

Burchard Franck\*, Fritz Hüper\*, Detlef Gröger\*\* und Dieter Erge\*\*

Mutterkorn-Farbstoffe, XVII<sup>1)</sup>

## Biosynthese der Ergochrome

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Kiel\* und dem Institut für Biochemie der Pflanzen, Deutsche Akademie der Wissenschaften, Halle/Saale\*\*

(Eingegangen am 13. Dezember 1967)

Secalonsäure A und 9 ähnliche Mutterkorn-Farbstoffe, die Ergochrome, welche aus Roggenmutterkorn isoliert und aufgeklärt worden waren, ließen sich auch aus Flüssigkeitskulturen des Mutterkornpilzes *Claviceps* gewinnen. Nach Verfüttern von [2-<sup>14</sup>C]-, [1-<sup>14</sup>C]- und [2-<sup>3</sup>H]Natriumacetat an Flüssigkeitskulturen eines *Claviceps spec.* aus Japan wurden radioaktive Ergochrome isoliert und deren Radioaktivitätsverteilung durch Abbau bestimmt. Das Ergebnis steht mit der Annahme in Einklang, daß die Biosynthese der Ergochrome aus Acetateinheiten über Endocrocin (**11**) oder ein ähnliches Anthrachinon-Derivat und dessen oxydative Ringöffnung erfolgt. Somit handelt es sich bei den Ergochromen um *seco-Anthrachinone*. [U-<sup>14</sup>C]Shikimisäure wurde nicht in die Ergochrome eingebaut.

Vertreter der Gattung *Claviceps* (Mutterkornpilze) zeichnen sich durch erstaunliche Mannigfaltigkeit der Produkte und Reaktionen ihres Stoffwechsels aus. Daher gewinnen sie neben ihren Gift- und Heilwirkungen zunehmende Bedeutung als Forschungsobjekt für biogenetische Zusammenhänge. Vielversprechend sind in dieser Hinsicht außer den Mutterkorn-Alkaloiden neuerdings die Mutterkorn-Farbstoffe. So wurden kürzlich aus Mutterkorn Secalonsäure A (**1**)<sup>2-5, 7)</sup>, Ergoflavin (**4**)<sup>6)</sup> sowie acht ähnliche Farbstoffe (**2, 3, 5–10**)<sup>2-4, 8, 9)</sup> in sterisch einheitlicher Form isoliert und einschließlich ihrer absoluten Konfiguration vollständig aufgeklärt. Diese zehn hellgelben „Ergochrome“<sup>4)</sup> bilden eine Naturstoffgruppe von bemerkenswerter Vollständigkeit, da sie alle zehn möglichen dimeren Kombinationen der vier monomeren Xanthone **A, B, C** und **D** enthält. Die beiden Xanthonhälften der Ergochrome sind

<sup>1)</sup> XVI. Mitteil.: B. Franck, V. Radtke und U. Zeidler, Angew. Chem. **79**, 935 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. **6**, 952 (1967).

<sup>2)</sup> B. Franck, O. W. Thiele und T. Reschke, Chem. Ber. **95**, 1328 (1962).

<sup>3)</sup> B. Franck, E. M. Gottschalk, U. Ohnsorge und G. Baumann, Angew. Chem. **76**, 438 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 441 (1964); Angew. Chem. **76**, 864 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 763 (1964).

<sup>4)</sup> B. Franck, G. Baumann und U. Ohnsorge, Tetrahedron Letters [London] **1965**, 2031.

<sup>5)</sup> B. Franck, E. M. Gottschalk, U. Ohnsorge und F. Hüper, Chem. Ber. **99**, 3842 (1966).

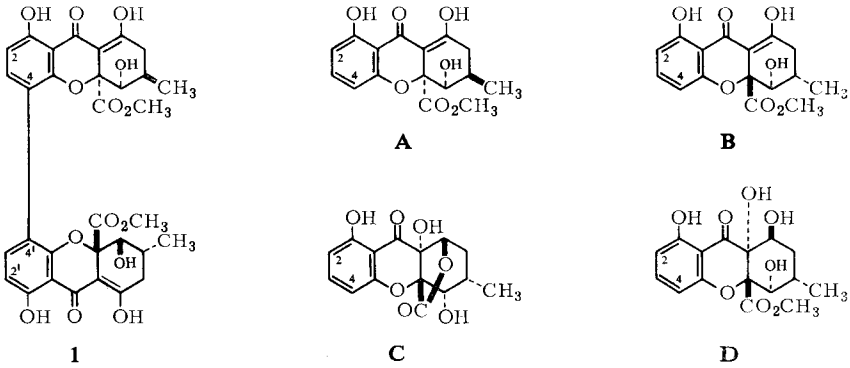
<sup>6)</sup> J. W. Apsimon, J. A. Corran, N. G. Creasey, K. Y. Sim und W. B. Whalley, J. chem. Soc. [London] **1965**, 4130; Proc. chem. Soc. [London] **1963**, 209.

<sup>7)</sup> J. W. Apsimon, J. A. Corran, N. G. Creasey, W. Marlow, K. Y. Sim und W. B. Whalley, J. chem. Soc. [London] **1965**, 4144.

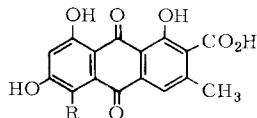
<sup>8)</sup> B. Franck und G. Baumann, Chem. Ber. **99**, 3863 (1966).

<sup>9)</sup> B. Franck und G. Baumann, Chem. Ber. **99**, 3875 (1966).

in 4.4'- oder 2.2'-Stellung miteinander verknüpft. Außerdem waren aus Mutterkorn die beiden Anthrachinon-carbonsäuren Endocrocin (**11**)<sup>10</sup> und Clavorubin (**12**)<sup>11</sup> isoliert worden.



- 1: A-A = Ergochrom AA (4.4')  
 (Secalonsäure A)  
 2: B-B = Ergochrom BB (4.4')  
 3: A-B = Ergochrom AB (4.4')  
 4: C-C = Ergochrom CC (2.2')  
 (Ergoflavin)  
 5: A-C = Ergochrom AC (2.2')  
 6: B-C = Ergochrom BC (2.2')  
 7: A-D = Ergochrom AD (2.2')  
 8: B-D = Ergochrom BD (2.2')  
 9: C-D = Ergochrom CD (2.2')  
 10: D-D = Ergochrom DD (2.2')



- 11: R = H  
 12: R = OH

Die Strukturen der 12 Mutterkorn-Farbstoffe (**1–12**), die bisher isoliert und aufgeklärt wurden, lassen neuartige biogenetische Zusammenhänge vermuten. Sie alle enthalten tricyclische Systeme aus 15 bzw. 16 Kohlenstoffatomen mit ähnlicher Substituentenanordnung. Durch Isotopenversuche von *Gatenbeck*<sup>12)</sup> über die Biosynthese ähnlicher Anthrachinone ist weitgehend gesichert, daß Endocrocin (**11**) durch Kondensation von acht Acetateinheiten über Malonyl-Coenzym A entsteht. Endocrocin seinerseits kann als Vorstufe zahlreicher, natürlicher Anthrachinon-Farbstoffe und sicher auch des Clavorubins (**12**) angesehen werden. Nach einer einleuchtenden biogenetisch möglichen Reaktionsfolge lassen sich auch die Ergochrome **1–10** vom Endocrocin ableiten<sup>13a)</sup>. In dieser Arbeit wird über Biosyntheseuntersuchungen mit Hilfe radioaktiver Vorstufen berichtet, die beweisen, daß die Ergochrome durch oxydative Ringöffnung über Anthrachinone aus Essigsäure hervorgehen. Dies wurde in einer vorläufigen Veröffentlichung schon kurz mitgeteilt<sup>13)</sup>.

<sup>10)</sup> *B. Franck* und *T. Reschke*, *Chem. Ber.* **93**, 347 (1960).

<sup>11)</sup> *B. Franck* und *I. Zimmer*, *Chem. Ber.* **98**, 1514 (1965).

<sup>12)</sup> *S. Gatenbeck*, *Acta chem. scand.* **12**, 1211 (1958).

<sup>13a)</sup> *B. Franck*, *Angew. Chem.* **76**, 864 (1964); *Angew. Chem. internat. Edit.* **3**, 763 (1964); *B. Franck*, *Festschrift Prof. Dr. K. Mothes*, S. 153, Fischer-Verlag, Jena 1965.

<sup>13)</sup> *B. Franck*, *F. Hüper*, *D. Gröger* und *D. Erge*, *Angew. Chem.* **78**, 752 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* **5**, 728 (1966).

