

BURCHARD FRANCK und ILSE ZIMMER

Mutterkorn-Farbstoffe, VIII¹⁾**Konstitution und Synthese des Clavorubins**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Kiel

(Eingegangen am 2. Dezember 1964)

Der Mutterkorn-Farbstoff Clavorubin wurde als kristallisierter Methylester in reiner Form dargestellt. Aus Massen-, UV- und IR-Spektren sowie Farbreaktionen und Decarboxylierung konnte für Clavorubin die Struktur 1.5.6.8-Tetrahydroxy-3-methyl-anthrachinon-carbonsäure-(2) (III) ermittelt und diese durch eine eindeutige Synthese aus Endocrocin bestätigt werden.

Vor einiger Zeit isolierten wir aus Roggenmutterkorn (*Claviceps purpurea*) zwei Anthrachinoncarbonsäuren, von denen eine als *Endocrocin* (I) identifiziert wurde^{2,3)}. Die Strukturermittlung der zweiten Anthrachinoncarbonsäure, des *Clavorubins*, konnte wegen Mangel an Substanz (2 mg aus 1 kg Mutterkorn) zunächst nicht fortgesetzt werden. Es erschien jedoch wichtig, seine Struktur zu kennen, da außer *Endocrocin* keine weiteren Anthrachinoncarbonsäuren isoliert worden waren und *Endocrocin* als biogenetische Vorstufe für die meisten der 80 bisher bekannten, natürlichen Anthrachinon-Farbstoffe angesehen wird^{4,5)}.

Unsere erste Untersuchung²⁾ hatte ergeben, daß *Clavorubin* ein Derivat einer 1.4.5-Trihydroxy-anthrachinoncarbonsäure ist. So zeigte *Clavorubinacetat* ein Anthrachinon-Spektrum. Das UV-Spektrum von *Clavorubin* selbst ließ auf das Vorhandensein von drei α -Hydroxygruppen schließen. Im IR-Spektrum waren eine Carboxylgruppe (1720/cm) und keine unchelate Chinoncarbonylgruppe bei 1660/cm zu sehen. Außerdem wurde eine C-Methylgruppe nachgewiesen.

Nunmehr wurde *Clavorubin* nach einem ergiebigeren Verfahren erneut aus österreichischem Mutterkorn isoliert. Die weitere Reinigung des chromatographisch aus dem Rohfarbstoffgemisch abgetrennten *Clavorubins* war durch dessen außerordentlich geringe Löslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln (0.01 %) erschwert. Es konnte jedoch mit methanolischer Salzsäure in einen in roten Nadeln kristallisierten, gut löslichen Methylester vom Schmp. 259° übergeführt werden. Dabei ließen sich mit Hilfe dieses verbesserten Verfahrens aus 1 kg Mutterkorn 24 mg *Clavorubin-methylester* gewinnen.

¹⁾ VII. Mitteil.: B. FRANCK, E. M. GOTTSCHALK, U. OHNSORGE und G. BAUMANN, *Angew. Chem.* **76**, 438 [1964]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **3**, 441 [1964].

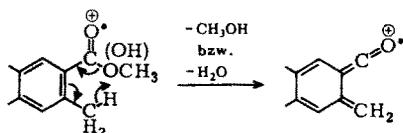
²⁾ B. FRANCK und T. RESCHKE, *Chem. Ber.* **93**, 347 [1960].

³⁾ B. FRANCK, *Planta med.* [Stuttgart] **8**, 420 [1960].

⁴⁾ S. GATENBECK, *Svensk kem. Tidskr.* **72**, 188 [1960].

⁵⁾ T. A. GEISSMAN, in P. BERNFELD, *Biogenesis of Natural Compounds*, S. 589, Pergamon Press, New York 1963.

