

amine. 10  $\mu\text{g}$  de chymotrypsine cristallisée incubés à pH 7,8 avec 5  $\mu\text{g}$  de substrat VIII en présence de 40 unités internationales (U) d'aminopeptidase M ont présenté une activité de  $63,5 \cdot 10^{-2}$  U/g. 5  $\mu\text{l}$  de préparation de rénine incubés à pH 5,6 avec 10  $\mu\text{g}$  de substrat VIII en présence de 20 U d'aminopeptidase M et d'acétate de zinc ( $10^{-4}$  M) ont présenté une activité de  $6,7 \cdot 10^{-2}$  U par g de protéines. L'hydrolyse prolongée (quatre jours) en présence de rénine et d'aminopeptidase M libère 92% de la quantité théorique de  $\beta$ -naphthylamine; dans les mêmes conditions, la rénine seule n'en libère que 1,8%, et l'aminopeptidase seule, 1,5%.

## SUMMARY

A fluorogenic renin substrate, N-CBO-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-seryl- $\beta$ -naphthylamide, has been synthesized. Upon incubation at pH 5,6 with renin and an excess of the auxiliary enzyme aminopeptidase M, it gives rise to  $\beta$ -naphthylamine at a rate related to the quantity of renin.

Since  $\beta$ -naphthylamine can be measured with high sensitivity by fluorimetry, a chemical assay of renin is made possible. The method gave reproducible results when purified samples of hog and rabbit kidney renin were assayed.

Laboratoire central de l'Hôpital Cantonal  
1211 Genève 4

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. T. SKEGGS, J. R. KAHN, K. LENTZ & N. P. SHUMWAY, J. exp. Med. 106, 439 (1957).
- [2] L. T. SKEGGS, K. E. LENTZ, H. HOCHSTRASSER & J. R. KAHN, Canad. Med. Ass. J. 90, 185 (1964).
- [3] J. J. BROWN, D. L. DAVIES, A. F. LEVER, J. I. S. ROBERTSON & M. TREE, Biochem. J. 93, 594 (1964); R. BOUCHER, R. VEYRAT, J. DE CHAMPLAIN & J. GENEST, Canad. Med. Ass. J. 90, 194 (1964).
- [4] R. H. MAZUR & J. M. SCHLATTER, J. org. Chemistry 29, 3212 (1964).
- [5] M. ROTH, Clin. chim. Acta 8, 574 (1963).
- [6] L. J. GREENBERG, Biochem. biophysic. Res. Commun. 9, 430 (1962); M. ROTH, Clin. chim. Acta 9, 448 (1964).
- [7] G. PFLEIDERER, P. G. CELLIERS, M. STANULOVIC, E. D. WACHSMUTH, H. DETERMANN & G. BRAUNITZER, Biochem. Z. 340, 552 (1964).
- [8] E. HAAS, H. LAMFROM & H. GOLDBLATT, Arch. Biochemistry Biophysics 42, 368 (1953).
- [9] H. NESVADBA, Mh. Chem. 93, 386 (1962).

## 226. Die Isolierung zweier neuartiger Indol-Derivate aus dem Mycel von *Claviceps paspali* STEVENS et HALL

von Th. Fehr und W. Acklin

(7. VII. 66)

Im Rahmen von Untersuchungen zur Biosynthese von Ergotalkaloiden, über die anderorts berichtet wird [1], haben wir auch mit dem isolierten Mycel des von KOBEL *et al.* [2] beschriebenen «portugiesischen» *Claviceps-paspali*-Stammes gearbeitet. Dieser Stamm produziert in Submerskultur als Hauptalkaloid die 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure, welche im Kulturfiltrat auftritt. Aus dem Trockenmycel (ca. 8 g aus 1 l einer 6-Tage-Kultur) konnten wir eine weitere kleine Menge von Ergolencarbonsäuren isolieren. Bei der dünn-schichtchromatographischen Unter-

