

Detlef Gröger\*, Dieter Erge\*, Burchard Franck\*\*, Ulrich Ohnsorge\*\*,  
Hubert Flasch\*\* und Fritz Hüper\*\*

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

## Emodin als Biosynthesestufe der Ergochrome

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

(Eingegangen am 13. Dezember 1967)

Durch Wilzbach-Tritierung bzw. Verfütterung von [2-<sup>14</sup>C]Natriumacetat an *Penicillium Islandicum* wurden [U-<sup>3</sup>H]- und [U-<sup>14</sup>C]Emodin (**5**) dargestellt und deren Radioaktivitätsverteilung untersucht. Ihrerseits an Flüssigkeitskulturen des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* verfüttert, ergaben die beiden markierten Emodine mit spezif. Einbauraten von 1.2 bzw. 0.5% radioaktive Ergochrome. Diese entstehen, wie ihre Radioaktivitätsverteilung zeigt, durch direkte Umwandlung des Anthrachinons Emodin unter oxydativer Aufspaltung des chinoiden Ringes.

In vorhergehenden Veröffentlichungen berichteten wir über die Untersuchung der Biosynthese der Ergochrome<sup>2–6)</sup> durch Verfütterung <sup>14</sup>C- und <sup>3</sup>H-markierter Acetate an Oberflächenkulturen eines japanischen Mutterkorn-Stammes<sup>1, 7)</sup>. Die markierten Atome der Acetate waren in den Ergochromen (**8a**, **8c** u. a.) so verteilt, wie es zu erwarten ist, wenn diese durch oxydative Ringöffnung aus einem Anthrachinon wie Emodin (**5**) gebildet werden, das seinerseits aus Essigsäure hervorgeht. In der vorliegenden Arbeit werden nun Fütterungsversuche mit <sup>14</sup>C- und <sup>3</sup>H-markiertem Emodin beschrieben. Die Fütterungsversuche mit markiertem Acetat<sup>1)</sup> ließen für die Struktur der Biosynthesestufe, die unmittelbar vor den Ergochromen steht, mehrere Möglichkeiten offen. Es konnte angenommen werden, daß bei der Biosynthese einer Ergochromhälfte wie z. B. **7a**–**7c** zunächst acht Acetateinheiten über Malonyl- und Acetyl-Coenzym A zu einer hypothetischen<sup>1, 8)</sup> Heptaketopalmitinsäure (**1**) und weiter unter Decarboxylierung zum Emodinanthron (**3**) kondensieren. Letzteres geht durch

<sup>1)</sup> XVII. Mitteil.: B. Franck, F. Hüper, D. Gröger und D. Erge, Chem. Ber. **101**, 1954 (1968), vorstehend.

<sup>2)</sup> B. Franck und G. Baumann, Chem. Ber. **99**, 3863 (1966).

<sup>3)</sup> B. Franck, E. M. Gottschalk, U. Ohnsorge und F. Hüper, Chem. Ber. **99**, 3842 (1966).

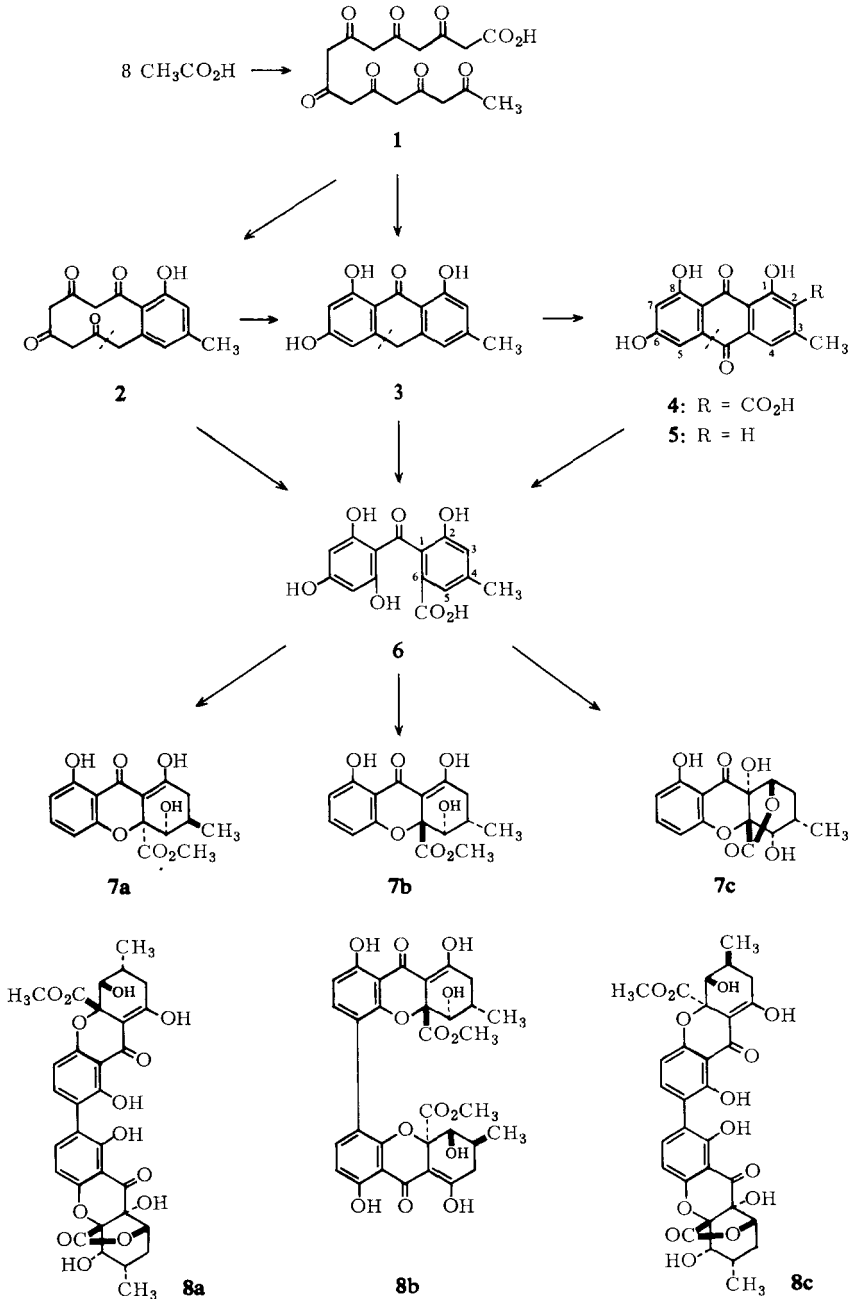
<sup>4)</sup> B. Franck, E. M. Gottschalk, U. Ohnsorge und G. Baumann, Angew. Chem. **76**, 438, 864 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 441, 763 (1964).