Der Clavorubin-methylester hat nach Analyse und Massenspektrum (Abbild. 3) die Summenformel $C_{17}H_{12}O_8$. Zusammen mit unseren früheren Befunden folgt daraus, daß der Methylester der Teilformel II entsprechend ein 1.4.5-Trihydroxy-anthraquinon-carbonsäureester mit je einer zusätzlichen *C*-Methyl- und β -Hydroxygruppe ist. Nach dem Massenspektrum (Abbild. 3) des Clavorubin-methylesters steht die *C*-Methylgruppe neben der Carboxylgruppe. Der intensivste Peak bei m/e 312 zeigt nämlich an, daß Clavorubin-methylester (m/e 344) beim Elektronenbeschuß besonders leicht Methanol (Mol.-Gew. 32) abspaltet. Diese Fragmentierung ist typisch⁶⁾ für eine *o*-Toluylsäure-methylester-Gruppierung und wird durch einen cyclischen Mechanismus gedeutet:



Fehlte die benachbarte Methylgruppe, so würde nur OCH_3 abgetrennt, und das intensivste Fragment des Clavorubin-methylesters müßte bei m/e 313 ($M-31$) auftreten. Ganz analog verliert z. B. Endocrocin (OH statt OCH_3) ein Molekül Wasser und zeigt im Massenspektrum ein intensives Fragment bei m/e 296 ($M-18$). Ebenso wie beim Endocrocin (I) ist offenbar auch beim Clavorubin die Carboxylgruppe durch zwei benachbarte Substituenten, von denen einer eine Methylgruppe ist, aus der Ebene des aromatischen Grundgerüsts herausgedreht und nicht damit konjugiert. Dementsprechend liegt die Carboxylfrequenz des unveresterten Clavorubins mit $1720/cm$ für eine aromatische Carboxylgruppe ungewöhnlich hoch und stimmt mit der des Endocrocins ($1715/cm$) nahezu überein.

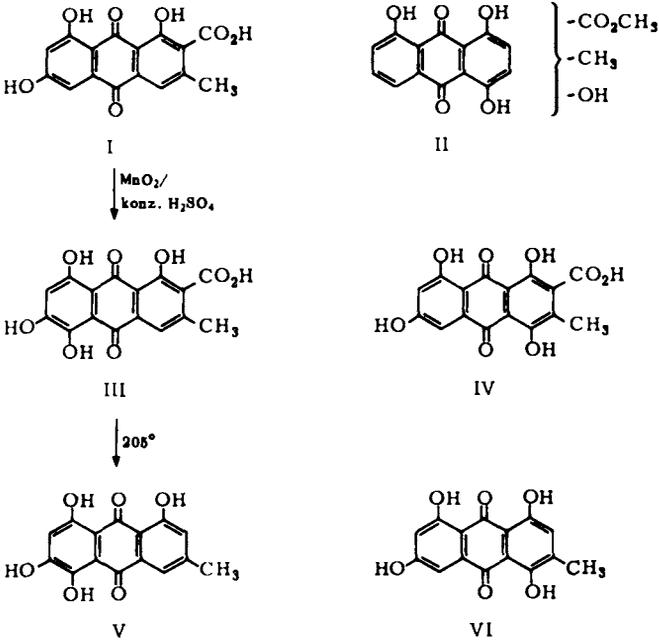
Nach den bisher diskutierten Befunden und auch nach biogenetischen Überlegungen liegt die Annahme nahe, daß Clavorubin mit Endocrocin in der Anordnung seiner Substituenten bis auf eine zusätzliche α -Hydroxygruppe übereinstimmt. Diese Annahme ließ sich beweisen, indem es gelang, Clavorubin aus Endocrocin durch selektive Oxydation mit aktivem Mangandioxyd⁷⁾ in konz. Schwefelsäure synthetisch darzustellen. Papier- und dünnschichtchromatographisch ausgewertete Reihenversuche zeigten, daß diese heterogene 2-Elektronen-Oxydation bei 3.5-fachem Überschuß an aktivem Mangandioxyd am besten verläuft. Aus dem Reaktionsprodukt wurde das synthetische Clavorubin chromatographisch abgetrennt. Es ist mit dem aus Mutterkorn isolierten Farbstoff nach R_F -Werten, UV- und IR-Spektren identisch. In Verbindung mit der von B. S. JOSHI, S. RAMANATHAN und K. VENKATARAMAN⁸⁾ kürzlich beschriebenen Endocrocin-Synthese ist somit auch das Clavorubin vollsynthetisch zugänglich.

