

## SUMMARY

The synthesis of a series of compounds with the general structure shown in formula I is described. These compounds, especially 3,4-dihydroxyphenylacetamide (XVI), are potent and nontoxic inhibitors *in vivo* of catechol-O-methyl transferase. They compare favourably with pyrogallol and other known inhibitors of this enzyme.

Pharmakologisches Institut  
der Universität Göteborg und  
Chemisches Forschungslaboratorium  
der AB HÄSSLE, Göteborg

### 33. Mikrobiologische Hydroxylierungen an Mutterkornalkaloiden vom Clavin-Typus mit dem mexikanischen Rauschpilz

#### *Psilocybe semperviva* HEIM et CAILLEUX

52. Mitteilung über Mutterkornalkaloide<sup>1)</sup>

von A. Brack, R. Brunner und H. Kobel

(7. XII. 61)

Während über mikrobiologische Reaktionen an Naturstoffen, ganz besonders an Steroiden, in jüngerer Zeit eine reichliche Erfahrung vorliegt, ist über solche Umwandlungen an Alkaloiden noch sehr wenig bekanntgeworden<sup>2)</sup>. In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen<sup>3)</sup>, dass der Pilz *Psilocybe semperviva* HEIM et CAILLEUX bei der Biosynthese des Psilocybins das Tryptophan in 4-Stellung hydroxyliert. Dieser Basidiomycet besitzt demnach ein Enzymsystem, das befähigt ist, im Indolringsystem eine Hydroxygruppe an einer Stelle einzuführen, die sonst bei allen andern bisher in der Natur gefundenen Indolverbindungen unsubstituiert ist, ausgenommen bei den Mutterkornalkaloiden und nach neueren Untersuchungen auch bei Bufothionin und Dehydrobufotenin<sup>4)</sup>, sowie bei gewissen *Mitragyna*-Alkaloiden<sup>5)</sup>.

Es schien uns interessant, zu prüfen, ob der *Psilocybe*-Pilz die ihm fremden Mutterkornalkaloide oxydativ verändern kann, obschon hier die 4-Stellung im Indolkern bereits substituiert ist. In der vorliegenden Mitteilung wird nun nachgewiesen, dass die beiden Hauptalkaloide der Clavin-Gruppe Elymoclavin und Agroclavin durch den *Psilocybe*-Pilz hydroxyliert werden, und zwar in der 8-Stellung des Ergolinsystems.

*Versuche mit Elymoclavin und mit Agroclavin.* Wird einer *Psilocybe*-Kultur mit vollentwickeltem Mycel Elymoclavin zugesetzt, dann nimmt der kolorimetrisch be-

<sup>1)</sup> 51. Mitt. über Mutterkornalkaloide: W. SCHLIENTZ, R. BRUNNER, A. HOFMANN, B. BERDE, E. STÜRMER, Pharm. Act. Helv. 36, 472 (1961).

<sup>2)</sup> Zusammenfassende Übersicht: CH. TAMM, Planta Medica 8, 331 (1960).

<sup>3)</sup> A. BRACK, F. HOFMANN, F. KALBERER, H. KOBEL & J. RUTSCHMANN, Arch. Pharm. 294, 230 (1961).

<sup>4)</sup> B. ROBINSON, G. F. SMITH, A. H. JACKSON, D. SHAW, B. FRYDMAN & V. DEULOFEU, Proc. chem. Soc. London, 1961, 310.

<sup>5)</sup> J. B. HENDRICKSON, Chemistry & Ind. 1961, 713.

stimmte Gesamtalkaloidgehalt<sup>6)</sup> in der Schüttelkultur rasch, nach 2 Tagen bereits auf die Hälfte ab, wie aus der Tabelle 1 zu ersehen ist. Das Alkaloid wird also vom *Psilocybe*-Pilz unter Umwandlung des Indolkerns metabolisiert. Die Zusammensetzung des jeweils noch vorhandenen Alkaloidgemisches zeigt aber, dass vor dem Abbau des Indolsystems das Elymoclavin zunehmend zu *Penniclav*in und *Isopenniclav*in hydroxyliert wird. Vom 7. Tag an besteht es aus 20% Elymoclavin und 80% der beiden isomeren Hydroxylierungsprodukte.