### Isolierung von Ergochromen aus Oberflächenkulturen von *Claviceps spec.*

Für die Untersuchung ihrer Biosynthese war es aus zwei Gründen wichtig zu wissen, ob sich die Ergochrome auch aus dem Oberflächenmycel von *Claviceps*-Kulturen auf synthetischen Nährlösungen gewinnen lassen. Bei den Mutterkorn-Alkaloiden hat es sich gezeigt, daß häufig erhebliche Unterschiede in der Syntheseleistung von Sklerotien verglichen mit saprophytischen Kulturen bestehen. Durch Isolierung aus saprophytischen Kulturen würde sichergestellt, daß es sich bei den Ergochromen wirklich um echte Stoffwechselprodukte des Mutterkornpilzes handelt, deren Bildung nicht etwa einer Mitwirkung der Roggenpflanze zu verdanken ist. Zum anderen könnten Fütterungsversuche mit markierten Vorstufen an Oberflächenkulturen einfacher und unabhängig von der Jahreszeit durchgeführt werden, als mit dem auf Roggenpflanzen wachsenden Pilz. Für die Züchtung von *Claviceps*-Stämmen auf Oberflächenkulturen gibt es bewährte Verfahren<sup>14-16</sup>). Um einen nach Komponentenzahl und Menge möglichst leistungsfähigen Ergochrombildner zu gewinnen, wurden Mutterkornstämme unterschiedlicher Herkunft<sup>17</sup>) auf Mannit-Rohrzuckerlösung<sup>14</sup>) in Fernbach-Kolben gezüchtet. Anschließend wurden Menge und Zusammensetzung des mit Chloroform aus dem Mycel extrahierten Rohfarbstoffgemisches bestimmt (Auswahl: Tab. 1). Ein afrikanischer Grasmutterkornstamm lieferte nur geringe Mengen farblosen Trockenmycels, das keine Ergochrome enthielt. Die höchste Rohfarbstoffmenge,

Tab. 1. Ausbeute an Mycel und Farbstoffen aus je einer 250-ccm-Oberflächenkultur von verschiedenen Stämmen des Mutterkornpilzes

Bezeichnung des Stammes	Alter der Kultur (Tage)	Ausb. an Trockenmycel (g)	CHCl <sub>3</sub> -Extrakt (mg)	Farbe des Rohfarbstoffgemisches	chromatograph. nachgewiesene Ergochrome
Japan. Stamm 467	20	7.7	83	braun	AB, AA, BB, AC, BC, CC, AD, BD, CD, DD
<i>Claviceps purpurea</i>	20	9.7	23	braun	
Afrikan. Grasmutterkorn	12	5.7	1.1	weiß	keine

nämlich 83 mg im Mycel einer 250-ccm-Oberflächenkultur produzierte ein Stamm 467 von *Claviceps spec.*, der in Japan auf *Elymus Mollis* parasitierte. Darin ließen sich dünn-schichtchromatographisch die Ergochrome AC (5) BC (6), CC (4) und CD (9) als Hauptkomponenten, sowie die übrigen in geringer Menge nachweisen. Sie alle wurden im Verlauf der weiteren Untersuchungen auch durch Isolierung und spektroskopischen Vergleich identifiziert. Die Bildung der Anthrachinone Endocrocin (11) und Clavorubin (12) in Flüssigkeitskulturen von *Claviceps purpurea* war schon früher festgestellt worden<sup>18</sup>). Mit diesem Ergebnis waren gute Voraussetzungen für die Untersuchung der Ergochrom-Biosynthese gegeben. Mutterkorn-Farbstoffe aus dem Mycel von Oberflächenkulturen und aus Mutterkorndroge unterscheiden sich nicht in

<sup>14</sup>) M. Abe, T. Yamano, Y. Kozu und M. Kusumoto, J. agric. chem. Soc. Japan **25**, 458 (1952).

<sup>15</sup>) A. Stoll, A. Brack, H. Kobel, H. Hofmann und R. Brunner, Helv. chim. Acta **37**, 1815 (1954).

<sup>16</sup>) D. Gröger, Arch. Pharmaz. **292**, 389 (1959); D. Gröger und D. Erge, Planta med. **9**, 471 (1961).

<sup>17</sup>) Herrn Prof. Dr. Matazo Abe, Tokio, danken wir sehr herzlich für die japanischen Sklerotien, die als Ausgangsmaterial für die Anlage saprophytischer Kulturen dienen.

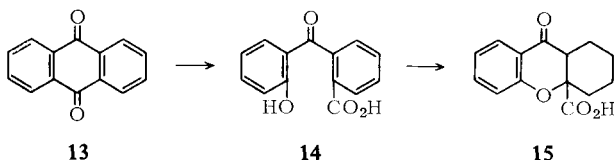
<sup>18</sup>) D. Gröger, Planta med. **8**, 430 (1960).

ihren Strukturen, wohl aber ist das Mengenverhältnis verschieden. Im Oberflächenmycel überwiegt häufig das Ergochrom BC (6), in der Droge dagegen das Ergochrom AA (1).

### Verfütterung von [2-<sup>14</sup>C]- und [1-<sup>14</sup>C]Natriumacetat

Alle Ergochrome (1–10) enthalten das Ringsystem 15. Formale Betrachtung und das gemeinsame Auftreten mit Endocrocin (11) im Mycel von *Claviceps purpurea* lassen vermuten, daß 15 in folgender Weise aus Endocrocin oder einer ähnlichen Anthrachinon-Vorstufe gebildet wird:

- 1) Oxydative Ringöffnung des Anthrachinons 13 zur Benzophenoncarbonsäure 14.
- 2) Ringschluß zum Xanthon-Derivat 15.



Um diese Hypothese zu beweisen, könnte man untersuchen, ob radioaktiv markiertes Endocrocin nach Verfüttern an Kulturen von *Claviceps purpurea* radioaktive Ergochrome ergibt. Da Endocrocin als Naturstoff, wie auch durch Synthese<sup>19)</sup> derzeit noch schlecht zugänglich ist, wurden zunächst Fütterungsversuche mit <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na und CH<sub>3</sub><sup>14</sup>CO<sub>2</sub>Na durchgeführt. Durch spezifischen Abbau und Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung kann auch auf diesem Wege die Richtigkeit der Hypothese geprüft werden.

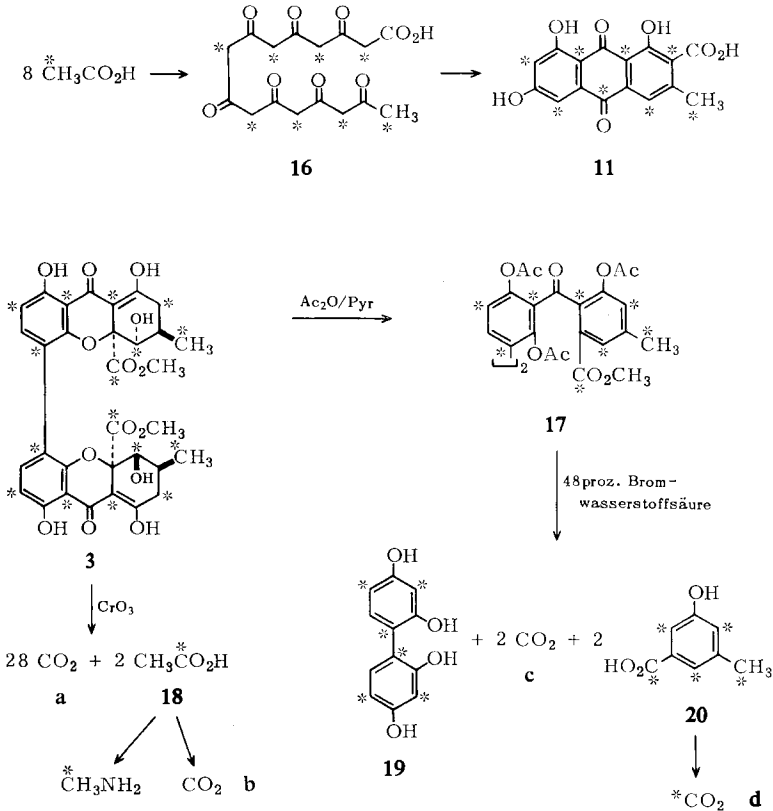
[2-<sup>14</sup>C]- und [1-<sup>14</sup>C]Natriumacetat wurden in getrennten Ansätzen an Oberflächenkulturen des japanischen *Claviceps spec.* Stamm 467 verfüttert. Chromatographische Auftrennung der erhaltenen Rohergochrom-Gemische ergab radioaktives Ergochrom BC (6) als Hauptprodukt, sowie in kleineren Mengen die Ergochrome BB (2), AB (3) und AC (5). Aus dem Ansatz mit [2-<sup>14</sup>C]Natriumacetat wurden 24.4 mg Ergochrom BC der spezif. Aktivität 2.64 · 10<sup>7</sup> dpm/mMol erhalten. Das entspricht einer spezif. Einbaurrate der sehr stoffwechselaktiven Essigsäure von 0.04%.