Bei der Oxydation mit Mangandioxyd in konz. Schwefelsäure werden Hydroxy-anthraquinone in α -Stellung hydroxyliert. Dabei ist im Falle des Endocrocins die

⁶⁾ H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI und D. H. WILLIAMS, Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds, S. 195, Holden-Day Inc., San Francisco 1964.

⁷⁾ R. M. EVANS, Quart. Rev. (chem. Soc., London) 13, 61 [1959].

⁸⁾ Tetrahedron Letters [London] 1962, 951.



5-Stellung bevorzugt⁹⁾. Für Clavorubin kommt daher nur die vom Endocrocin abgeleitete Struktur III in Betracht. Die isomere Struktur IV konnte außerdem auch durch die folgenden Befunde ausgeschlossen werden:

a) Das durch Hochvakuum-Sublimation bei 205° gewonnene Decarboxylierungsprodukt (V) des Clavorubins ist *nicht* mit Catenarin (VI)¹⁰⁾ identisch.

b) Clavorubin bildet mit Zirkonylchlorid¹¹⁾ einen säurebeständigen Farblack und enthält daher eine *o*-Dihydroxy-Gruppierung.

Die Farblackbildung mit Zirkonylchlorid wurde spektrophotometrisch ausgewertet. Die in saurer Lösung gemessenen Absorptionskurven (Abbild. 1) zeigten nur beim Clavorubin und dem 1.3.4.8-Tetrahydroxy-anthraquinon mit derselben Hydroxylgruppenanordnung charakteristischen Verlauf. Die langwelligen Absorptionsmaxima des Clavorubin-methylesters sind gegenüber dem ohne Zirkonsalz gemessenen Spektrum (Abbild. 2) um 50–100 m μ nach größeren Wellenlängen verschoben.

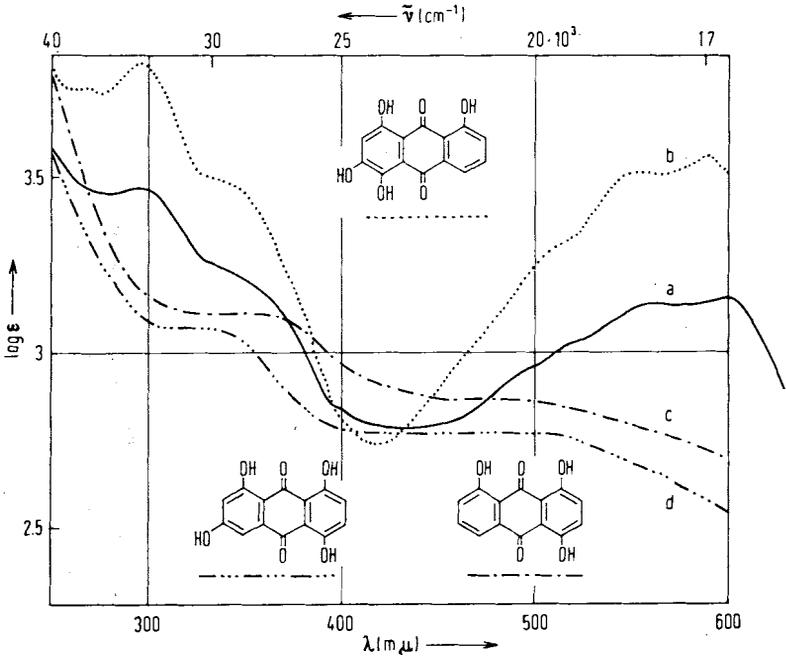
Mit der somit für Clavorubin ermittelten Struktur III lassen sich alle intensiven Fragmente im Massenspektrum des Clavorubin-methylesters (Abbild. 3) deuten. Das Massenspektrum

⁹⁾ S. COFFEY und J. VAN ALPHEN in E. H. RODD, Chemistry of Carbon Compounds III B, S. 1403, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1956; A. ROSENSTIEHL, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. 79, 764 [1874].