suchung der Mycelextrakte zeigte sich nach dem Besprühen mit VAN-URK-Reagens neben dem typischen tiefblauen Doppelfleck der Ergolencarbonsäuren stets der kräftige hellgrüne Fleck eines unpolaren Produktes. Dieses konnte in Form farbloser Kristalle vom Smp.  $264^{\circ}$  isoliert werden. Die Ausbeute an chromatographisch einheitlichem kristallinem Material beträgt ca. 1,7% bezogen auf das Mycel-Trockengewicht. Die neue Verbindung wird in der Folge *Paspalin* genannt. Aus den analytischen und spektralen Daten ergibt sich für Paspalin die Summenformel  $C_{28}H_{39}O_2N$ . Bei der  $pK^*_{MCS}$ -Bestimmung wird keine Stufe beobachtet. Folgende Strukturelemente lassen sich nachweisen (s. exp. Teil): ein 2,3-disubstituierter Indolkern, 5 tertiär gebundene Methylgruppen und eine Hydroxylgruppe. Diese reagiert bei der Behandlung mit Acetanhydrid-Pyridin in der Hitze unter Bildung eines kristallinen, hydroxylfreien Mono-O-acetyl-Derivates. Die zweite Sauerstoff-Funktion muss ätherartig gebunden vorliegen.

Bei der Isolierung grösserer Mengen Paspalin konnte dünnschichtchromatographisch die Anwesenheit weiterer Stoffwechselprodukte mit grüner VAN-URK-Reaktion nachgewiesen werden, die sich in ihrer Polarität um das Paspalin gruppieren. Das unpolarste davon, welches wir *Paspalicin* nennen, wurde in Form farbloser Kristalle  $C_{31}H_{36}O_4N$  isoliert, die sich bei ca.  $230^{\circ}$  zersetzen. Es enthält ebenfalls die 2,3-disubstituierte Indolgruppierung; daneben machen die spektralen Daten das Vorliegen von 4 tertiär gebundenen Methylgruppen und einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppierung wahrscheinlich.

Die Anwesenheit von 5 Methylgruppen in dem nach Abzug des Indolkerns verbleibenden  $C_{20}$ -Bruchstück von Paspalin legt die Vermutung nahe, dass es sich bei letzterem um ein alicyclisches System von terpenartigem Charakter handeln könnte. Bekräftigt wird diese Vermutung durch den Befund, dass nach Applikation von 2-[ $^{14}C$ ]-Mevalonsäure auf das Mycel radioaktives Paspalin mit einer Einbaurate von ca. 10% isoliert werden konnte.

Paspalin dürfte somit eine neuartige Variante jener Klasse von Naturstoffen darstellen, welche ihre Entstehung der Kombination eines Indolabkömmlings mit einem Bruchstück mevalonoiden Charakters verdanken. Eine solche Kombination ist schon früher für die Ergotalkaloide (Tryptophan + 1  $C_6$ -Einheit [3]), für einen weiteren Pilzmetaboliten, das Echinulin (Tryptophan + 3  $C_5$ -Einheiten [4]) und in neuester Zeit auch für gewisse Indolalkaloide aus höheren Pflanzen (Tryptophan + 1  $C_{10}$ -Einheit [5]) nachgewiesen worden.

Die chemische Bearbeitung der beiden neuen Verbindungen ist in unserem Laboratorium im Gange. Auf eine detailliertere Diskussion der spektralen Daten im Sinne einer Konstitutionsableitung soll daher erst später eingegangen werden.

Wir danken Herrn Prof. D. ARIGONI für anregende Diskussionen und den Herren Dres. J. RUTSCHMANN und H. KOBEL (SANDOZ AG, Basel) für die Überlassung des Pilzmaterials. Der Firma SANDOZ AG, Basel, verdanken wir die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

**Experimentelles.** – *Allgemeine Bemerkungen.* Die Smp. wurden im Ölbad in evakuierten Kapillaren bestimmt und sind korrigiert (Eichsubstanzen). Die spezifischen Drehungen wurden im 1-dm-Rohr in alkoholfreier Chloroformlösung mit einem photoelektrischen Polarimeter (ZEISS) gemessen und auf die Na-D-Linie extrapoliert. UV.-Spektren wurden in Feinsprit mit einem PERKIN-ELMER Modell 137, Massenspektren (MS) mit einem HITACHI Modell RMU-6A, IR.-Spektren in Chloroform und Nujol mit einem PERKIN-ELMER Infracord, in KBr mit einem PERKIN-ELMER Modell 21 und NMR.-Spektren in Deuteriochloroform mit den VARIAN Modellen A-60

und HA-100 aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm bezüglich Tetramethylsilan als internem Standard, die Kupplungskonstanten  $J$  in cps angegeben. Die vaporometrische Molekulargewichtsbestimmung erfolgte nach [6], die potentiometrische Titration nach [7]. Dünnschichtchromatogramme (DS) wurden auf Kieselgel HF (MERCK) ausgeführt, die Flecke durch Besprühen mit VAN-URK-Reagens [8] und evtl. anschliessendes Erhitzen der Platten sichtbar gemacht.