<sup>5)</sup> B. Franck und G. Baumann, Chem. Ber. **99**, 3875 (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.

<sup>7)</sup> B. Franck, F. Hüper, D. Gröger und D. Erge, Angew. Chem. **78**, 752 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. **5**, 728 (1966).

<sup>8)</sup> S. Gatenbeck, Acta chem. scand. **12**, 1211 (1958).



Oxydation leicht in Emodin (5) über. Auf diesem Wege erfolgt nach Fütterungsversuchen mit <sup>14</sup>C- und <sup>18</sup>O-markiertem Acetat, die *Gatenbeck*<sup>8)</sup> an *Penicillium islandicum* durchführte, die Biosynthese des Emodins. Wie aus unseren Fütterungs-

versuchen mit markierten Acetaten zu schließen ist, besteht der nächste Schritt der Ergochrom-Biosynthese darin, daß entweder am Emodin (5) oder an Vorstufen wie 2 und 3 eine oxydative Ringöffnung (---) erfolgt. Auf diese Weise entsteht ein Benzophenon-Derivat (6), dessen weitere Umwandlung nach Hydroxylierung an C-5 über 7a, 7b und 7c in Ergochrome (z. B. 8a, 8b und 8c) nach dem Mechanismus der Phenoloxydation verständlich ist.

### Verfütterung von [U-<sup>3</sup>H]Emodin<sup>10)</sup> und [U-<sup>14</sup>C]Emodin<sup>10)</sup>

Zur Tritierung wurde Emodin (5) nach dem Wilzbach-Verfahren<sup>9,11)</sup> während 3 Wochen der Einwirkung von 10 C Tritiumgas unterworfen. Das ergab nach Austausch des labilen Tritiums und sorgfältiger Reinigung ein kristallisiertes Emodin mit der spezif. Tritium-Radioaktivität 11.6 mC/mMol.

Tab. 1. Spezif. Radioaktivitäten (mC/mMol) und spezif. Einbauraten<sup>13)</sup> (in %) bei der Verfütterung von [U-<sup>3</sup>H]Emodin<sup>10)</sup>

	Gesamtaktivität	Einbaurate	C-Methyl-Aktivität
Emodin (5)	11.6		0.99 (8.5%)
Ergochrom AC (8a)	0.29	1.3	0.022 (7.6%)
Ergochrom BC (8c)	0.34	1.5	s. l. c. <sup>14a)</sup>

Wie bei Wilzbach-Tritierungen anderer Methyларomaten<sup>11,12)</sup> befindet sich das Tritium überwiegend an den aromatischen Kernen. So betrug die durch Kuhn-Roth-Oxydation ermittelte C-Methyl-Radioaktivität nur 8.5% der Gesamtaktivität (Tab. 1). Die Verfütterung des [U-<sup>3</sup>H]Emodins an *Claviceps purpurea* erfolgte analog unseren vorhergehenden Versuchen<sup>1,7)</sup>, jedoch unter Zusatz von Propylenglykol und Tween 20 als Lösungsvermittlern. Aus dem anschließend isolierten radioaktiven Rohergochrom-Gemisch wurden die Ergochrome AC (8a) und BC (8c) durch Chromatographieren an weinsaurem Kieselgel abgetrennt und bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert.