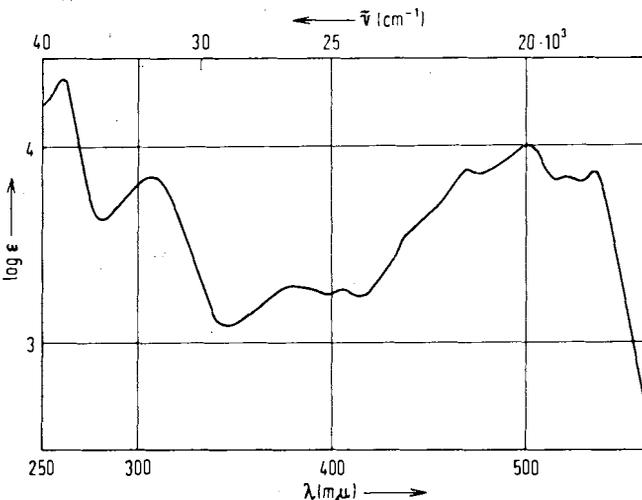
¹⁰⁾ Herrn Prof. Dr. SHOJI SHIBATA, Universität Tokio, danken wir für die Übersendung einer Probe Catenarin aus *Aspergillus amstelodami*.

¹¹⁾ F. FEIGL, Spot Tests in Organic Analysis, S. 193, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1956.

zeigt außer dem Molekül-Ion (m/e 344) und dem schon diskutierten, durch Abspaltung von Methanol gebildeten Fragment m/e 312 intensive Ionen bei m/e 284, 256, 228, 200 und 172.