Tabelle 1. *Hydroxylierung von Elymoclavin mit Psilocybe semperviva in Schüttelkultur*

Tage nach Zusatz des Elymoclavins	Total-Alkaloidgehalt (kolorimetrisch) %	Zusammensetzung		
		Elymoclavin %	Penniclav %	Isopenniclav %
0	100	100	0	0
2	48	80	12	8
4	27	50	30	20
7	10	20	50	30
10	4	20	50	30

In der Standkultur wird die gleiche Umwandlung festgestellt, nur verläuft sie hier bedeutend langsamer (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Hydroxylierung von Elymoclavin mit Psilocybe semperviva in Standkultur*

Tage nach Zusatz des Elymoclavins	Total-Alkaloidgehalt (kolorimetrisch) %	Zusammensetzung:		
		Elymoclavin %	Penniclav %	Isopenniclav %
0	100	100	0	0
4	83	97	2	1
7	80	95	3	2
14	62	85	10	5

Bei Zusatz von *Agroclavin* zu der *Psilocybe*-Kultur geht der Abbau des Alkaloids noch rascher vor sich als beim Elymoclavin (Tabelle 3). Nach 2 Tagen waren nur noch 15% Alkaloide kolorimetrisch bestimmbar, in einem andern Ansatz nach 1 Tag noch 60%.

In beiden Ansätzen zeigte sich, dass das verbleibende Alkaloidgemisch zur Hauptsache aus *Setoclavin* und Spuren *Isosetoclavin* neben *Agroclavin* bestand. In keinem Fall konnte Elymoclavin nachgewiesen werden.

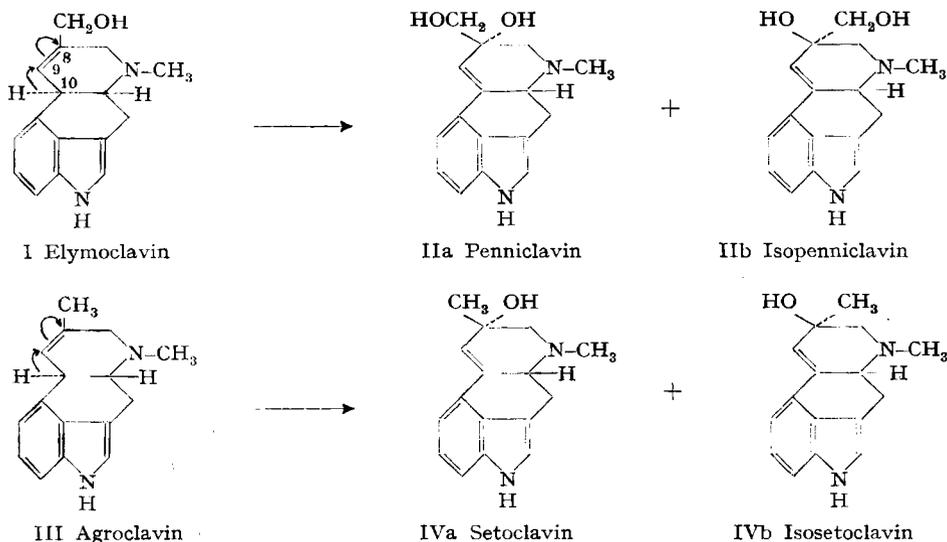
Der *Psilocybe*-Pilz vermag also die beiden Clavinalkaloide Elymoclavin und *Agroclavin* in 8-Stellung und unter Wanderung der Doppelbindung in Konjugation mit dem aromatischen System zu hydroxylieren. Aus Elymoclavin (I) entstehen *Penniclav*in (IIa) und *Isopenniclav*in (IIb), aus *Agroclavin* (III) *Setoclavin* (IVa) und

<sup>6)</sup> Mit der Farbreaktion nach VAN URK-SMITH bestimmt, womit nur Alkaloide mit intaktem Indolringssystem erfasst werden.