Tab. 1 zeigt die spezif. Gesamtaktivitäten der Ergochrome AC und BC. Daraus ergeben sich gut übereinstimmende spezif. Einbauraten<sup>13)</sup> von 1.3 und 1.5%.

Es könnte der Einwand erhoben werden, daß die Tritium-Radioaktivität des [U-<sup>3</sup>H]Emodins möglicherweise nicht direkt in die Ergochrome gelangt, sondern erst nach einem Abbau zu radioaktiver Essigsäure und deren erneuter Kondensation. In diesem Falle sollte ebenso wie bei der Verfütterung von [2-<sup>3</sup>H]Natriumacetat<sup>1)</sup>

<sup>9)</sup> K. E. Wilzbach, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1013 (1957).

<sup>10)</sup> „U“ (uniform) dient hier, wie andernorts<sup>11)</sup> zur Kennzeichnung einer Radioaktivitätsverteilung, die sich in nicht vollständig geklärter Weise über die Mehrzahl der betreffenden Atome des Moleküls erstreckt.

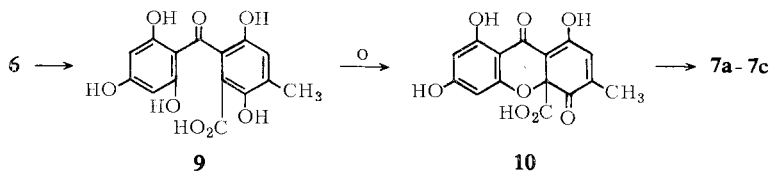
<sup>11)</sup> E. A. Evans, Tritium and its Compounds, Butterworths, London 1966; H.-R. Schütte, Radioaktive Isotope in der organischen Chemie und Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1966.

<sup>12)</sup> F. Cacace, Proc. Symp. Chem. Effects Nucl. Transformations, I. A. E. A., [Wien] **2**, 155 (1961).

<sup>13)</sup> Da die Ergochrome aus 2 Emodin-Einheiten hervorgehen, wurde zur Berechnung der spezif. Einbauraten jeweils die spezif. Radioaktivität des Ergochroms durch 2 dividiert.

die Radioaktivität überwiegend in die Fettfraktion und nur zu einem kleinen Bruchteil in die Ergochrome übergehen. Es wurde daher auch die Gesamtaktivität der nach Verfütterung von [U-<sup>3</sup>H]Emodin isolierten Ergochrome sowie der gereinigten Lipide bestimmt. Die Radioaktivität der Lipide betrug mit 0.35  $\mu$ C nur 0.14% der in den Ergochromen enthaltenen (240  $\mu$ C). Hierdurch ist sichergestellt, daß der Einbau des Emodin-Tritiums in die Ergochrome nicht auf dem Umweg über die Essigsäure erfolgt.

Bemerkenswert ist, daß die prozentuale C-Methyl-Radioaktivität des Ergochroms AC (**8a**) (7.6%) mit der des [U-<sup>3</sup>H]Emodins (**5**) (8.5%) nahezu übereinstimmt. Die <sup>3</sup>H-Radioaktivität der C-Methylgruppe hätte statt dessen gegenüber der Gesamtaktivität zunehmen müssen, da beim Übergang von [U-<sup>3</sup>H]Emodin in Ergochrom AC das Tritium an den aromatischen C-Atomen 4 und 5 oder 7 (s. **5**) durch Substitution entfernt wird. Daraus folgt, daß auch die C-Methylgruppe <sup>3</sup>H-Radioaktivität verliert. Dies läßt sich mit der Annahme erklären, daß bei der Biosynthese einer Ergochromhälfte aus [U-<sup>3</sup>H]Emodin eine Zwischenstufe durchlaufen wird, in der das Tritium der Methylgruppe labil ist. Eine solche Zwischenstufe (**10**) muß auftreten, wenn das durch Ringöffnung von Emodin (**5**) gebildete Benzophenon-Derivat **6** nach Hydroxylierung an C-5 zu **9** durch Phenoloxydation in eine Ergochrom-Hälfte (**7a–7c**) übergeht. In der Zwischenstufe **10** befindet sich die Methylgruppe an einem vinylogenen Carbonyl-System, das Acidität und Austauschbarkeit des Methyl-Tritiums erhöht<sup>11)</sup>. Somit kann die geringe Änderung der prozentualen C-Methyl-Radioaktivität bei der Umwandlung von [U-<sup>3</sup>H]Emodin (**5**) in Ergochrom AC (**8a**) als Stütze für die Annahme dieses Biosynthesemechanismus angesehen werden<sup>14a)</sup>.