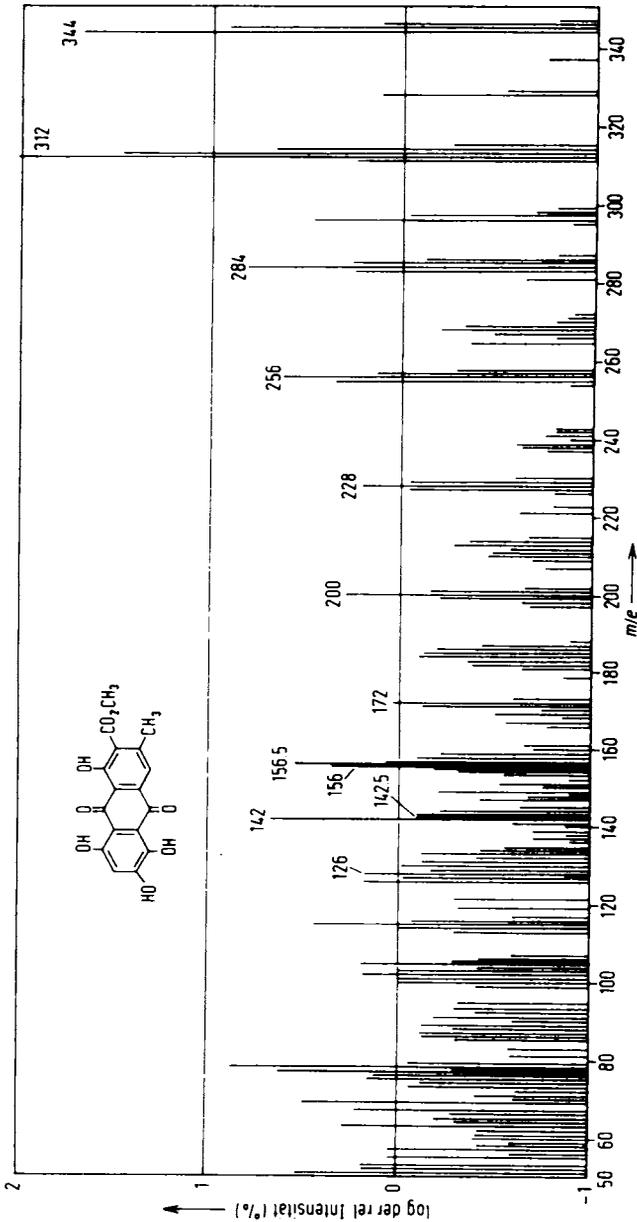


Abbild. 1. Absorptionsspektren nach der Zirkonylchlorid-Reaktion¹¹⁾ von Clavorbun-methyl-ester (a), 1,3,4,8-Tetrahydroxy-anthraquinon (b), 1,4,5-Trihydroxy-anthraquinon (c) und 1,4,5,7-Tetrahydroxy-anthraquinon (d)



Abbild. 2. Absorptionsspektrum des Clavorbun-methylesters in Diisopropyläther

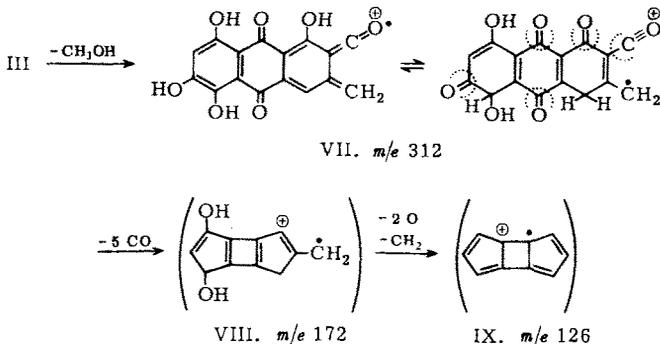
Analog der Fragmentierung einfacher Hydroxyanthrachinone¹²⁾ können sie durch Abspaltung von ein bis fünf Molekülen Kohlenmonoxyd unter Bildung von VIII aus dem Fragment 312



Abbild. 3. Massenspektrum des Clavorubin-methylesters

¹²⁾ J. H. BEYNON und A. E. WILLIAMS, *Appl. Spectroscopy* **14**, 156 [1960]; J. H. BEYNON, *Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry*, S. 360, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1960.

(VII) entstanden sein. Aus VIII (*m/e* 172) gehen wahrscheinlich durch Abspaltung von zwei O-Atomen und/oder einer CH₂-Gruppe die Ionen bei *m/e* 156, 142 und 126 hervor. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß zur Intensität der Peaks bei *m/e* 172, 156 und 142 auch zweifach geladene Ionen der Massen 344, 312 und 284 beitragen können. Einige zweifach geladene Ionen mit ungeradzahigen Massen geben sich durch ihre halb so großen, nicht ganzzahligen



m/e-Werte bei 156.5, 142.5, 105.5 und 77.5 zu erkennen. Ionen der Masse 126, 127 oder 128 finden sich stets in den Massenspektren von Anthrachinonen mit zwei und mehr Hydroxygruppen¹²⁾. Für sie kommt eine mit Dehydronaphthalin isomere Struktur wie IX in Betracht¹³⁾.

Fräulein I. HILSENITZ danken wir für experimentelle Mitarbeit.

Die Arbeit wurde von der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE und den FARBENFABRIKEN BAYER, WERK ELBERFELD, gefördert. Die DR. SCHWARZ ARZNEIMITTELFABRIK, Monheim, versorgte uns großzügig mit Mutterkorn.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Zur Dünnschicht-, Rundfilter- und Verteilungschromatographie wurden folgende Lösungsmittelsysteme verwendet:

1. Chloroform/Methanol (9 : 1) auf Kieselgel G (E. Merck), das mit Oxalsäure imprägniert ist (30 g Kieselgel G zum Beschichten von 10 Platten, 10 × 20 cm, in 60 ccm 0.5 *m* Oxalsäure suspendiert).
2. Benzol/Methanol (9 : 1) auf Kieselgel G (E. Merck), das wie oben mit Oxalsäure imprägniert ist.
3. *n*-Butanol/Wasser (1 : 1) auf Papier 2043 b (Schleicher & Schüll), das mit 0.5 *m* pH7-Phosphatpuffer imprägniert ist. Für Säulentrennungen an Cellulosepulver wurde das System *n*-Butanol/0.5 *m* pH 7-Phosphatpuffer (1 : 1) verwendet.
4. Chloroform/Essigester (9 : 1) auf oxalsäure-imprägniertem Kieselgel G.