Tabelle 3. Hydroxylierung von Agroclavin mit *Psilocybe semperviva* in Schüttelkultur

Tage nach Zusatz des Agroclavins	Total-Alkaloidgehalt (kolorimetrisch) %	Zusammensetzung:		
		Agroclavin %	Setoclavin %	Isosetoclavin %
0	100	100	0	0
2	15	35	65	Spur
4	2	5	5	(90% undefinierte Abbauprodukte)
7	0	—	—	
Neuer Ansatz 1	60	25	75	Spur
Kontrolle (unbeimpft) 1	90	100	0	0

wenig Isosetoclavin (IVb). Eine Hydroxylierung an der 8-ständigen Methylgruppe des Agroclavins zu Elymoclavin fand unter unseren Versuchsbedingungen nicht statt. Diese mikrobiologischen Oxydationen verlaufen somit formal analog wie die von YAMATODANI *et al.* <sup>7)</sup> sowie HOFMANN *et al.* <sup>8)</sup> angegebenen entsprechenden chemischen



Überführungen. Die Molekel scheint bei beiden Vorgängen aus dem in Formeln I und III angedeuteten Zustand heraus mit OH<sup>+</sup> zu reagieren, dem Zustand, der ja auch für die bekannten Umlagerungsreaktionen (z.B. Elymoclavin zu Lysergol und Iso-lysergol) in alkalischem Medium verantwortlich sein muss. Im Falle der biologischen Oxydation ist dabei interessant und vorläufig nicht erklärlich, dass aus Elymoclavin in stereochemisch wenig spezifischer Weise ungefähr vergleichbare Mengen der beiden

<sup>7)</sup> S. YAMATODANI & M. ABE, Bull. agr. chem. Soc. Japan 79, 94 (1955).

<sup>8)</sup> A. HOFMANN, R. BRUNNER, H. KOBEL & A. BRACK, Helv. 40, 1358 (1957).

möglichen Isomeren, Penni- und Isopenniclavine entstehen, während aus Agroclavin zur Hauptsache das eine Isomere, Setoclavin, und nur Spuren Isoetoclavin gebildet werden. Überdies verläuft die letzte Reaktion bedeutend rascher als die Hydroxylierung des Elymoclavins.

*Versuche mit Ergotamin und Ergobasin (Ergometrin).* Die Resultate an den Clavinalkaloiden ermunterten uns dazu, die Einwirkung des *Psilocybe*-Pilzes auch auf Lysergsäure-Alkaloide zu untersuchen. An 2 Beispielen, nämlich mit Ergotamin und Ergobasin (Tabelle 4), konnten wir feststellen, dass auch diese Alkaloide sehr rasch metabolisiert werden, wobei vor der Umwandlung des Indolkerns lediglich teilweise Isomerisierung in die rechtsdrehende Form eintrat. Irgendwelche Oxydationsprodukte mit intaktem Indolkern konnten in keinem Fall nachgewiesen werden.

Tabelle 4. *Abbau von Ergotamin und Ergobasin mit Psilocybe semperviva in Schüttelkultur*

Alkaloid	Tage nach Zusatz des Alkaloids	Total-Alkaloidgehalt (kolorimetrisch) %	Zusammensetzung (in %)	
			Ergotamin	Ergobasin
Ergotamin	0	100	70	30
	2	15	65	35
	7	1	65	35
	10	0	—	—
Ergobasin	0	100	Ergobasin 92	Ergobasin 8
	2	10	85	15
	7	6	20	80

### Experimenteller Teil

*Züchtung des Pilzes Psilocybe semperviva mit Zusatz von Mutterkornalkaloiden.* Wir kultivierten den *Psilocybe*-Stamm Nr. 16<sup>9)</sup> bei 24° als Oberflächen- und als Submerskultur in folgender Nährlösung: 250 g Bierwürze mit 18% Trockensubstanz, 10 g Cornsteep-Solids, 2 g 25-proz. NH<sub>3</sub>-Lösung, Leitungswasser ad 1 l. Das pH der Nährlösung war 5,0. Für die Stand-Kulturen wurde der Nährlösung 0,2% Agar zugefügt. Kulturgefässe: 1,6 l FERNBACH-Kolben mit je 250 ml Nährlösung und für Schüttelkulturen 300-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 100 ml Nährlösung. Im Alter von 5 Tagen (Schüttelkulturen) bzw. 8 Tagen (Standkulturen) setzten wir die Alkaloide in einer Menge von 200 mg Reinalkaloid pro Liter Kultur zu, und zwar Elymoclavin und Agroclavin als Tartrate, Ergobasin als Maleinat und Ergotamin als Acetat. Alle Lösungen wurden durch Filtration durch Glasfilter sterilisiert.