Zur Ergänzung der mit [U-<sup>3</sup>H]Emodin erhaltenen Ergebnisse wurde ein Fütterungsversuch mit [U-<sup>14</sup>C]Emodin durchgeführt. [U-<sup>14</sup>C]Emodin<sup>10)</sup> der spezif. Radioaktivität  $5.3 \cdot 10^7$  dpm/mMol (Tab. 2) gewannen wir nach [2-<sup>14</sup>C]Natriumacetat-Fütterung aus Oberflächenkulturen von *Penicillium islandicum*. Darin müssen seiner Biosynthese<sup>8)</sup> entsprechend die radioaktiven Methyl-C-Atome des Acetats alternierend angeordnet sein. Zur Kontrolle wurde eine Kuhn-Roth-Oxydation durchgeführt, die gebildete Essigsäure (**11**) einem Schmidt-Abbau<sup>14)</sup> unterworfen und das dabei erhaltene Methylamin weiter zu CO<sub>2</sub> (**b**) oxydiert. Die Radioaktivität des [U-<sup>14</sup>C]Emodins (**5**) und der Abbauprodukte (**11**, **a**, **b**, **c**) stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit der Erwartung überein (Tab. 3).

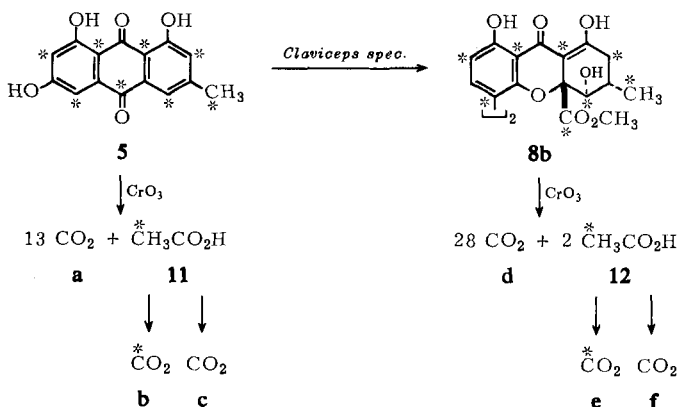
<sup>14a)</sup> *Anm. b. d. Korr.* (1. 4. 1968): Die nachträglich bestimmte prozentuale C-Methyl-Radioaktivität des Ergochroms BC (**8c**) ist mit 1.6% noch geringer, als die von Ergochrom AC (**8a**). Danach ist anzunehmen, daß der Tritiumaustausch aus der C-Methylgruppe während der Biosynthese der konfigurativ ähnlichen Ergochrom-Hälften **B** (**7b**) und **C** (**7c**) rascher erfolgt, als bei der Ergochrom-Hälfte **A** (**7a**).

<sup>14)</sup> H. Simon und H. G. Floss, Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen, S. 23, Springer-Verlag, Heidelberg 1967.

Tab. 2. Spezif. Radioaktivitäten (dpm/mMol) und spezif. Einbauraten in (%<sup>13</sup>) bei der Verfüterung von [U-<sup>14</sup>C]Emodin<sup>10</sup>

	Radioaktivität	Einbaurate
Emodin ( <b>5</b> )	5.3 · 10 <sup>7</sup>	
Ergochrom BB ( <b>8b</b> )	4.0 · 10 <sup>5</sup>	0.38
Ergochrom BC ( <b>8c</b> )	6.4 · 10 <sup>5</sup>	0.60

Nach Verfüterung des [U-<sup>14</sup>C]Emodins an Oberflächenkulturen des japanischen *Claviceps*-Stammes unter Zusatz von Lösungsvermittlern (s. o.) wurde reines, radioaktives Ergochrom BB (**8b**) als Hauptfarbstoff und in geringerer Menge Ergochrom BC (**8c**) isoliert. Die aus den spezif. Radioaktivitäten dieser Ergochrome berechneten Einbauraten<sup>13</sup> (Tab. 2) für das <sup>14</sup>C-markierte Emodin liegen im Bereich derjenigen des [U-<sup>3</sup>H]Emodins (Tab. 1). Vom <sup>14</sup>C-markierten Ergochrom BB (**8b**) wurde nach Abbau die Radioaktivität der C-Atome aus der Kuhn-Roth-Essigsäure sowie die der übrigen als CO<sub>2</sub> aufgefangenen C-Atome bestimmt (Tab. 3). Die hieran ermittelte Radioaktivitätsverteilung ist der des verfüterten Emodins analog, so daß auf dessen direkte Umwandlung in Ergochrom BB geschlossen werden kann.

Tab. 3. Kuhn-Roth-Abbau des <sup>14</sup>C-markierten Emodins (**5**) und Ergochroms BB (**8b**)

Substanz	spezif. Radioaktivität (dpm/mMol)	<sup>14</sup> C-markierte Atome	
		Ber.	Gef. *)
Emodin ( <b>5</b> )	3.88 · 10 <sup>6</sup>	8	8
CO <sub>2</sub> ( <b>a</b> )	2.5 · 10 <sup>5</sup>	7	6.7
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H ( <b>11</b> )	3.8 · 10 <sup>5</sup>	1	0.8
CO <sub>2</sub> ( <b>b</b> )	3.4 · 10 <sup>5</sup>	1	0.7
CO <sub>2</sub> ( <b>c</b> )	8.5 · 10 <sup>3</sup>	0	0.02
Ergochrom BB ( <b>8b</b> )	1.05 · 10 <sup>5</sup>	16	16
CO <sub>2</sub> ( <b>d</b> )	3.1 · 10 <sup>3</sup>	14	13.2
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H ( <b>12</b> )	5.4 · 10 <sup>3</sup>	1	0.8
CO <sub>2</sub> ( <b>e</b> )	3.7 · 10 <sup>3</sup>	1	0.6
CO <sub>2</sub> ( <b>f</b> )	3.2 · 10 <sup>2</sup>	0	0.05

\*) Die gefundenen Werte sind jeweils auf die Radioaktivität des Emodins (**5**) mit 8, bzw. auf die des Ergochroms BB (**8b**) mit 16 markierten C-Atomen bezogen.