Alle Schmelzpunkte sind im Berl-Block bestimmt und korrigiert. UV-Spektren wurden, falls nicht anders angegeben, in Methanol mit dem Zeiss-Spektralphotometer PM Q II, die IR-Spektren mit dem Perkin-Elmer-Spektrophotometer „Infracord“ Modell 137 NaCl in Kaliumbromid gemessen. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten mit dem Atlas-Massenspektrometer CH 4/IV bei 70 eV Ionisierungsenergie.

Isolierung des Rohchlorobins: 3.2 kg grob gemahlenes und mit Petroläther entfettetes Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) österreichischer Herkunft wurden in einem 25-l-Steinzeug-

¹³⁾ Vgl. I. c.⁶⁾ S. 205. Ein stabiles gesättigtes Diketoderivat des Ringsystems IX wurde kürzlich beschrieben: P. E. EATON, J. Amer. chem. Soc. **84**, 2344 [1962].

Perkolator mit 8 / 10-proz. Weinsäure 48 Stdn. stehengelassen. Danach ließ man den rotbraunen Extrakt abfließen, extrahierte in derselben Weise noch 6mal während 24 Stdn. mit je 3 l Methanol/Wasser (4:1), neutralisierte die vereinigten weinsäuren und methanolischen Lösungen mit verd. Ammoniak und dampfte im Rotationsverdampfer bei 50° unter Zusatz von n-Octanol als Antischaummittel ein. Der dunkelbraune Rückstand wurde in 750 ccm Wasser aufgeschlämmt, die Suspension mit 750 ccm 2 n HCl auf pH 9 eingestellt und die saure Lösung vom unlöslichen, hellbraunen Rückstand, der keine Farbstoffe enthielt, dekantiert. Mit 6mal 1.5 l Essigester ließ sich darauf der Farbstoff erschöpfend aus der Lösung extrahieren. Die roten Essigesterauszüge wusch man mehrmals mit 200 ccm Wasser je Liter des Auszuges, bis das Waschwasser den pH-Wert 4–5 zeigte (bei weiterer Entsäuerung gehen die Farbstoffe in das Waschwasser), vereinigte und trocknete sie mit Natriumsulfat, dampfte i. Vak. ein und wusch den Rückstand mit Petroläther. 16 g braunes Farbstoffgemisch, das im Papierchromatogramm (System 3.) nach zunehmenden R_F -Werten eine schmale und eine intensive rote (Clavorubin) sowie eine intensive orangegelbe (Endocrocin) Zone zeigte.

Das Farbstoffgemisch wurde mit dem Lösungsmittelsystem 3. an 4 Cellulosepulversäulen (6 × 50 cm) aufgetrennt, die durch Einschlämmen von je 300 g Cellulosepulver mit 1500 ccm Unterphase des Systems, leichtes Andrücken und anschließendes Nachwaschen mit Oberphase bereitet worden waren. Nach Zerlegen der Säule extrahierte man den Abschnitt, der das Clavorubin enthielt, mit kaltem 80-proz. wäbr. Methanol, dampfte den filtrierten Auszug i. Vak. ein, wusch den Rückstand mit 5 ccm Wasser, trocknete ihn i. Vak., kochte 2mal mit je 5 ccm Petroläther aus und trocknete wieder. 1.6 g rotbraunes *Rohclavorubin*, das noch Begleitstoffe aus der Cellulosesäule enthält. Es läßt im Papierchromatogramm (R_F 0.2/System 3.) und im Dünnschichtchromatogramm (R_F 0.59/System 1., R_F 0.34/System 2.) jeweils nur eine Zone erkennen. UV-Absorption (Methanol): 564, 528, 496, 340, 265 m μ ; 0.01 n methanol. HCl: 528, 497, 470 (Schulter), 340, 260 m μ . Die Löslichkeit (%) in allen Lösungsmitteln außer wäbr. Laugen ist sehr gering: Äther, Benzol, Pyridin, Chloroform, Aceton (< 0.01); Methanol (0.01); Eisessig (0.17); Wasser (0.02); gesätt. NaHCO₃-Lösung (0.26); 2 n Na₂CO₃, 2 n NaOH (> 0.5).