*Isolierung von Paspalin.* Zur Züchtung von *Claviceps paspali* Stamm Pb 156 K 16 III, vgl. [2]. Das nach einer Kulturdauer von 6 Tagen abgenutzte Mycel aus 500 ml Kultur wurde im Luftstrom bei 40–45° getrocknet (4,1 g), im Mörser mit Quarzsand verrieben und anschliessend mit Chloroform-Methanol 2:1 (gesätt. mit Ammoniak) erschöpfend extrahiert. Den Eindampfrückstand (1,7 g) chromatographierte man an 100 g Kieselgel G mit demselben Lösungsmittelgemisch. Man eluierte zunächst 261 mg ölige Fraktionen, welche das Paspalin enthielten, dann, nach mehreren Leerfraktionen, noch 31 mg Ergolenbonsäuren.

Die paspalinhaltigen Fraktionen wurden an 50 g Kieselgel G mit Chloroform (halbgesätt. mit Ammoniak) rechromatographiert ( $R_f$  in diesem System 0,65). Man eluierte 70 mg kristallines Paspalin, Smp. nach Unkristallisation aus Feinsprit und Methanol 254°, das noch Kristall-Lösungsmittel enthält. Zur Bestimmung der analytischen und spektralen Daten wurde im Hochvakuum sublimiert, worauf man Smp. 264°,  $[\alpha]_D = -23^\circ$  ( $c = 0,36$ ) beobachtete. UV.:  $\lambda_{max}/\log \epsilon = 228-231 \text{ nm}/4,4; 282 \text{ nm}/3,9; 291 \text{ nm (infl.)}/3,8$  (praktisch identisch mit dem von Tetrahydrocarbazol [9]). – Mol.-Gew.: Gef. 457. – Potentiometrische Titration: keine Stufe. – MS.: intensive Pike bei 421 (Mol.-Pik = 100%), 406, 182 und 130. – NMR. (100 MHz):  $\delta = 0,88; 1,02; 1,13$  (je s, 3H) und  $1,18$  (s, 6H):  $5\text{mal } \text{CH}_3-\overset{|}{\text{C}}-$ ;  $\delta = 1,4-3,3$  (Signalhaufen, 18H);  $\delta = 3,68$  (q;  $J = 3,5, 1\text{H}$ );  $\delta = 7-7,5$  (Signalhaufen, 4H): 4 benachbarte arom. H;  $\delta = 7,82$  (breites s, 1H): Indol-H. – IR. 3% in  $\text{CHCl}_3$ :  $\nu_{max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3500 (OH), 3450 (NH), 2950 und (2850) (CH), 1440 (C=C arom), 1380 (1360), (1320), 1280, 1150, 1090 (C–O–C?), 1030 (1010), (970), (940), (895), (875). – IR. 1:300 in KBr:  $\nu_{max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 2950, (2880), 1400, 1387, 1375, (1330), 1300, (1260), (1240), (1185), (1155), 1090, 1038, (1010), (970), (940), (920), (895) 745 (4 benachbarte arom. H «out-of-plane»). Das IR.-Spektrum einer 20-proz. Lösung in  $\text{CHCl}_3$  zeigt im Gebiet der aromatischen C=C-Streck- und «breathing»-Schwingungen das für *o*-disubstituierte Aromaten typische Bandenbild zwischen 1660 und 2000  $\text{cm}^{-1}$  (vgl. [10]). Zusätzlich tritt hier auch die typische Indoldoppelbande zwischen 1550 und 1600  $\text{cm}^{-1}$  deutlich in Erscheinung.

$\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_2\text{N}$  (421) Ber. C 79,76 H 9,32 N 3,32% Gef. C 79,51 H 9,41 N 3,36%