## Diskussion der Ergebnisse

Wie eingangs erläutert, hatten die an *Claviceps spec.* durchgeführten Fütterungsversuche mit markierten Acetaten<sup>1,7)</sup> ergeben, daß deren Methyl-C-Atome in den Ergochromen (**8a**–**8c**) analog angeordnet sind wie im Emodin (**5**), und daß auch das Carboxyl-C-Atom einer Essigsäure-Methylgruppe entstammt. Damit war es wahrscheinlich, daß die Ergochrome bei ihrer Biosynthese aus einer Anthrachinon-Vorstufe hervorgehen. Außerdem bestand jedoch die Möglichkeit, daß die ähnliche Verteilung der Essigsäure-C-Atome in den Ergochromen und im Emodin nur durch gemeinsame Anfangsstadien der Biosynthese verursacht ist. Nach den Fütterungsversuchen mit [U-<sup>3</sup>H]Emodin und [U-<sup>14</sup>C]Emodin ist nun gesichert, daß dieses Anthrachinon die biogenetische Vorstufe der Ergochrome darstellt. Die Umwandlung des Emodins in Ergochrome muß durch eine oxydative Ringöffnung erfolgen. Eine solche Ringöffnung ist sowohl in der wohluntersuchten Anthrachinon-Chemie als auch im Stoffwechsel der Anthrachinone bisher unbekannt. Es handelt sich somit bei den Ergochromen um „*seco-Anthrachinone*“, deren Biosynthese neuartige Zusammenhänge zeigt. Kürzlich durchgeführte Modellversuche<sup>15)</sup> zur Aufklärung des chemischen Mechanismus der oxydativen Ringöffnung lassen vermuten, daß diese nicht am Anthrachinon selbst, sondern über das Anthron und dessen Hydroperoxid erfolgt. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu der im Fütterungsversuch festgestellten Umwandlung des Anthrachinons Emodin (**5**) in Ergochrome (z. B. **8a**–**8c**), da Emodin im Zellmilieu sehr leicht zu Emodinanthron (**3**) reduziert werden könnte.

Von besonderem Interesse ist weiterhin die Frage, ob der Mutterkornpilz die oxydative Ringöffnung vor oder nach Dimerisierung der Molekülhälften vollzieht und in welcher Reihenfolge er die zehn Ergochrome mit ihren zahlreichen Chiralitätszentren entstehen läßt. Für eine Ringöffnung nach der Dimerisierung spricht die Tatsache, daß aus Sklerotien<sup>15)</sup> und Mycel von Oberflächenkulturen<sup>16)</sup> keine monomeren Ergochromhälften, wohl aber die monomeren Emodin-Derivate Endocrocin (**4**)<sup>17)</sup> und Clavorubin<sup>18)</sup> isoliert werden konnten. Über Untersuchungen zur biogenetischen Sequenz der Ergochrome werden wir in einer weiteren Arbeit berichten.

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

## Beschreibung der Versuche

Die Radioaktivität der <sup>14</sup>C- und <sup>3</sup>H-markierten Präparate wurde, wie in der vorhergehenden Arbeit<sup>1)</sup> beschrieben, mit dem Packard-Flüssigscintillationszähler Tricarb 3314 bestimmt. Zur Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen radioaktiver Stoffe diente der Radiochromatogramm-Scanner Berthold. Für analytische und präparative Trennungen auf Schichtchromatogrammen verwendete man mit 7.5proz. wäßr. Weinsäure imprägniertes<sup>3)</sup> Kieselgel G (E. Merck).

<sup>15)</sup> B. Franck, V. Radtke und U. Zeidler, Angew. Chem. **79**, 935 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. **6**, 952 (1967); V. Radtke, Dissertat., Univ. Kiel, vorauss. 1968.

<sup>16)</sup> D. Gröger, Planta med. **8**, 430 (1960).

<sup>17)</sup> B. Franck und T. Reschke, Chem. Ber. **93**, 347 (1960).

<sup>18)</sup> B. Franck und I. Zimmer, Chem. Ber. **98**, 1514 (1965).

*Bestimmung der Radioaktivität von C-Methylgruppen:* Zur Ausführung der Kuhn-Roth-Oxydation wurde jeweils eine Lösung von 30–40 mg Substanz in 2 ccm konz. Schwefelsäure unter Kühlung mit 8 ccm 5 n wäßr.  $H_2CrO_4$  versetzt, 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht, die Reaktionslösung mit 9 ccm gesätt.  $Na_2SO_4$ -Lösung in eine Mikrowasserdampfdestillationsapparatur (Quickfit) gespült und die Essigsäure unter Ersetzen des mit übergelenden Wassers abdestilliert. Titration der Vorlage mit 0.01 n NaOH gegen Phenolphthalein ergab die molare Menge der abdestillierten *Essigsäure*. Die bis zur deutlichen Rotfärbung übertitrierten Lösungen dampfte man bei 100° zur Trockne.