Clavorubin-methylester: 1.0 g ungereinigtes *Rohclavorubin* wurde mit 200 ccm 6-proz. methanol. Salzsäure 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht, wobei sich der Farbstoff löste. Anschließend verteilte man zwischen je 200 ccm Wasser und Chloroform, extrahierte die abgetrennte wäbr. Phase noch 3mal mit je 80 ccm Chloroform, wusch die vereinigten Chloroformauszüge mit Wasser neutral, trocknete sie und dampfte ein. Beim ersten Verteilen der Reaktionslösung zwischen Wasser und Chloroform schieden sich ca. 20 mg unverestertes Clavorubin als Zwischenschicht ab. Der Rohester (166 mg) zeigte im Dünnschichtchromatogramm (System 4.) außer der intensiven roten Zone von *Clavorubin-methylester* (R_F 0.77) schwächere Zonen bei R_F 0.18 (rot, Clavorubin), 0.11 (gelb) und 0.05 (gelb).

Zur weiteren Reinigung wurde der Rohester mit Chloroform/Essigester (9:1) an zwei Säulen (2.5 × 70 cm) mit je 80 g oxalsäurem Kieselgel G chromatographiert. Das Kieselgel war mit der 1.5fachen Menge (g/ccm) 4.2-proz. methanol. Oxalsäure verrührt und nach Abdampfen des Methanols bei 60° während 30 Min. bei 110° aktiviert worden. Das Eluat mit der Zone des Clavorubin-methylesters wurde intensiv mit Wasser gewaschen, der Eindampfrückstand zur Entfernung restlicher Oxalsäure 2 Tage i. Hochvak. bei 20° getrocknet (48 mg reiner Ester) und aus Benzol umkristallisiert. 18 mg große, rote Nadeln vom Schmp. 259° (korr., mit zugeschmolzener Kapillare im vorerwärmten Berl-Block), die im Dünnschichtchromatogramm (System 4.) nur die Zone des Clavorubin-methylesters (R_F 0.77) zeigten. Der Ester ist im Gegensatz zum Clavorubin gut löslich in Benzol, Chloroform, Essigester und Methanol. Farbreaktion mit methanol. Eisen(III)-chlorid-Lösung dunkelgrün, mit konz. Schwefelsäure violett. IR-

Banden (KBr): 3487 s, 2915 m, 1719 s¹, (aromat. CO₂R), 1611 s (ν_{C=O} cheliert, ν_{C=C}), 1452 m, 1429 s, 1374 w, 1326 w, 1243 s, 1188 m, 1177 m, 1142 m, 1119 s, 1068 s, 1017 w, 997 w, 964 w, 948 m, 887 m, 865 w, 826 m, 774 m, 749 m, 710/cm s. UV-Absorption (Diisopropyl-äther): 536 mμ (ε 7260), 500 (9830), 471 (7080), 380 (1915), 305 (7040), 260 (23300). Massenspektrum: $\frac{m}{e}$ (relat. Intensität in %, Zuordnung) = 344 (47, M); 328 (1.2, M - O); 321 (100, M - CH₃OH); 284 (6.4, 312 - CO); 256 (4.2, 312 - 2 CO); 228 (1.6, 312 - 3 CO); 200 (2.0, 312 - 4 CO); 172 (1.3, 312 - 5 CO); 156 (1.3); 142 (4.4); 78 (7.4).