Falls z. B. das Ergochrom AB (3) über die hypothetische<sup>12, 20)</sup> Heptaketopalmitinsäure (16) und Endocrocin (11) aus Essigsäure entsteht, so sollten darin die Methyl-(\*) und Carboxyl-C-Atome (keine Kennzeichnung) der Essigsäure wie angegeben angeordnet sein. Besonders aufschlußreich für die angenommene oxydative Ringöffnung des Endocrocins ist das Carboxyl-C-Atom des Ergochroms. Es müßte einer Methylgruppe der Essigsäure entstammen und durch seinen erhöhten Oxydationszustand den oxydativen Eingriff bei der Biosynthese unmittelbar anzeigen. Das untenstehende Formelschema beschreibt die verwendeten Abbaureaktionen zur Bestimmung der

<sup>19)</sup> Eine Endocrocin-Synthese, die einfacher ist als die von *B. S. Joshi, S. Ramanathan* und *K. Venkataraman*, *Tetrahedron Letters* [London] **1962**, 951, und eine spezifische Markierung der Chinoncarbonylgruppen erlaubt, wird von *U. Ohnsorge* und *H. Flasch* in unserer Arbeitsgruppe entwickelt.

<sup>20)</sup> *A. C. Neish* und *J. B. Harborne*, *Biochemistry of Phenolic Compounds*, S. 303, Academic Press, New York 1964.

Radioaktivitätsverteilung in den beiden aus [2-<sup>14</sup>C]- und [1-<sup>14</sup>C]Natriumacetat erhaltenen Ergochromen AB (3). Die Kuhn-Roth-Essigsäure wurde durch Schmidt-Abbau in CO<sub>2</sub> sowie Methylamin gespalten und letzteres anschließend durch Kondensation mit *O*-Benzyl-isovanillin und Natriumborhydrid-Reduktion in Methyl-[4-methoxy-3-benzyloxy-benzyl]-amin<sup>21)</sup> übergeführt.



Ein in Anlehnung an *Whalley* u. a.<sup>7)</sup> durchgeführter Abbau mit Acetanhydrid/Pyridin und konz. Bromwasserstoffsäure zerlegte das Ergochrom AB in 2,4,2',4'-Tetrahydroxy-biphenyl (19) sowie je zwei Moleküle CO<sub>2</sub> und 5-Hydroxy-3-methylbenzoesäure (20). Die Carboxylgruppe von 20 wurde anschließend durch Schmidt-Abbau als CO<sub>2</sub> abgespalten. Auf diese Art konnte die Radioaktivität der C-Atome aus der Kuhn-Roth-Essigsäure sowie aus der Carboxyl- und der Carbonylgruppe des Ergochroms AB einzeln, die von weiteren gruppenweise bestimmt werden.

Die Ausbeute an 2,4,2',4'-Tetrahydroxy-biphenyl (19) war bei diesem Abbau des unsymmetrischen Ergochroms AB (3) im Gegensatz zu den Ergochromen AA (1) und BB (2) jedoch so gering, daß es nicht isoliert werden konnte. Die niedrige Ausbeute läßt sich darauf zurückführen, daß die Molekülhälfte **B** von Ergochrom AB bei der

<sup>21)</sup> D. H. R. Barton, R. H. Hesse und G. W. Kirby, J. chem. Soc. [London] 1966, 6379.

Acetolyse langsamer reagiert als die Hälfte A. Daher wird nur wenig Tetrahydroxybiphenyl gebildet und es entsteht statt dessen durch selektive Aufspaltung von Molekülhälfte A bevorzugt ein 2-[2.4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergochrom AA.

Tab. 2. Abbauprodukte und Radioaktivitätsverteilung der Ergochrome AB (3) aus [2-<sup>14</sup>C]- und [1-<sup>14</sup>C]Natriumacetat

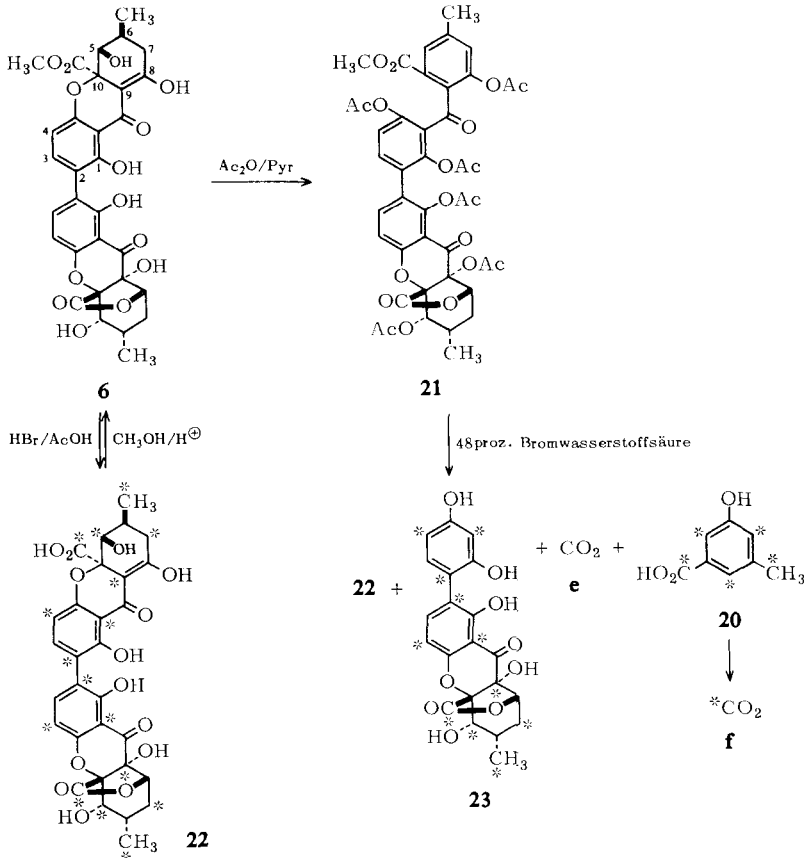
Substanz	<sup>14</sup> CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H			CH <sub>3</sub> <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> H		
	spezif. Aktivität (dpm/mMol)	markierte C-Atome ber.	gef.	spezif. Aktivität (dpm/mMol)	markierte C-Atome ber.	gef.
<i>Kuhn-Roth-Abbau</i>						
Ergochrom AB (3)	4.87 · 10 <sup>6</sup>	16	16.6	3.65 · 10 <sup>5</sup>	14	15.4
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H (18)	2.93 · 10 <sup>5</sup>	1	1	2.20 · 10 <sup>4</sup>	1	1
CO <sub>2</sub> (a)	1.61 · 10 <sup>5</sup>	0.5	0.55	9.12 · 10 <sup>3</sup>	14/32 = 0.44	0.42
CO <sub>2</sub> (b)	3.4 · 10 <sup>2</sup>	0	0.01	2.2 · 10 <sup>4</sup>	1	1
CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	2.93 · 10 <sup>5</sup>	1	1	—	0	—
<i>HBr-Abbau</i>						
Ergochrom AB (3)	9.6 · 10 <sup>5</sup>	16	16.6	3.65 · 10 <sup>5</sup>	14	15.4
CO <sub>2</sub> (c)	4.9 · 10 <sup>3</sup>	0	0.09	1.28 · 10 <sup>4</sup>	1	0.58
5-Hydroxy-3-methyl-benzoesäure (20)	2.62 · 10 <sup>5</sup>	5	4.6	4.99 · 10 <sup>4</sup>	3	2.3
CO <sub>2</sub> (d)	3.68 · 10 <sup>4</sup>	1	0.64	1.5 · 10 <sup>2</sup>	0	0.07

Aus den Ergebnissen (Tab. 2) konnte bei allen für den Biosynthesemechanismus wichtigen C-Atomen festgestellt werden, ob sie aus der Methylgruppe (\*) oder aus der Carboxylgruppe (keine Kennzeichnung) der Essigsäure stammen. Zur Berechnung der Anzahl markierter C-Atome setzte man die Aktivität der Essigsäure vom Kuhn-Roth-Abbau gleich einem C-Atom. Innerhalb der Fehlergrenze fand sich genau die Verteilung, die zu erwarten ist, wenn die Ergochrome durch oxydative Ringöffnung aus Endocrocin entstehen. Die ursprüngliche Kette der hypothetischen Heptaketopalmitinsäure (16) wird also am Chinon-C-Atom aufgespalten.