*Tritium-Markierung des Emodins (5):* 505 mg reines *Emodin* (Schmp. 250–252°, Zers.), das durch Umkristallisieren eines Produktes aus dem Handel (Fluka) gewonnen war, wurden im Radiochemical Centre in Amersham/England 3 Wochen mit 10 C *Tritiumgas* behandelt. Das Reaktionsprodukt (490 mg) der Gesamtaktivität 1.5 C nahm man zur Entfernung labilen Tritiums in 500 ccm Äthanol auf, kochte 3 Stdn. unter Rückfluß, dampfte zur Trockne ein und wiederholte dies noch zweimal. Der Rückstand wurde mit 300 ccm  $CHCl_3$  ausgekocht, um leichter lösliche Verunreinigungen abzutrennen, und danach aus  $CHCl_3$  umkristallisiert. 205 mg in orangefarbenen Prismen kristallisiertes *Emodin* (5) der spezif. Tritium-Aktivität 11.6 mC/mMol = 0.043 mC/mg.

*C-Methyl-Radioaktivität des tritium-markierten Emodins (5):* Eine Lösung von 1.830 mg *tritium-markiertem Emodin* (spezif. Aktivität 11.6 mC/Mol) und 34.65 mg inaktivem *Emodin* in 50 ccm Methanol ergab nach Eindampfen ein *Emodin* der spezif. Tritiumaktivität 0.580 mC/mMol. Hieraus wurden nach Kuhn-Roth-Oxydation 3.06 mg (0.05 mMol) *Essigsäure* der spezif. Aktivität 0.0494 mC/mMol entsprechend 8.50% der Gesamtaktivität erhalten.

*Isolierung von radioaktivem Ergochrom BC (8c) und Ergochrom AC (8a) nach Verfütterung von  $^3H$ -markiertem Emodin (5):* 66 ccm einer Lösung von 4.3 mC [ $U\text{-}^3H$ ] *Emodin* (100 mg der spezif. Aktivität 11.6 mC/mMol) und 2.7 g Tween 20 (Schuchardt) in 77 ccm Propylenglykol spritzte man in gleichen Anteilen unter die Myceldecke von 16 gut angewachsenen, 17 Tage alten Oberflächenkulturen des japanischen Stammes 467 von *Claviceps spec.* Die Gesamtaktivität an verfüttertem [ $U\text{-}^3H$ ] *Emodin* betrug 3.55 mC. Das nach 17 Tagen abgeseibte, bei 50° i. Vak. getrocknete und zerriebene Mycel (67.9 g) entfettete man durch 2mal 6stdg. Kochen mit je 500 ccm Petroläther, kochte dann 3mal mit je 500 ccm  $CHCl_3$  6 Stdn. unter Rückfluß, versetzte den öligen Rückstand der vereinigten  $CHCl_3$ -Auszüge mit 80 ccm Petroläther und filtrierte den ausgefällten, hellbraunen Rohfarbstoff (1.06 g) ab. Die Petrolätherlösung wurde zusammen mit dem Petroläthervorextrakt eingedampft und ergab 15.3 g dunkel gefärbte *Lipoid*e der Radioaktivität 0.038 mC (spezif. Aktivität 2.5 nC/mg). Aus einem aliquoten Teil der *Lipoid*e entfernte man Farbstoffe und polare Verunreinigungen durch Filtrieren der Petrolätherlösung über eine kurze Säule von  $Al_2O_3$  und bestimmte die Radioaktivität des hellgelben, öligen Eluatrückstandes. Von den auf diese Weise gereinigten *Lipoid*en können 13.4 g mit einer Radioaktivität von nur 350 nC (spezif. Aktivität 0.026 nC/mg) gewonnen werden.

500 mg des Rohfarbstoffes wurden mit  $CHCl_3 + 3\% CH_3OH$  an einer Säule (50 × 4.5 cm) aus 500 g weinsaurem Kieselgel G chromatographisch aufgetrennt. Neben *Emodin* (5) und weiteren Fraktionen, die nicht weiter gereinigt und untersucht wurden, erhielt man so 152 mg *Ergochrom*-Gemisch, das erneut mit  $CHCl_3 + 1.5\% CH_3OH$  an einer Säule (50 × 3.5 cm) von 300 g weinsaurem Kieselgel G chromatographiert wurde. Die Eluate mit reinem *Ergochrom BC* (8c) faßte man zusammen, wusch sie mit Wasser neutral und kristallisierte den Eindampfrückstand je 2mal aus  $CHCl_3/CCl_4$  sowie Benzol/Cyclohexan um. 4.5 mg reines *Ergochrom BC*, Schmp. 174° (Zers.), spezif. Aktivität  $7.5 \cdot 10^8$  dpm/mMol = 0.34 mC/mMol. IR (KBr): 3270 w (OH), 2860 m ( $OCH_3$ ), 1785 s ( $\gamma$ -Lacton), 1720 s ( $CO_2CH_3$ ), 1600 s (Aryl-CO, cheliert), 1420 s, 1340 m, 1210 s, 1075 m, 1015 m, 955 w, 800 w, 680/cm w.