C₁₇H₁₂O₈ (344.3) Ber. C 59.25 H 3.49 Gef. *) C 59.60 H 3.64

*) 12 Std. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

Farblackbildung mit Zirkonylchlorid¹¹⁾: Lösungen von jeweils 0.1—0.2 mMol *Clavorubin-methylester* und der zum Vergleich verwendeten *Hydroxyanthrachinone* in je 1 ccm Aceton wurden mit 0.3 ccm 2*n* NaOH und 1 ccm 0.05 *m* methanol. *Zirkonylchlorid*-Lösung zum Sieden erhitzt. Den dabei gebildeten, farbigen Niederschlag zentrifugierte man ab, wusch 2mal mit je 3 ccm Wasser, löste ihn in 3 ccm 2*n* HCl und nahm von dieser Lösung ein Absorptionsspektrum auf (Abbild. 1). Die Farblack-Niederschläge waren tief rot bis blau. Diese Farbe blieb nach Zusatz der Salzsäure nur im Falle des *Clavorubin-methylester* und der *Anthrachinone* mit einer *o*-Dihydroxy-Gruppierung erhalten. Beim 1.4.5-Trihydroxy- und 1.4.5.7-Tetrahydroxy-anthrachinon trat Farbaufhellung nach Rosa ein.

Decarboxylierung des Clavorubins: 20 mg *Clavorubin* wurden bei 205° i. Hochvak. sublimiert. Das karminrote, von feinen Nadeldrusen durchsetzte Sublimat zeigte im Papierchromatogramm (System 3.) neben Spuren von *Clavorubin* eine intensive, schneller laufende Zone derselben roten Farbe vom *R_S*-Wert 3.2 (bez. auf *Clavorubin* = 1.00). Dieses Decarboxylierungsprodukt ist nicht mit *Catenarin* (VI) identisch. *Catenarin* lief im Papierchromatogramm als noch schnellere Zone an der Lösungsmittelfront, die sich auch durch ihre hellere, orangerote Farbe von *Clavorubin* und dessen Decarboxylierungsprodukt unterscheidet.

Synthese des Clavorubins durch Oxydation von Endocrocin (I) mit aktivem Mangandioxyd: Eine auf 60° erwärmte Lösung von 123 mg (0.39 mMol) *Endocrocin*²⁾ in 48 ccm konz. Schwefelsäure wurde unter Schütteln mit 250 mg (2.9 mMol) fein gepulvertem, aktivem *Mangandioxyd*⁷⁾ versetzt und 15 Min. unter weiterem Schütteln bei dieser Temperatur gehalten. Dabei vertiefte sich die Farbe der Lösung von Rot nach Violett. Anschließend goß man in 800 ccm Eiswasser, extrahierte 4 mal mit je 100 ccm Essigester, wusch die vereinigten Essigesterzüge mit gesätt. Natriumsulfatlösung (5 mal 30 ccm) neutral, trocknete sie und dampfte ein. Der dunkelrote Rückstand (43.2 mg) zeigte im Papierchromatogramm (System 3.) folgende Zonen mit den auf *Clavorubin* (*R_S* = 1.00) bezogenen *R_S*-Werten:

<i>R_S</i> -Wert	Farbe
0.00	braun
0.35	blau
1.00	rot (<i>Clavorubin</i>)
1.45	orange (<i>Endocrocin</i>)
2.10	gelb

Zur Isolierung der roten *Clavorubin*zone chromatographierte man den Rückstand wie bei der Isolierung des *Clavorubins* aus Mutterkorn an einer Säule (1.5 × 13 cm) von 8 g Cellulosepulver. Das abgetrennte *Clavorubin* (7.7 mg) wurde, gelöst in 5 ccm Essigester, durch eine kurze Kieselsäule (1 × 2 cm) filtriert. Der so erhaltene Farbstoff war nach Papier- und Dünnschichtchromatogramm sowie IR- und UV-Spektrum mit natürlichem *Clavorubin* identisch. IR-Spektrum (KBr): 3400, 2890, 1720, 1600, 1435, 1380, 1320, 1245, 1185, 1125, 1065, 892, 788/cm.