Unmittelbar nach dem Zusatz sowie nach 2, 4, 7 (10 und 14) Tagen wurden jeweils zwei Parallelkulturen geerntet, im Turmix homogenisiert und sofort lyophilisiert.

*Isolierung und Bestimmung der Alkaloide.* Am Ende der Versuchsdauer wurden die Lyophilisate in je 200 ml Wasser gelöst, mit Weinsäure angesäuert und zweimal mit je 100 ml Äther zum Entfernen der öligen Bestandteile vorextrahiert. Die Ätherlösungen wurden mit je 20 ml 1-proz. Weinsäurelösung gewaschen und nach dem negativen Ausfall der Prüfung auf Mutterkornalkaloide verworfen. Dann wurden die wässrigen Lösungen (inkl. Waschwasser) mit Soda alkalisch gestellt und 3 mal mit je 250 ml Äther, anschliessend noch mit 2 mal je 100 ml Chloroform/Isopropylalkohol-Gemisch 3:1 extrahiert. Nach dieser Extraktion zeigten die wässrigen Lösungen keine positive VAN URK-Reaktion mehr. In den vereinigten Eindampfrückständen der Extrakte wurde der Alkaloidgehalt kolorimetrisch bestimmt und die Zusammensetzung des Alkaloidgemisches

<sup>9)</sup> R. HEIM & R. CAILLEUX, Rev. Mycologie 23, 352 (1958).

<sup>10)</sup> A. STOLL & A. RÜEGGER, Helv. 37, 1725 (1954).

Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Systeme

System	Stationäre Phase	mobile Phase (gesättigt mit der stationären Phase)
A	10% Phtalsäure-dimethylester (in Chloroform)	40% Formamid 60% m/15 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung
B	wie System A	40% Formamid 60% Wasser, auf pH 5,2 eingestellt
C	25% Formamid 1% Benzoesäure (in Methanol)	Äther

papierchromatographisch ermittelt. Die Papierchromatogramme wurden nach STOLL & RÜEGGER<sup>10)</sup> und nach einer Modifikation dieser Methode mit dem aufsteigenden Verfahren ausgeführt (siehe Tabelle 5). Zur Sichtbarmachung der Flecke diente, wo dies möglich war, UV-Licht (bei System C); sonst wurden die Chromatogramme im Warmluftstrom bei 100–110° gut getrocknet, durch eine 0,5-proz. Lösung von p-Dimethylamino-benzaldehyd in Cyclohexan/Chloroform 95:5 gezogen und nach dem Verdunsten des Lösungsmittels in HCl-Atmosphäre entwickelt. (Über die Farbe der Flecke siehe Tabelle 7.)

Tabelle 6. Rf-Werte in den unter Tabelle 5 aufgeführten Systemen

Substanz	Fluoreszenz im UV.-Licht	Farbe des Flecks auf dem Papier	Rf-Werte		
			Syst. A	Syst. B	Syst. C
Agroclavin	–	violett	0,16		0,82
Setoclavin	+	gelbbraun	0,13		0,78
Isosetoclavin	+	gelbbraun	0,29		0,93
Elymoclavin	–	violett	0,56		0,16
Penniclavine	+	olivgrün	0,63		0,10
Isopenniclavine	+	olivgrau	0,52		0,28
Ergobasin (Ergometrin)	+	violettblau	0,74	0,90	0,04
Ergobasine (Ergometrinine)	+	violettblau	0,47	0,96	0,13
Ergotamine	+	blau	0,02	0,38	0,24
Ergotamine	+	blau	0,00	0,18	0,50

Zur quantitativen Auswertung der Chromatogramme wurde parallel eine Testreihe von verschiedenen Quantitäten der zu untersuchenden Substanzen mitlaufen gelassen. Anhand der Fleckengrösse und Intensität konnte die quantitative Zusammensetzung mit einer für diese Zwecke genügenden Genauigkeit visuell abgeschätzt werden.

Zur präparativen Isolierung des Penniclavins wurden sämtliche Fraktionen, die das Alkaloid enthielten, vereinigt und an der 100fachen Menge Aluminiumoxid (MERCK) nach BROCKMANN chromatographiert. Elutionsmittel: Chloroform mit steigenden Mengen Methanol. Es wurden 5 Fraktionen aufgefangen. Fr. 1 und 2 enthielten nur Elymoclavin. Fr. 3 wies als Rückstand wenig einer nichtalkaloidischen Substanz auf. Fr. 4 enthielt Elymoclavin und Isopenniclavine im Verhältnis 1:1 und schliesslich Fr. 5 Penniclavine und Isopenniclavine im Verhältnis 9:1.