Aus dem Rückstand der Eluate, die bei der Säulenchromatographie auf das Ergochrom BC folgten, wurden durch schichtchromatographische Auftrennung mit weinsaurem Kieselgel G und demselben Lösungsmittelsystem 5.0 mg reines Ergochrom AC (**8a**) gewonnen, mit 130 mg inaktivem Ergochrom AC versetzt und 4mal bis zur konstanten spezif. Aktivität von  $2.42 \cdot 10^7$  dpm/mMol = 0.29 mC/mMol aus  $\text{CHCl}_3$  umkristallisiert. Da eine konstante Aktivität erreicht wurde, ist das isolierte Ergochrom auch hierdurch mit dem zugefügten inaktiven Ergochrom AC (**8a**)<sup>2)</sup> identifiziert.

*C-Methyl-Aktivität des <sup>3</sup>H-markierten Ergochroms AC (8a):* 70 mg Ergochrom AC der spezif. Aktivität  $2.42 \cdot 10^7$  dpm/mMol ergaben nach Kuhn-Roth-Oxydation 14.3 mg (82%) Natriumacetat, das nach Reinigung durch Umfällen aus Methanol/Äther die spezif. Aktivität  $9.23 \cdot 10^5$  dpm/mMol hatte.

*Gewinnung von [<sup>14</sup>C]Emodin (5) durch Verfüttern von [<sup>14</sup>C]Natriumacetat an Penicillium islandicum:* Eine steril filtrierte Lösung von 0.84 mC [<sup>14</sup>C]Natriumacetat (4.8 mg, spezif. Aktivität 11.7 mC/mMol) in 84 ccm Wasser wurde in gleichen Anteilen unter das Oberflächenmycel von 9 gut angewachsenen, 8 Tage alten Oberflächenkulturen von *Penicillium islandicum* (American Type Culture Collection, Rockville/Md.) gespritzt. Nach 11 Tagen trennte man das Mycel von der Nährlösung ab, wusch es 3mal mit Wasser und trocknete 12 Stdn. bei 50° (Trockengewicht 22 g). Zur Isolierung des Emodins in Anlehnung an *Gatenbeck*<sup>8)</sup> wurde das Trockenmycel im Soxhlet-Apparat 2 Stdn. mit 300 ccm Petroläther und danach 4mal mit 300 ccm Aceton extrahiert, bis der Acetonauszug keine Rotfärbung mehr zeigte. Den Rückstand des Acetonauszugs löste man in 500 ccm *n* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, versetzte bei 70° mit 500 ccm 16proz. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Lösung, säuerte nach dem Abkühlen mit konz. Salzsäure auf pH 3 an, extrahierte mit Essigester, engte den Auszug ein, saugte das auskristallisierte Emodin ab, wusch es mit kaltem Petroläther und trocknete bei 50° 12 Stdn. i. Vak. Das Kristallat wurde schichtchromatographisch auf 0.75-mm-Schichten von Kieselgel H (E. Merck) mit  $\text{CHCl}_3 + 3-5\% \text{CH}_3\text{OH}$  bis zur konstanten spezif. Aktivität gereinigt. Schmp. der aus Essigester/CH<sub>3</sub>OH (3:1) umkristallisierten, mit Petroläther gewaschenen und 12 Stdn. bei 50° i. Vak. getrockneten Kristalle 254° (Lit.<sup>8)</sup>: 256–257°). Spezif. Aktivität  $5.3 \cdot 10^7$  dpm/mMol = 0.024 mC/mMol.

*Kuhn-Roth-Abbau des [<sup>14</sup>C]Emodins (5):* 1.35 mg [<sup>14</sup>C]Emodin der spezif. Aktivität  $5.3 \cdot 10^7$  dpm/mMol wurden mit 17.0 mg inaktivem Emodin versetzt und 3mal bis zur konstanten Radioaktivität aus je 10 ccm  $\text{CHCl}_3$  umkristallisiert. Die spezif. Aktivität dieser verdünnten Probe betrug  $3.88 \cdot 10^6$  dpm/mMol. Hiermit führte man wie oben angegeben, jedoch unter Verwendung von 1 ccm konz. Schwefelsäure (*d* 1.84) und 5 ccm 5*n* wäbr. Chromsäure einen Kuhn-Roth-Abbau durch. Zusätzlich wurde dabei auch das während der Oxydation entweichende Kohlendioxid in 0.5 *n* NaOH absorbiert und anschließend mit 10proz. BaCl<sub>2</sub>-Lösung ausgefällt. 162.2 mg BaCO<sub>3</sub> (93%) der spezif. Aktivität  $2.5 \cdot 10^5$  dpm/mMol. Das erhaltene Natriumacetat wurde durch Umfällen aus Methanol/Äther gereinigt. 3.75 mg (67%) Natriumacetat der spezif. Aktivität  $3.8 \cdot 10^5$  dpm/mMol.