Weiterhin war nun zu prüfen, ob die Erkenntnis über die Biosynthese von Ergochrom AB (3) auch für die anderen Ergochrome gilt. Daher wurden Ergochrom BC (6) des [2-<sup>14</sup>C]Acetat-Versuchs und Ergochrom AC (5) aus [1-<sup>14</sup>C]Acetat ebenfalls einem Abbau mit Acetanhydrid und Bromwasserstoffsäure zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung unterworfen. Diese beiden Ergochrome unterscheiden sich vom Ergochrom AB (3) darin, daß sie eine Molekülhälfte C des Ergochroms (4) enthalten die bei diesem Abbau unverändert bleibt. Infolgedessen entsteht, wie schon *Whalley*<sup>7)</sup> beim Abbau eines Ergochrom-AC-Präparates feststellte, neben nur je einem Mol CO<sub>2</sub> und Säure 20 2-[2.4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergoflavin (23) und kein 2.4.2'.4'-Tetrahydroxy-biphenyl (19). Wir fanden, daß das diastereomere Ergochrom BC (6) sich ähnlich verhält. Energische Acetylierung von inaktivem Ergochrom BC (6) mit Acetanhydrid/Pyridin ergab unter Ringöffnung in der Ergochromhälfte B das kristallisierte Hexaacetat 21. Darin sind alle Chiralitätszentren der Ergochromhälfte B aufgehoben, und es war dementsprechend mit der von *Whalley*<sup>7)</sup> aus Ergochrom AC (5) erhaltenen Verbindung nach Schmp. (239—241°), IR-Spektrum und spezifischer Drehung identisch. Auch das daraus durch Kochen mit 48proz. Bromwasserstoff-

säure gebildete kristallisierte 2-[2,4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergoflavin (**23**) (Schmp. 192°) entsprach in seinen Eigenschaften dem Produkt aus Ergochrom AC (**5**). Außerdem erhielten wir beim HBr-Abbau des Ergochroms BC (**6**) mit 43% Ausbeute die Säure **20** und eine dritte Verbindung in gelben Nadeln vom Schmp. 192—194°. Ihr IR-Spektrum zeigte bei 1720/cm eine Bande für freies Carboxyl und unterschied sich sonst nur wenig von dem des Ergochroms BC. Die Vermutung, daß es sich um Des-

Abbauschema für das nach Verfütterung von [2-<sup>14</sup>C]Natriumacetat isolierte Ergochrom BC (**6**)



methoxy-ergochrom BC (**22**) handelt, ließ sich durch zwei Versuche bestätigen. Die Verbindung konnte durch Veresterung mit Methanol in Ergochrom BC übergeführt werden. Zum anderen wurde sie auch nach Verseifung von Ergochrom BC mit Bromwasserstoffsäure/Eisessig gewonnen.

Obwohl die Ergochrome BC (**6**) und AC (**5**) somit gleiche Abbauprodukte bilden, zeigten sie einen überraschenden Unterschied in der Geschwindigkeit ihrer zu **23** führenden Acetolyse. So entstand in einem Falle bei der Einwirkung von Acetanhydrid und Bromwasserstoffsäure auf radioaktives Ergochrom BC (**6**), das mit

inaktivem AC (5) verdünnt worden war, nur *inaktives* 2-[2.4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergoflavin (23). Das läßt sich darauf zurückführen, daß die Acetolyse der Ergochromhälfte A rascher verläuft als die von B, weil dabei die sterische Spannung<sup>5,8)</sup> zwischen den in *cis*-Stellung befindlichen Substituenten an C-10 und C-5 von A aufgehoben wird. Deshalb entsteht bei einem nicht vollständigen Abbau eines Gemisches der Ergochrome AC und BC nur das Abbauprodukt von AC.

Tab. 3. Abbauprodukte und Radioaktivitätsverteilung der Ergochrome BC und AC aus Fütterungsversuchen mit [2-<sup>14</sup>C]- und [1-<sup>14</sup>C]Natriumacetat

Substanz	<sup>14</sup> CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H		CH <sub>3</sub> <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> H	
	spezif. Aktivität (dpm/mMol)	markierte C-Atome ber. gef.	spezif. Aktivität (dpm/mMol)	markierte C-Atome ber. gef.
Ergochrom AC (5)	—	— —	8.8 · 10 <sup>4</sup>	14 14
Desmethoxy-ergochrom BC (22)	1.94 · 10 <sup>5</sup>	16 16	—	— —
5-Hydroxy-3-methyl-benzoessäure (20)	5.27 · 10 <sup>4</sup>	5 4.35	1.92 · 10 <sup>4</sup>	3 3.05
CO <sub>2</sub> (e)	7.18 · 10 <sup>2</sup>	0 0.06	4.7 · 10 <sup>3</sup>	1 0.75
CO <sub>2</sub> (f)	—	— —	2.6 · 10 <sup>2</sup>	0 0.04
2-[2.4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergoflavin (23)	1.30 · 10 <sup>5</sup>	11 10.7	—	— —

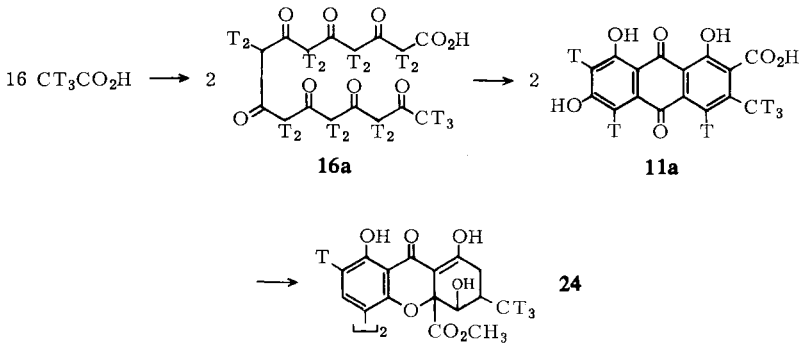
Die Ergebnisse der nach dem Abbau der radioaktiven Ergochrome BC (6) und AC (5) durchgeführten Aktivitätsmessungen sind in Tab. 3 zusammengefaßt. Bei der Auswertung setzte man die Radioaktivität des Desmethoxy-ergochroms BC aus [2-<sup>14</sup>C]-Acetat gleich 16 und die des Ergochroms AC vom [1-<sup>14</sup>C]Acetat-Versuch gleich 14, der berechneten Anzahl an markierten C-Atomen entsprechend. Hierauf wurden die anderen Werte bezogen. Für die Aktivität des Ergochroms BC ergibt das den etwas zu hohen Wert 16.6, was darauf zurückzuführen ist, daß ein Teil der verfütterten, radioaktiven Essigsäure über den C<sub>1</sub>-Stoffwechsel in die Methoxylgruppe gelangt. Die Messungen zeigen, daß ebenso wie beim zuvor untersuchten Ergochrom AB die Säure 20 5 radioaktive C-Atome enthält, wenn [2-<sup>14</sup>C]Acetat verfüttert wurde. Die Säure 20 des Ergochroms AC aus [1-<sup>14</sup>C]Acetat hat erwartungsgemäß nur 3 markierte C-Atome. Somit gehen diese C-Atome (\*) auch bei der Biosynthese der Ergochrome BC und AC aus der Methylgruppe des Acetats hervor. Ebenso entsprechen die Radioaktivitäten der anderen aus Ergochrom BC (6) und AC (5) erhaltenen Abbauprodukte innerhalb der Fehlergrenze dem für Ergochrom AB nachgewiesenen Biosyntheseweg aus Acetat über Endocrocin (11) und dessen oxydativer Ringöffnung.

### Verfütterung von [2-<sup>3</sup>H]Natriumacetat

Zur Ergänzung und Sicherung der mit <sup>14</sup>C-markierten Acetaten erhaltenen Befunde wurde auch [2-<sup>3</sup>H]Natriumacetat an den Mutterkornpilz verfüttert. Diese Untersuchung ist nach folgenden Überlegungen aufschlußreich. Falls das [2-<sup>3</sup>H]-Acetat auf dem oben diskutierten Biosyntheseweg über eine hypothetische tritiummarkierte Heptaketopalmitinsäure (16a) und Endocrocin (11a) in ein Ergochrom eingebaut wird, so kann dieses, wie das Formelschema zeigt, nur in der C-Methylgruppe und an einer Position des Phenylkerns mit Tritium markiert sein. Die Tritiumaktivität am Phenylkern geht jedoch durch Austausch verloren, wenn während der



Biosynthese die intermediär gebildete Poly- $\beta$ -ketosäure bzw. der betreffende Teil davon kurzfristig frei auftritt, oder in dieser Position eine vorübergehende Substitution erfolgt. Eine Tritiumaktivität im Ringsystem, die höher ist, als der Markierung mit einem  $^3\text{H}$ -Atom entspricht, würde gegen eine Biosynthese sprechen, die über Anthrachinone verläuft. Statt dessen müßte dann z. B. ein direkter Aufbau des hydroaromatischen Ringes der Ergochrome aus aliphatischen Folgeprodukten der Essigsäure erwogen werden.



Die chromatographische Auftrennung des nach Verfütterung von [2- $^3\text{H}$ ]-Natriumacetat isolierten radioaktiven Rohergochrom-Gemisches ergab, anders als bei den vorhergehenden Fütterungsversuchen, Ergochrom BD (8) als Hauptprodukt und auch Ergochrom BC (6) in genügender Aktivität für die Abbauversuche. Zur Bestimmung der Radioaktivität der *C*-Methylgruppe wurde diese mittels Kuhn-Roth-Oxydation als Essigsäure abgespalten. Um durch Substraktion ihrer Aktivität von der gesamten des Ergochroms BC die Radioaktivität am Phenylkern zu ermitteln, mußte zuvor die Methoxygruppe entfernt oder auch deren Aktivitätswert festgestellt werden. In Tab. 4 sind die gemessenen Radioaktivitäten des durch Verseifung mit Bromwasserstoffsäure/Eisessig erhaltenen Desmethoxy-ergochroms BC (22) und der Kuhn-Roth-Essigsäure zusammengestellt. Daraus ergibt sich, daß, bezogen auf die gleich 3 gesetzte Aktivität der Essigsäure das Desmethoxy-ergochrom BC innerhalb der Fehlergrenze 8 markierte H-Atome hat, wovon 6 auf die zwei *C*-Methylgruppen und 2 auf je einen Phenylkern der beiden Molekülhälften entfallen.