Der Rückstand der 5. Fraktion konnte aus Aceton zur Kristallisation gebracht werden und ergab so ein ziemlich reines Penniclavine, das nach 1-maligem Umkristallisieren aus Methanol papierchromatographisch rein war. IR.-Spektrum, Farbreaktionen und Smp. waren mit denjenigen von authentischem Penniclavine identisch und der Misch-Smp. zeigte keine Depression. Auch im Papierchromatogramm zeigten das Kristallisat und authentisches Penniclavine in verschiedenen Systemen stets den gleichen Rf-Wert.

Um genügend Material auch für eine *präparative* Isolierung des *Setoclavins* zu erhalten, setzten wir unter Einhaltung der beschriebenen Bedingungen einen neuen Versuch mit 20 Schüttelkulturen (=total 2 l Nährlösung) an, denen wir am 5. Tag insgesamt 400 mg Agroclavin in Form des Tartrates zusetzten. Da Agroclavin und Setoclavin sehr schnell abgebaut werden, wurden die Kulturen bereits nach 24 Std. im Turmix homogenisiert und die Basen sofort extrahiert.

Dabei erhielt man 240 mg eines Alkaloidgemisches (60% des eingesetzten Agroclavins), das laut der papierchromatographischen Analyse aus 25% Agroclavin und 75% Setoclavin neben Spuren von Isosetoclavin bestand.

Durch Chromatographieren an der 100fachen Menge Aluminiumoxid (MERCK) nach BROCKMANN wurde zuerst das Agroclavin mit abs. Chloroform eluiert, dann wurde mit Chloroform + 1/2% Methanol eine Fraktion von 160 mg reinem Setoclavin erhalten. Nach Umkristallisieren aus Aceton war das Alkaloid papierchromatographisch rein (135 mg). IR-Spektrum, Farbreaktionen, Smp. und optische Drehung waren genau wie diejenigen von authentischem Setoclavin.

Als Kontrollversuch wurden 5 ERMENMEYER-Kolben mit total 500 ml unbeimpfter Nährlösung mit total 100 mg Agroclavin versetzt und ebenfalls 24 Std. geschüttelt.

Aus diesem Ansatz liessen sich 90% des eingesetzten Agroclavins unverändert zurückgewinnen. Im Papierchromatogramm war nur reines Agroclavin, jedoch keine Spur Setoclavin nachzuweisen.

Wir danken Fräulein MICHÈLE CARMELLINO für die Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Durch Zusatz von Elymoclavin und von Agroclavin zu Kulturen des mexikanischen Rauschpilzes *Psilocybe semperviva* HEIM et CAILLEUX konnten diese beiden Mutterkornalkaloide am C-8 hydroxyliert werden, wobei aus Elymoclavin Penniclavin und Isopenniclavin, aus Agroclavin Setoclavin und Spuren Isosetoclavin entstanden.

Ergotamin oder Ergobasin (Ergometrin) wurden durch *Psilocybe*-Kulturen nach partieller Isomerisierung abgebaut, ohne dass hydroxylierte Zwischenprodukte mit intaktem Indolkern fassbar waren.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

## 34. Über die Dünnschichtchromatographie von Lipiden

1. Mitteilung

### Untersuchungen von Gehirngewebe Multiple-Sklerose-Kranker und Normaler

von C. G. Honegger

(7. XII. 61)

Die Multiple Sklerose wird zu den demyelinisierenden Erkrankungen gezählt und führt im pathogenetischen Geschehen zu herdförmigen Entmarkungen, vorwiegend im Bereiche der weissen Substanz von Gehirn und Rückenmark. Der Abbau der an Lipiden besonders reichen Myelinscheiden, als ein hervorstechendes Merkmal bei dieser Krankheit, hat das Interesse chemisch ausgerichteter Untersuchungen auf diese Stoffklasse gelenkt. Ausgangspunkt bildet eine vergleichende Studie von WEIL<sup>1)</sup>,

<sup>1)</sup> A. WEIL, J. Neuropath. 7, 453 (1948).