*Abbau der Kuhn-Roth-Essigsäure aus [<sup>14</sup>C]Emodin:* 2.5 mg radioaktives Natriumacetat wurden mit 40.4 mg inaktivem Natriumacetat auf die spezif. Aktivität  $2.24 \cdot 10^4$  dpm/mMol verdünnt. Die Lösung dieses Acetates in 0.6 ccm konz. Schwefelsäure (*d* 1.84) versetzte man in einem Zweihalskolben mit 100 mg Natriumazid und schloß hintereinander eine Waschflasche mit 5proz. KMnO<sub>4</sub>-Lösung in *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und ein Absorptionsgefäß mit 0.5*n* NaOH an. Unter Durchleiten eines schwachen Stickstoffstromes erhitze man die Reaktionsmischung in der Apparatur langsam auf 70°. Nach 2 Stdn. wurde das in der NaOH-Vorlage absorbierte CO<sub>2</sub> mit 10proz. BaCl<sub>2</sub>-Lösung als Bariumcarbonat ausgefällt. 90.8 mg (88%) der spezif. Aktivität  $5.0 \cdot 10^2$  dpm/mMol.



Das Reaktionsgemisch machte man mit 0.5 n NaOH alkalisch, destillierte das *Methylamin* mit Wasserdampf in eine Vorlage mit 10 ccm 0.5 n HCl, dampfte deren Inhalt ein (35 mg >90%), erhitze den Rückstand mit 8 ccm 5proz.  $\text{KMnO}_4$ -Lösung und 5 ccm n NaOH 30 Min. auf 100°, ließ dann langsam 10 ccm 2 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zutropfen und absorbierte das freigesetzte  $\text{CO}_2$  in 0.5 n NaOH. Fällung mit  $\text{BaCl}_2$  ergab 82 mg (80%)  $\text{BaCO}_3$  der spezif. Aktivität  $2.1 \cdot 10^4$  dpm/mMol.

*Isolierung von radioaktivem Ergochrom BB (8b) nach Verfütterung von [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ]Emodin (5):* 127 ccm einer Lösung von 0.01 mC [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ]Emodin (114 mg der spezif. Aktivität  $5.3 \cdot 10^7$  dpm/mMol) und 2 g Tween 20 (Schuchardt) in 125 ccm Propylenglykol gab man in gleichen Anteilen unter die Myceldecke von 10 gut angewachsenen, 30 Tage alten Oberflächenkulturen des japanischen *Claviceps spec.* Stammes 467 (500 ccm Nährlösung pro Kultur). Nach 17 Tagen wurde das Mycel abgetrennt und wie oben beim Versuch mit [ $U\text{-}^3\text{H}$ ]Emodin aufgearbeitet. Durch Auftrennung des Rohergochrom-Gemisches mit Hilfe der Säulenchromatographie ließen sich folgende Mengen reiner Ergochrome gewinnen: 23.1 mg *Ergochrom BB (8b)* der spezif. Aktivität  $4.0 \cdot 10^5$  dpm/mMol; 12.6 mg *Ergochrom BC (Ergochrysin B) (8c)* der spezif. Aktivität  $6.4 \cdot 10^5$  dpm/mMol.

*Kuhn-Roth-Abbau des  $^{14}\text{C}$ -markierten Ergochroms BB (8b):* 9.04 mg radioaktives *Ergochrom BB* (spezif. Aktivität  $4.0 \cdot 10^5$  dpm/mMol) wurden mit 24.96 mg inaktivem *Ergochrom BB* zur spezif. Aktivität  $1.05 \cdot 10^5$  dpm/mMol verdünnt. Die damit wie beim [ $U\text{-}^{14}\text{C}$ ]Emodin durchgeführte Kuhn-Roth-Oxydation ergab 284 mg (84%) *Bariumcarbonat* der spezif. Aktivität  $3.1 \cdot 10^3$  dpm/mMol und 6.8 mg (78%) *Natriumacetat* der spezif. Aktivität  $5.35 \cdot 10^3$  dpm/mMol.

*Abbau der Kuhn-Roth-Essigsäure aus dem  $^{14}\text{C}$ -markierten Ergochrom BB (8b):* 6.4 mg des radioaktiven *Natriumacetats* wurden für den Schmidt-Abbau mit 35.8 mg inaktivem Acetat zur spezif. Aktivität  $8.1 \cdot 10^2$  dpm/mMol verdünnt. Die Ausbeute an *Bariumcarbonat* betrug 78 mg (77%), spezif. Aktivität 49 dpm/mMol. Aus dem abdestillierten *Methylamin* (18.9 mg, 55%) wurden nach  $\text{KMnO}_4$ -Oxydation 30.8 mg (56%) *Bariumcarbonat* der spezif. Aktivität  $5.6 \cdot 10^2$  dpm/mMol erhalten.

[558/67]