Der etwas zu hohe Wert für die Radioaktivität des kernständigen Tritiums könnte darauf zurückgeführt werden, daß die *C*-Methylgruppe unter den Bedingungen der Kuhn-Roth-Oxydation Tritium durch Austausch verliert. Dadurch erhöht sich der durch Substraktion gebildete Aktivitätswert für den Tritiumgehalt am Phenylkern. Tatsächlich ließ sich der Austausch von *C*-Methyl-H-Atomen eines Ergochroms während der Kuhn-Roth-Oxydation mit Hilfe des einfachen von Simon und Floss<sup>22)</sup> empfohlenen Kontrollversuches nachweisen. So ergab inaktives Ergochrom AB (3), als es der Oxydation bei Gegenwart von [ $^3\text{H}$ ]H $_2\text{O}$  unterworfen wurde, tritierte Essigsäure, deren spezif. Radioaktivität 13% der des tritiumhaltigen Wassers betrug.

<sup>22)</sup> H. Simon und H. G. Floss, Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen, S. 14, Springer-Verlag, Heidelberg 1967.

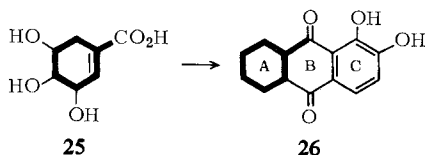
Tab. 4. Abbauprodukte und Radioaktivitätsverteilung des Ergochroms BC aus dem Fütterungsversuch mit [2-<sup>3</sup>H]Natriumacetat

Substanz	spezif. Akt. (dpm/mMol)	markierte <sup>3</sup> H-Atome pro Molekül	
		theor.	gef.
Desmethoxy-ergochrom BC (22)	3.15 · 10 <sup>6</sup>	8	8.4
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H vom Kuhn-Roth-Abbau	1.13 · 10 <sup>6</sup>	3	3
H-Atome am Ringsystem (Differenz)	0.89 · 10 <sup>6</sup>	2	2.4

Eine Bestimmung der Radioaktivität des Methoxyls durch Abspaltung nach *Zeisel* und Isolierung des Methyljodides als Methyltriäthylammoniumjodid gab infolge Tritiumaustausch einen wesentlich zu kleinen Wert.

### Verfütterung von [U-<sup>14</sup>C]Shikimisäure

Kürzlich fanden *Leistner* und *Zenk*<sup>23)</sup>, daß bei Anthrachinonen aus höheren Pflanzen außer Acetat auch Shikimisäure (25) als Biosynthese-Vorstufe dient. Bei Fütterungsversuchen mit *Rubia tinctorum* wurde in den Ring A des Alizarins (26) kein Acetat, wohl aber Shikimisäure aufgenommen. Die Autoren diskutierten daher, daß auch der bei Anthrachinonen aus niederen Pilzen nachgewiesene Einbau von Acetat<sup>12)</sup>



über Shikimisäure als weitere Zwischenstufe erfolgen könnte. Da von dieser Frage auch unsere Vorstellungen über die Biosynthese der Ergochrome berührt werden, untersuchten wir, ob nach Verfütterung von [U-<sup>14</sup>C]Shikimisäure an Oberflächenkulturen von *Claviceps spec.* ein Einbau in die Ergochrome eintritt. In dem anschließend isolierten und gereinigten Ergochrom BC (6) war jedoch keine Radioaktivität, die auf den Einbau der markierten Shikimisäure schließen ließe, nachzuweisen.

### Diskussion der Ergebnisse

Die Radioaktivitätsverteilung der nach Verfüttern von [2-<sup>14</sup>C]-, [1-<sup>14</sup>C]- und [2-<sup>3</sup>H]Natriumacetat sowie [U-<sup>14</sup>C]Shikimisäure an den japanischen Mutterkornstamm *spec.* 467 erhaltenen Ergochrome AB (3), BC (6) und AC (5) steht mit der Annahme in Einklang, daß deren Biosynthese aus Essigsäure über eine Poly- $\beta$ -carbonyl-Zwischenstufe erfolgt. Erwartungsgemäß zeigt die geringere Aktivitätsaufnahme aus [1-<sup>14</sup>C]Acetat an, daß die nicht endständigen Acetateinheiten wie bei der Fettsäure<sup>24)</sup>- und Anthrachinon-Biosynthese<sup>25)</sup> über Malonyl-Coenzym A ein-

<sup>23)</sup> E. Leistner und M. H. Zenk, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 475; Z. Naturforsch. **22b**, 865 (1967).

<sup>24)</sup> F. Lynen, Angew. Chem. **77**, 929 (1965).

<sup>25)</sup> S. Shibata und T. Ikekawa, Chem. and Ind. **1962**, 360.

gebaut werden, wobei ein Teil der Carboxyl-Aktivität verloren geht. Die Ergebnisse beweisen weiterhin, daß die Poly- $\beta$ -carbonyl-Zwischenstufe im Verlauf der Biosynthese an dem C-Atom, das die Carboxylgruppe der Ergochrome ergibt, oxydativ aufgespalten wird. Diese oxydative Spaltung erfolgt entweder während, oder nach der Kondensation der Poly- $\beta$ -carbonyl-Zwischenstufe zu einem Anthrachinon von der Art des Endocrocin (**11**). In der nachstehenden Arbeit<sup>26)</sup> wird durch Fütterungsversuche mit markierten Anthrachinonen gezeigt, daß die oxydative Spaltung erst nach Beendigung der Anthrachinon-Biosynthese eintritt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für großzügige Förderung dieser Untersuchungen.

### Beschreibung der Versuche

Die Radioaktivität der  $^{14}\text{C}$ - und  $^3\text{H}$ -Präparate wurde im Packard-Flüssigscintillationszähler Tricarb 3314 gemessen. Als Scintillator diente eine Lösung von 5 g 2,5-Diphenyl-oxazol (PPO) und 300 mg 1,4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol (Dimethyl-POPOP) in 1 l Toluol. Die Proben wurden in 15 ccm flüssigem Scintillator, dem man in einigen Fällen 1–2 ccm Methanol als Lösungsvermittler zufügte, in Probenfläschchen aus kaliumarmem Glas (Packard) untersucht. Zur Bestimmung der Zählausbeuten diente eine  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle als externer Standard. Die Radioaktivität ist in dpm (desintegrations per minute) angegeben.  $2,22 \cdot 10^9$  dpm = 1 mC. Dünnschichtchromatogramme  $^{14}\text{C}$ - und  $^3\text{H}$ -markierter Verbindungen wurden mit dem Radiochromatogramm-Scanner Berthold bei einer Arbeitsspannung des Proportionalzählrohres von 3000 V und Verwendung von Methan als Zählgas ausgewertet.

Schmelzpunkte sind im Berl-Block bestimmt und korrigiert. Für analytische und präparative Schichtchromatogramme<sup>5)</sup> imprägnierte man Kieselgel G (E. Merck) mit 7,5proz. wäbr. Weinsäure, aktivierte die gestrichenen Platten 1 Stde. bei  $110^\circ$  und verwendete  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ -Gemische verschiedener Zusammensetzung als Laufmittel. Die fertigen Chromatogramme entwickelte man durch Besprühen mit einer Lösung von diazotierter Sulfanilsäure (Pauli-Reagens)<sup>2)</sup>.

Isolierung von Ergochromen aus dem Mycel von Oberflächenkulturen verschiedener Stämme des Mutterkornpilzes: Mit Stämmen von *Claviceps spec.*, die in Japan auf *Elymus Mollis* und auf einheimischen Roggenpflanzen parasitierten, sowie einem afrikanischen Grasmutterkornstamm wurden je 250 ccm Nährlösung in 1,6-l-Fernbach-Kolben beimpft. Die Nährlösung enthielt 50 g Mannit, 50 g Rohrzucker, 5,4 g Bernsteinsäure, 3,0 g Hefeextrakt (Difco), 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g  $\text{MgSO}_4$ , 4,4 mg  $\text{ZnSO}_4$  und 10 mg  $\text{FeSO}_4$  in 1 l Wasser und war mit wäbr.  $\text{NH}_3$  auf pH 5,4 eingestellt. Am Ende der Versuche trennte man das Oberflächenmycel ab, wusch es 2 mal mit Wasser und trocknete während 12 Stdn. bei  $50^\circ$ . Zur Isolierung der Ergochrome entfettete man jeweils 5 g Trockenmycel durch 2 mal 2stdg. Kochen mit je 100 ccm Petroläther (0,55 g = 11 Gew.-% Lipide). Anschließend kochte man 4 mal 2 Stdn. mit je 100 ccm  $\text{CHCl}_3$  aus, dampfte ein, versetzte den öligen Rückstand mit 50 ccm Petroläther, filtrierte das ausgefällte, gelbbraune Rohergochrom-Gemisch ab und wusch mit Petroläther. Kulturdauer, Ausbeuten und die dünnschichtchromatographisch bestimmte Zusammensetzung des Rohergochrom-Gemisches sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Zur hydrolytischen Freisetzung von Ergochromen, die möglicherweise glykosidisch gebunden sind, wurde das mit  $\text{CHCl}_3$  extrahierte Mycel für 2 Tage in 50 ccm 10proz. wäbr. Weinsäure suspendiert, anschließend abfiltriert, je 3 mal mit 20 ccm Wasser und 20 ccm

<sup>26)</sup> D. Gröger, D. Erge, B. Franck, U. Ohnsorge und H. Flasch, Chem. Ber. **101**, 1970 (1968), nachstehend.

