mit konz. Schwefelsäure und Natriumazid bei 130°C im Hochvakuum durchgeführt werden; mit Polyphosphorsäure trat bis 150°C keine Reaktion ein.

umgesetzt und letzteres dem Hypojoditabbau zu Jodoform (C-Atome 8 + 9) unterworfen⁸. Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt.

Verteilung der Radioaktivität im Cantharidin in % der Gesamtaktivität

	¹⁴ C-1-Acetat-Experiment	¹⁴ C-2-Mevalonat-Experiment
Cantharidin	100	100
C-Atome 2 + 8 + 3 + 9	67	18
C-Atome 2 + 3	66	< 1
C-Atome 8 + 9	< 1	17
C-Atome 10 + 11	< 1	20

Würde das Cantharidin durch eine Schwanz-Schwanz-Verknüpfung von 2 Isopreneinheiten aufgebaut werden, so müsste das Cantharidin aus dem Acetat-Experiment je die Hälfte der Aktivität in den Atomen 2 + 3 und 5 + 6 enthalten; beim Mevalonat-Experiment müsste die gesamte Aktivität in den C-Atomen 8 + 9 und/oder 10 + 11 lokalisiert sein. Die experimentellen Befunde zeigen, dass dieses Aufbauprinzip nicht befolgt wird.

Die im Mevalonat-Experiment in den Atomen 8–11 gefundene Aktivität von ca. $\frac{1}{3}$ lässt vermuten, dass am Cantharidinaufbau 3 Isopreneinheiten beteiligt sind.

Für die weitere Abklärung der offenbar recht komplizierten Biosynthese wurde ein Abbauweg ausgearbeitet,

der es erlauben wird, die Aktivität aller 10 C-Atome des Cantharidins einzeln zu bestimmen. Ferner erwies es sich als notwendig, eine Zuchtmethode für *L. vesicatoria* zu finden, worüber in einer weiteren Mitteilung berichtet wird⁹.

Summary. In contrast to the female, the adult males of *Lytta vesicatoria* (Coleopt. Meloidae) produced radioactive cantharidine on injection with ¹⁴C-1-acetate and ¹⁴C-2-mevalonate solutions. A partial degradation of the cantharidine showed that in the acetate experiment approximately $\frac{2}{3}$ of the activity occurred at C atoms 2 + 3 whereas with mevalonate approximately $\frac{1}{6}$ of the activity was at C atoms 8 + 9 and $\frac{1}{6}$ at C atoms 10 + 11. These results show that cantharidine is not formed by a tail to tail linkage of 2 isoprene units.

CH. SCHLATTER, E. E. WALDNER
und H. SCHMID¹⁰

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich
(Schweiz), 27. Juni 1968.

⁸ Die Methode wurde mit Lithium-¹⁴C-1-acetat getestet.

⁹ D. MEYER-GRASSMANN, CH. SCHLATTER, I. SCHLATTER-LANZ, H. SCHMID und P. BOVEY, *Experientia* 24, 995 (1968).

¹⁰ Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn Dr. J. WÜRSCH (Physikalisch-chemische Abteilung der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel) für ¹⁴C-2-Mevalonolacton und unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung H. FROHOFER) für die Aktivitätsbestimmungen.

Die Zucht von *Lytta vesicatoria*¹ im Laboratorium und Nachweis der Cantharidinsynthese in Larven

Nach Injektion von Natrium-¹⁴C-2-mevalonat und Natrium-¹⁴C-1-acetat in Adulttiere von *Lytta vesicatoria* (L.)² wurde gefunden, dass nur die Männchen diese Substanzen in messbarer Menge für den Aufbau von Cantharidin verwenden³. Wir dürfen deshalb annehmen, dass die adulten Weibchen kein Cantharidin synthetisieren. Trotzdem beträgt ihr Gehalt an Cantharidin 0,5–1% des Trockengewichts. Um zu prüfen, ob die Tiere die Substanz schon als Larven synthetisieren, war es nötig, eine geeignete Zuchtmethode zu finden.

Entwicklungsweise der Meloiden. Die Larven der Meloiden leben, soweit dies bekannt ist, als Parasiten in Brutnestern von Solitärbiene^{4–8} (Hym. Apidae), der Grabwespe *Tachytes*⁹ (Hym., Sphecidae) oder in Eigelegen von Feldheuschrecken^{7,9} (Orth., Acrididae). Da die adulten Weibchen ihre Eier nie direkt an den Entwicklungsort der Nachkommen ablegen, müssen diese nach dem Schlüpfen aus dem Ei ihre Nahrung selber suchen^{5,7,9} oder sich von Solitärbiene^{4,7} weibchen in deren Nest transportieren lassen.

Bei allen untersuchten Arten von Meloiden wurde eine Hypermetamorphose¹⁰, das heisst das Auftreten verschiedenartiger Larvenformen im Laufe der ontogenetischen Entwicklung, festgestellt.

Bei *L. vesicatoria* ist die erste Form, die *Triungulinus*-Larve (Figuren 1 und 2) sehr beweglich und sucht aktiv ihre Nahrung, das Ei und den Pollenvorrat in einer Brutzelle der Biene *Colletes*⁵. Die zweite Form (Figur 3) ist dem Leben in der Brutzelle besonders angepasst und vermag

im Gegensatz zur ersten auf einem Honig-Pollen-Gemisch zu schwimmen. Nach 4 Häutungen verlässt die Larve das Wirtsnest und baut im Boden eine Transformationskammer, wo die dritte Form, die unbewegliche, stark sklerotinierte *Pseudochrysalis*¹⁰ (Figur 4) auftritt. Diese überwintert und häutet sich zur vierten Form (Figur 5), die der zweiten gleicht, aber keine Nahrung zu sich nimmt. Es folgt die Häutung zur Puppe und von der Puppe zur Imago. Die Imagines verlassen den Boden im Mai oder Juni und leben in Gruppen auf Oleaceen, deren Blätter sie fressen⁵.

¹ *Coleoptera, Meloidae*.

² Gesammelt in Sizilien, Palermo, 20. Mai 1967. Wir danken Prof. G. LIOTTA, Palermo, für seine Hilfe bei der Beschaffung der Käfer.

³ CH. SCHLATTER, E. WALDNER und H. SCHMID, *Experientia* 24, 994 (1968).

⁴ G. NEWPORT, *Trans. Linn. Soc. Lond.* 20, 297 (1851). – J. FABRE, *Annls Sci. nat. Zool.* 7, 299 (1857). – J. FABRE, *Annls Sci. nat. Zool.* 9, 264 (1858). – A. CROS, *Annls Sci. nat. Zool.* 74, 189 (1931). – B. HOCKING, *Can. Ent.* 87, 61 (1949).

⁵ H. BEAUREGARD, in *Les Insectes Vésicants* (Ed. Felix Alcan, Paris 1890).

⁶ J. FABRE, in *Souvenirs Entomologiques*, 3e Sér. (Libr. Delagrave, Paris 1890).

⁷ Literaturübersicht in G. PAOLI, *Memorie Soc. ent. ital.* 16, 71 (1937).

⁸ R. SELANDER, *Illinois biol. Monogr.* 28, 1 (1960).

⁹ W. HORSFALL, *Ann. ent. Soc. Am.* 34, 114 (1941).

¹⁰ Der Terminus stammt von J. FABRE (1857)⁴.