80proz. wäbr. Methanol gewaschen, getrocknet und wieder, wie oben beschrieben, mit heißem  $\text{CHCl}_3$  extrahiert. Da in dem schwach rotbraun gefärbten  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt keine Ergochrome nachzuweisen waren, wurde bei allen nachfolgenden Extraktionen auf einen Weinsäureaufschluß verzichtet.

### Isolierung und Abbau des radioaktiven Ergochroms AB (3) nach Verfütterung von $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -Natriumacetat

Eine Lösung von 0.5 mC  $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Natriumacetat (Radiochemical Centre, Amersham, 1.5 mg, spezif. Aktivität 27.4 mC/mMol) und 45.1 mg inaktivem  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$  in 55 ccm Wasser wurde steril filtriert. 54.5 ccm dieser Lösung spritzte man in gleichen Anteilen unter das Oberflächenmycel von 10 gut wachsenden 17 Tage alten Oberflächenkulturen des japanischen *Claviceps*-Stammes 467 in 1.6-l-Ferribach-Kolben mit je 180 ccm Nährlösung. Nach weiteren 17 Tagen erntete man das Mycel ab und isolierte das Rohergochrom-Gemisch, wie im ersten Abschnitt beschrieben. Dieses wurde zur Abtrennung dunkel gefärbter, polymerer Begleitstoffe in 20 ccm  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (95 : 5) durch eine kurze Säule ( $1 \times 2.5$  cm) von 3 g weinsaurem Kieselgel G filtriert, das Kieselgel mit 10 ccm  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (95 : 5) nachgewaschen, die vereinigten Eluate zweimal mit je 30 ccm Wasser ausgeschüttelt, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingedampft. Die erhaltenen 158 mg hellbraunes Rohergochrom-Gemisch verteilte man auf die Startlinie von fünf 1.2-mm-Schichtplatten mit weinsaurem Kieselgel G, trennte mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (99 : 1), das man 6–7 mal aufsteigen ließ auf, schabte die Zonen heraus und eluierte mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (90 : 10). Um Weinsäure abzutrennen, wusch man den Eluatrückstand mit Wasser neutral. Die Ausbeuten an chromatographisch reinen, radioaktiven Ergochromen betragen: 24.4 mg Ergochrom BC (6), spezif. Aktivität  $2.64 \cdot 10^7$  dpm/mMol; 4.1 mg Ergochrom BB (2); 3.2 mg Ergochrom AB (3); Spur Ergochrom AC (5).

Die Radioaktivität der Ergochrome BB, AB und AC wurde wegen der geringen Substanzmengen erst nach dem Verdünnen mit inaktiven Ergochromen bestimmt. Das Ergochrom BC wurde dreimal aus  $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$  (5 : 1) umkristallisiert.

a) *Kuhn-Roth-Oxydation des radioaktiven Ergochroms AB (3)*: 3.2 mg des radioaktiven Ergochroms AB (3) wurden mit 100 mg inaktivem Ergochrom AB versetzt und 5 mal bis zur konstanten spezif. Aktivität von  $4.87 \cdot 10^6$  dpm/mMol aus Benzol/Cyclohexan (10 : 1) umkristallisiert. Hiervon kochte man 15 mg (0.024 mMol) in einer Mischung aus 1 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $d$  1.84) und 4 ccm 5 n wäbr.  $\text{CrO}_3$  90 Min. unter Rückfluß. Das entweichende  $\text{CO}_2$  absorbierte man in 0.2 n NaOH und fällte mit 10proz. Bariumchloridlösung 82.4 mg  $\text{BaCO}_3$  (63%, bez. auf die Umsetzung  $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{O}_{14} \rightarrow 28 \text{CO}_2 + 2 \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ) der spezif. Aktivität  $1.61 \cdot 10^5$  dpm/mMol. Das Oxydationsgemisch wurde in einer Mikrowasserdampfdestillationsapparatur (Quickfit) mit gesätt.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung auf 15 ccm aufgefüllt, nach 4 maligem Zufügen von jeweils 10 ccm Wasser insgesamt 40 ccm abdestilliert und die im Destillat enthaltene Essigsäure mit 0.01 n NaOH gegen Phenolphthalein titriert. 0.0372 mMol = 3.05 mg (80%) Natriumacetat der spezif. Aktivität  $2.93 \cdot 10^5$  dpm/mMol.

b) *Schmidt-Abbau der radioaktiven Kuhn-Roth-Essigsäure aus Ergochrom AB (3)*: 1.8 mg (0.022 mMol) des Natriumacetates vom Kuhn-Roth-Abbau versetzte man mit 30.0 mg inaktivem Natriumacetat und fällte aus Methanol/Äther um. Eine Lösung von 21.3 mg (0.26 mMol) dieses Acetates in 0.3 ccm konz. Schwefelsäure versetzte man in einem Zweihalskolben mit 50 mg (0.77 mMol)  $\text{NaN}_3$ , schloß eine Waschflasche mit 5proz.  $\text{KMnO}_4$  in n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und dahinter ein Absorptionsgefäß mit 0.2 n NaOH an. Danach wurde ein schwacher  $\text{N}_2$ -Strom durch die Apparatur geleitet und die Reaktionsmischung langsam auf  $70^\circ$  erwärmt. Nach 1 Stde. ließ man abkühlen, leitete noch eine weitere Stde.  $\text{N}_2$  durch die Apparatur und fällte das absorbierte  $\text{CO}_2$  wie unter a) als  $\text{BaCO}_3$  aus. 48.8 mg (95%) der spezif. Aktivität  $3.4 \cdot 10^2$  dpm/mMol.

Zur Isolierung des Methylamins alkalisierte man die Reaktionslösung mit einem Überschuß an 0.2 *n* NaOH, destillierte in eine Vorlage mit 5 ccm 0.2 *n* HCl und dampfte die *Methylamin-hydrochlorid*-Lösung unter einer IR-Lampe zur Trockne. Den Rückstand (18.2 mg) nahm man in 2 ccm Methanol auf, versetzte mit 10 mg *O-Benzyl-isovanillin*<sup>21)</sup>, nach einer Stde. mit 150 mg *NaBH<sub>4</sub>* und nach weiteren 12 Stdn. mit 5 Tropfen 5 *n* NaOH. Die alkalische Lösung wurde mit 30 ccm Wasser versetzt, 2mal mit je 50 ccm  $\text{CHCl}_3$  extrahiert, der Eindampfrückstand der vereinigten Extrakte in 1 ccm Äther aufgenommen und durch Zusatz von 1 ccm äther. HCl 43.4 mg (56%) *Methyl-[4-methoxy-3-benzyloxy-benzyl]-amin-hydrochlorid*<sup>21)</sup> der spezif. Aktivität  $5 \cdot 10^4$  dpm/mMol abgeschieden.

c) *Abbau des radioaktiven Ergochroms AB (3) mit Acetanhydrid und HBr*: Die nach Versuch a) verbliebenen restlichen Fraktionen radioaktiven *Ergochroms AB (3)* wurden nach Zufügen von 230 mg inaktivem Ergochrom AB bis zur konstanten spezif. Aktivität von  $9.6 \cdot 10^5$  dpm/mMol viermal aus Benzol/Cyclohexan (10:1) umkristallisiert. 201 mg (0.32 mMol) hiervon kochte man mit 75 mg Natriumacetat in 2.5 ccm (26 mMol) *Acetanhydrid* 2.5 Stdn. unter Rückfluß, engte die Lösung ein, extrahierte den Rückstand mit 50 ccm  $\text{CHCl}_3$ , wusch den Extrakt 3 mal mit je 50 ccm Wasser, trocknete mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und dampfte ein. Von den 146 mg des Rückstandes löste man 140 mg in 1 ccm Essigsäure und kochte nach Zusatz von 2.5 ccm 48proz. *Bromwasserstoffsäure* 1 Stde. unter  $\text{N}_2$  und unter Rückfluß. Zur Absorption des bei dieser Reaktion gebildeten  $\text{CO}_2$  war an den Kühler eine Waschflasche mit 10 ccm 0.1 *n*  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und dahinter ein Absorptionsgefäß mit 5 ccm 0.2 *n* NaOH angeschlossen. Fällung mit *Bariumchlorid* ergab 46.4 mg (61%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $4.9 \cdot 10^3$  dpm/mMol. Die dunkelbraune Reaktionslösung wurde mit 10 ccm Wasser verdünnt, 4mal mit je 30 ccm Essigester ausgeschüttelt, die vereinigten Extrakte eingedampft und der Rückstand 2mal bei  $160^\circ/10^{-3}$  Torr im Kugelrohr sublimeriert. Das Sublimat (23 mg = 40%, bez. auf die Umsetzung  $\text{C}_{44}\text{H}_{40}\text{O}_{19} \rightarrow 2 \text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) war nach Schmp. ( $211^\circ$ ) und  $R_F$ -Wert ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  [90:10] auf weinsaurem Kieselgel G) mit *5-Hydroxy-3-methyl-benzoessäure (20)* identisch. Spezif. Aktivität  $2.62 \cdot 10^5$  dpm/mMol.

d) *Schmidt-Abbau der radioaktiven 5-Hydroxy-3-methyl-benzoessäure (20) aus Ergochrom AB (3)*: Eine Lösung von 21.0 mg (0.14 mMol) *Säure 20* aus Versuch c) in 0.3 ccm konz. Schwefelsäure wurde bei  $10^\circ$  mit 50 mg (0.77 mMol)  $\text{NaN}_3$  versetzt und weiter wie bei Versuch b) behandelt. Man erhielt das  $\text{CO}_2$  der Carboxylgruppe als 27.3 mg (99%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $3.68 \cdot 10^4$  dpm/mMol.

e) *Abbau eines Gemisches aus radioaktivem Ergochrom BC (6) und inaktivem Ergochrom AC (5) mit Acetanhydrid und HBr*: 170.8 mg (0.29 mMol) radioaktives *Ergochrom BC* der spezif. Aktivität  $1.96 \cdot 10^6$  dpm/mMol und 230 mg (0.37 mMol) *inaktives Ergochrom AC* erhitzte man in 8 ccm (84 mMol) *Acetanhydrid* und 0.4 ccm Pyridin 4 Stdn. auf dem Dampfbad und kochte weitere 2 Stdn. rückfließend unter  $\text{N}_2$ . Dann wurde das Reaktionsgemisch i. Vak. eingedampft und der Rückstand (399.2 mg) mit 1.5 ccm Eisessig und 3.5 ccm 48proz. *Bromwasserstoffsäure* 1 Stde. unter  $\text{N}_2$  und unter Rückfluß gekocht. Das gebildete  $\text{CO}_2$  wurde wie beim Versuch c) aufgefangen. 85.1 mg (72%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $9.6 \cdot 10^2$  dpm/mMol. Die dunkelbraune Reaktionslösung filtrierte man durch eine Glasfritte (15 mg dunkel gefärbter Rückstand), verdünnte das Filtrat mit 30 ccm Wasser und nahm den dabei ausgefallenen, hellbraunen Niederschlag nach Abfiltrieren mit gesätt.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung auf. Extraktion des Filtrates mit Essigester ergab nach Trocknen mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  77.2 mg Eindampfrückstand A. Die Hydrogencarbonatlösung säuerte man mit 5 *n* HCl an, extrahierte mit Essigester und sublimerierte den dunkelbraunen Rückstand des Extraktes B bei  $150^\circ/10^{-3}$  Torr: 27.5 mg (27%) *5-Hydroxy-3-methyl-benzoessäure (20)* vom Schmp.  $210 - 221^\circ$  und der spezif. Aktivität  $2.6 \cdot 10^3$  dpm/mMol. Der Eindampfrückstand A wurde auf einer 1.5-mm-Schichtplatte aus weinsaurem Kieselgel G mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (95:5) chromatographisch aufge-

trennt. Die hellgelbe Hauptzone ( $R_F$  0.45) eluierte man mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1 : 1), wusch den Eindampfrückstand des Eluates mit Wasser neutral, nahm zur Überführung in einen besser löslichen, amorphen Zustand in Aceton auf und dampfte wieder ein. Der Rückstand (52.5 mg) wurde aus Essigester/Petroläther (10 : 1) umkristallisiert. 23 mg gelbe Nadeln von 2-[2.4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergoflavin (**23**), Schmp. 193–195° (Lit.<sup>7)</sup>: 195°, spezif. Aktivität  $<10^4$  dpm/mMol.

IR (KBr): 3400 s (OH), 1775 s ( $\gamma$ -Lacton), 1635 s (Aryl-CO, cheliert), 1450 s, 1420 m, 1100 m, 1017 m, 848 m, 830 m, 809/cm s.

f) *Abbau des radioaktiven Ergochroms BC (6) mit Acetanhydrid und HBr*: 15.4 mg radioaktives Ergochrom BC (**6**) der spezif. Akt.  $5 \cdot 10^6$  dpm/mMol wurden nach Zufügen von 345 mg inaktivem Ergochrom BC 3 mal aus je 4 ccm  $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$  (10 : 1) bis zur konstanten spezif. Aktivität umkristallisiert. 245.4 mg Ergochrom BC von  $2.01 \cdot 10^5$  dpm/mMol. Hiermit wurde der Abbau wie bei Versuch e) durchgeführt. Das ergab: 28.1 mg (53%)  $\text{BaCO}_3$ , spezif. Aktivität  $7.18 \cdot 10^2$  dpm/mMol; 18.8 mg (42%) 5-Hydroxy-3-methyl-benzoessäure (**20**), spezif. Aktivität  $5.27 \cdot 10^4$  dpm/mMol; 7.7 mg (6.8%) 2-[2.4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergoflavin (**23**), spezif. Aktivität  $1.3 \cdot 10^5$  dpm/mMol; 6.5 mg (4%) Desmethoxy-ergochrom BC (**22**) als Nebenprodukt der Reaktion, spezif. Aktivität  $1.94 \cdot 10^5$  dpm/mMol.

g) *Identifizierung der Abbauprodukte aus inaktivem Ergochrom BC (6)*: 150 mg (0.24 mMol) Ergochrom BC wurden, wie beschrieben, einem Abbau mit Acetanhydrid und HBr unterworfen und das Reaktionsprodukt auf 1-mm-Schichtplatten aus weinsaurem Kieselgel G mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (40 : 1) chromatographisch aufgetrennt. Aus den 3 Zonen wurden isoliert:

10 mg (43%) 5-Hydroxy-3-methyl-benzoessäure (**20**), Schmp. 211°; 8.2 mg (13%) 2-[2.4-Dihydroxy-phenyl]-hemiergoflavin (**23**) in gelben Nadeln vom Schmp. 190–192° (Lit.<sup>7)</sup>: 195°; 11 mg (12%) Desmethoxy-ergochrom BC (**22**) in gelben Nadeln aus  $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$  (1 : 1) vom Schmp. 192–194° (Zers.). IR (KBr): 3250 m (OH), 1720 s ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 1600 s, 1560 w, 1390 m 1020 m, 950/cm m.

Das Desmethoxy-ergochrom BC (**22**) ließ sich auf folgende Weise zu Ergochrom BC (**6**) methylieren. Eine Lösung von 10 mg **22** in 2 ccm absol.  $\text{CH}_3\text{OH}$  wurde mit 2 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt und 12 Stdn. bei 60° gehalten. Dann setzte man 10 ccm Wasser hinzu, extrahierte 3 mal mit je 10 ccm  $\text{CHCl}_3$ , dampfte die vereinigten und getrockneten Auszüge ein und kristallisierte den Rückstand aus  $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$  (10 : 1) um. 5 mg gelbe Nadeln, die nach IR-Banden und  $R_F$ -Wert mit Ergochrom BC identisch sind.

Außerdem wurde **22** auch durch direkte Einwirkung von HBr/Eisessig auf Ergochrom BC dargestellt. 10 mg Ergochrom BC kochte man mit 1 ccm Eisessig und 2 Tropfen 48proz. Bromwasserstoffsäure 1 Stde. unter Rückfluß. Schichtchromatographische Reinigung und Umkristallisieren des Reaktionsproduktes aus  $\text{CHCl}_3$  ergab 4.8 mg (51%) Desmethoxy-ergochrom BC, identifiziert durch IR-Banden,  $R_F$ -Wert und Schmp. (194°, Zers.).

### Isolierung und Abbau radioaktiver Ergochrome nach Verfütterung von [1-<sup>14</sup>C]Natriumacetat

Eine Lösung von 0.5 mC [1-<sup>14</sup>C]Natriumacetat (Radiochemical Centre, Amersham, 1.41 mg, spezif. Aktivität 29.0 mC/mMol) und 43.4 mg inaktivem  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  in 55 ccm Wasser wurde steril filtriert. 52.1 ccm dieser Lösung verteilte man, wie oben für <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na beschrieben, auf 10 Oberflächenkulturen des japanischen Stammes 467 und isolierte nach 17 Tagen die nachstehenden Mengen chromatographisch reiner radioaktiver Ergochrome: 42.3 mg Ergochrom BC (**6**); 13.2 mg Ergochrom AB (**3**); 10.1 mg Ergochrom AC (**5**); 7.0 mg Ergochrom BB (**2**).

a) *Kuhn-Roth-Oxydation des radioaktiven Ergochroms AB (3)*: 13.2 mg des radioaktiven Ergochroms AB wurden mit 250 mg inaktivem Ergochrom AB versetzt und 2 mal bis zur konst. spezif. Aktivität von  $3.65 \cdot 10^5$  dpm/mMol aus Benzol/Cyclohexan (10 : 1) umkristalli-

siert. 25 mg hiervon, wie oben mit  $\text{CrO}_3$  oxydiert, ergaben 0.055 mMol (70%) *Essigsäure* der spezif. Aktivität  $2.20 \cdot 10^4$  dpm/mMol und 89.3 mg (41%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $9.12 \cdot 10^3$  dpm/mMol. Die wäbr. Lösung des Acetates wurde eingedampft und der Rückstand nach Zufügen von 20 mg inaktivem Acetat einem Schmidt-Abbau unterworfen. Die spezif. Aktivität des  $\text{CO}_2$  aus der  $\text{CO}_2\text{H}$ -Gruppe betrug  $2.2 \cdot 10^4$  dpm/mMol.

b) *Abbau des radioaktiven Ergochroms AB (3) mit Acetanhydrid und HBr*: 180 mg *Ergochrom AB* der spezif. Aktivität  $3.65 \cdot 10^5$  dpm/mMol wurden, wie oben beschrieben, mit *Acetanhydrid* und *HBr* behandelt und ergaben 59.1 mg (53%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $1.28 \cdot 10^4$  dpm/mMol und 29.1 mg (34%) *5-Hydroxy-3-methyl-benzoessäure (20)* der spezif. Aktivität  $4.99 \cdot 10^4$  dpm/mMol. 23 mg der Säure wurden nach *Schmidt* abgebaut. Die spezif. Aktivität der erhaltenen 28.4 mg (95%)  $\text{BaCO}_3$  betrug  $1.5 \cdot 10^2$  dpm/mMol.

c) *Abbau des radioaktiven Ergochroms AC (5) mit Acetanhydrid und HBr*: 7 mg *radioaktives Ergochrom AC* aus dem Fütterungsversuch wurden mit 200 mg inaktivem Ergochrom AC versetzt und aus Aceton/ $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$ <sup>8)</sup> bis zur konstanten spezif. Aktivität von  $8.8 \cdot 10^4$  dpm/mMol umkristallisiert. 150 mg hiervon behandelte man wie oben mit *Acetanhydrid* und *HBr* und erhielt 29.5 mg (63%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $4.7 \cdot 10^3$  dpm/mMol, sowie 10.2 mg (28%) *Säure 20* der spezif. Aktivität  $1.92 \cdot 10^4$  dpm/mMol. 5.0 mg davon, mit 15.0 mg inaktiver Säure **20** verdünnt und nach *Schmidt* abgebaut, lieferten 23.2 mg (91%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $2.6 \cdot 10^2$  dpm/mMol.

#### Isolierung und Abbau radioaktiver Ergochrome nach Verfütterung von $[2\text{-}^3\text{H}]$ Natriumacetat

Eine Lösung von 25 mC  $[2\text{-}^3\text{H}]$ Natriumacetat (Radiochemical Centre, Amersham, 8.2 mg, spezif. Aktivität 249 mC/mMol) und 120 mg inaktivem  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  in 55 ccm Wasser wurde steril filtriert. 51.6 ccm dieser Lösung verteilte man wie bei den vorhergehenden Versuchen auf 10 Oberflächenkulturen des japanischen Stammes 467 und isolierte nach 17 Tagen die nachstehenden Mengen chromatographisch reiner, radioaktiver Ergochrome: 42.5 mg *Ergochrom BD (8)*; 21.0 mg *Ergochrom BB (2)*; 20.7 mg *Ergochrom BC (6)*; 12.0 mg *Ergochrom AC (5)*; 7.4 mg *Ergochrom AB (3)*; 5.0 mg *Ergochrom CC (4)*, zusammen mit einer schwachen Nebenzone.

a) *Kuhn-Roth-Oxydation des radioaktiven Ergochroms BC (6)*: 18 mg tritium-markiertes *Ergochrom BC* aus dem Fütterungsversuch wurden zusammen mit 150 mg inaktivem Ergochrom BC 3 mal aus  $\text{CHCl}_3/\text{CCl}_4$  bis zur konstanten spezif. Aktivität  $3.64 \cdot 10^6$  dpm/mMol umkristallisiert. 25 mg hiervon, wie oben beschrieben mit  $\text{CrO}_3$  oxydiert, ergaben 0.0644 mMol (80%) *Natriumacetat* der spezif. Aktivität  $1.13 \cdot 10^6$  dpm/mMol.

b) *Kontrollversuch nach Simon und Floss*<sup>22)</sup> *zur Bestimmung des H/T-Austausches bei der Kuhn-Roth-Oxydation von Ergochromen*: 50 mg *inaktives Ergochrom AB* wurden in einer Mischung aus 3 ccm konz. Schwefelsäure, 28 mg  $\text{CrO}_3$  und 11 ccm  $[^3\text{H}]$ Wasser (spezif. Radioaktivität  $3.9 \cdot 10^6$  dpm/mMol) oxydiert und das erhaltene *Natriumacetat* (11.4 mg = 90%) durch Umfällen aus Methanol/Äther gereinigt. Es hatte eine spezif. Radioaktivität von  $4.4 \cdot 10^5$  dpm/mMol = 13% der des tritiumhaltigen  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ -Gemisches.

c) *Methoxylaktivität des radioaktiven Ergochroms BC (6)*: 10 mg (0.016 mMol) *Ergochrom BC* der spezif. Aktivität  $3.64 \cdot 10^6$  dpm/mMol, eine Spatelspitze roten Phosphors, 2 ccm *HJ* (*d* 1.70) und 5 Tropfen Acetanhydrid wurden in den Reaktionskolben einer Zeisel-Apparatur (Quickfit) gegeben. Die mit dem Kühler der Apparatur verbundene Waschflasche enthielt eine Suspension von 10 g rotem Phosphor in 25 ccm Wasser und das anschließende Absorptionsgefäß 5 ccm einer 5proz. äthanol. *Triäthylaminlösung*. Unter Durchleiten eines schwachen  $\text{N}_2$ -Stromes erhitzte man das Reaktionsgemisch eine Stde. zum Sieden, ließ die Vorlage über Nacht stehen und dunstete dann deren Inhalt unter einer Infrarotlampe zur Trockne ein. 9.1 mg (>90%) *Methyltriäthylammoniumjodid* der spezif. Aktivität  $6.9 \cdot 10^4$  dpm/mMol.

d) *Desmethoxy-ergochrom BC* aus radioaktivem *Ergochrom BC* (6): Eine Lösung von 40 mg (0.064 mMol) tritium-markiertem *Ergochrom BC* der spezif. Aktivität  $3.64 \cdot 10^6$  dpm/mMol in 10 ccm *Eisessig* kochte man mit 0.5 ccm 48proz. *Bromwasserstoffsäure* 3 Stdn. unter Rückfluß, engte anschließend ein, versetzte mit 50 ccm Wasser und extrahierte 3 mal mit je 50 ccm  $\text{CHCl}_3$ . Der Rückstand der vereinigten und getrockneten Auszüge wurde auf einer 1-mm-Schichtplatte aus weinsaurem Kieselgel G mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (33:1) chromatographisch aufgetrennt. Neben wenig unverändertem *Ergochrom BC* (6) ( $R_F$  0.35) erhielt man 26 mg (67%) nahe der Startlinie zurückbleibendes *Desmethoxy-ergochrom BC* (22) vom Schmp.  $196^\circ$  (Zers.) und der spezif. Aktivität  $3.15 \cdot 10^6$  dpm/mMol.

#### Isolierung und Aktivitätsbestimmung von *Ergochrom BC* (6) nach Verfütterung von [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ]-*Shikimisäure*

Eine steril filtrierte Lösung von 19.2 mg [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ]*Shikimisäure*, spezif. Aktivität  $3 \cdot 10^8$  dpm/mMol (biosynthetisch gewonnen) wurde wie bei der Verfütterung von [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ]Na-acetat auf drei gut angewachsene, 22 Tage alte Oberflächenkulturen des japanischen *Claviceps*-Stammes 467 verteilt. Nach weiteren 13 Tagen isolierte man das Rohfarbstoffgemisch und trennte daraus durch Schichtchromatographie 14.2 mg chromatographisch reines *Ergochrom BC* (6) ab. Dessen spezif. Aktivität lag mit  $<10$  dpm/mg im Bereich des Blindwertes.

[557/67]