*O-Acetylpassalin.* 100 mg Paspalin wurden zusammen mit je 5 ml Pyridin und Acetanhydrid 24 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. DS-Kontrolle zeigte nur unverändertes Ausgangsmaterial. Darauf erwärmte man das Gemisch 24 Std. auf 90° und anschliessend 5 Std. auf 130°, zog die Lösungsmittel im Vakuum ab und chromatographierte den Rückstand an 40 g mit Ammoniak neutralisiertem Kieselgel G mit Chloroform als Fließmittel. Man eluierte 74 mg kristallines Rohprodukt; nach zwei Kristallisationen aus Hexan und Sublimation im Hochvakuum Smp. 196°,  $[\alpha]_D = -17^\circ$  ( $c = 0,66$ ). UV.:  $\lambda_{max}/\log \epsilon = 234 \text{ nm}/4,2; 284 \text{ nm}/3,7; 292 \text{ nm (infl.)}/3,6$ . – MS.: intensive Pike bei 463 (Mol.-Pik), 447, 403, 388, 182 (= 100%) und 130. – NMR.: (60 MHz):  $\delta = 0,90; 1,02; 1,14; 1,49; 1,50$  (je s, 3H);  $\delta = 2,0$  (s, 3H):  $\text{CH}_3\text{CO}-$ ;  $\delta = 1,3-3,0$  (Signalhaufen, 17 H),  $\delta = 3,7$  (m, unscharf, 1H),  $\delta = 6,9-7,3$  (Signalhaufen, 4H),  $\delta = 7,75$  (breites s, 1H). – IR. in KBr und Chf:  $\nu_{max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 1710 (C=O), 1260 (CO–O–C), kein OH mehr.

$\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{O}_3\text{N}$  (463) Ber. C 77,71 H 8,91% Gef. C 77,63 H 8,82%

*Einbau von 2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure.* Auf 5 Mycelkuchen aus je 100 ml Schüttelkultur von *C. paspali* wurden unter sterilen Bedingungen je 1 ml einer Lösung von 0,2  $\mu\text{Ci}$  ( $4,4 \cdot 10^5$  dpm) Na-Mevalonat-2- $^{14}\text{C}$  (spez. Akt. 5 mCi/mMol) in 5 ml 0,2M Phosphatpuffer pH 6,5 appliziert. Nach 1 Woche wurden die Mycelkuchen getrocknet (zusammen 3,8 g) und aufgearbeitet, wie oben für das inaktive Material beschrieben. Man isolierte 69 mg chromatographisch reines Paspalin als weissen Schaum. Radioaktivitätsmessung mit Fensterzählrohr und «TRACERLAB-100-scaler»: 10 mg, homogen verteilt auf einem Aluminiumschälchen (3,14  $\text{cm}^2$ ), zeigten nach Abzug der Nullrate von 11 ipm eine Aktivität von 160 ipm, unverändert durch zwei Umkristallisationen aus Methanol. Diese relative Aktivität entspricht einem Absolutwert von 630 dpm/mg. Total isoliert also  $4,3 \cdot 10^4$  dpm = 10%.

*Isolierung von Paspalicin.* 5 kg Trockenmycel wurden in einer Schlagsmühle zerkleinert und im SOXHLET nacheinander gründlich mit Pentan, Äther und Chloroform extrahiert. Aus dem Pentan-Extrakt wurden durch Ausschütteln mit Methanol und Kristallisation 11 g reines Paspalin gewonnen. Die Mutterlaugen wurden zusammen mit den Äther- und Chloroform-Extrakten über 2 kg Kieselgel MERCK (unter 0,2 mm) in Chloroform filtriert, wobei man 5 Fraktionen getrennt auffing. Nach DS war Fraktion 4 am reichsten an Produkten mit grüner VAN-URK-Reaktion. Mit Chloroform als Laufmittel wurden folgende ungefähre Rf-Werte ermittelt: 0,7 (VAN URK hellgrün: Paspalicin), 0,35 (hellgrün: Paspalin), 0,3 (dunkelgrün) und 0,2 (dunkelgrün). Durch Chromatographie von Fraktion 4 (28 g) an 600 g Kieselgel MERCK (unter 0,2 mm) mit Chloroform als Elutionsmittel wurden 544 mg kristallines Paspalicin isoliert. Nach zwei Kristallisationen aus Methanol resultierten 166 mg farblose Kristalle, die sich bei ca. 230° zersetzen.  $[\alpha]_D^{25} = +173^\circ$  ( $c = 0,5$ ). UV.:  $\lambda_{max}/\log \epsilon = 231 \text{ nm}/4,68$ ; 250 nm (infl.)/4,25; 275 nm (infl.)/4,1. Differenz-Spektrum Paspalicin-Paspalin:  $\lambda_{max}/\log \epsilon = 244 \text{ nm}/4,18$ . - MS.: Mol-Pik bei 485 (schwach), intensive Pike bei 417, 402, 359, 344 und 182 (= 100%). - NMR. (60 MHz):  $\delta = 1,10$ ; 1,12; 1,22; 1,42 (je s, 3H): 4mal  $\text{CH}_3-\overset{|}{\text{C}}-$ ;  $\delta = 1,7-3,2$  (Signalhaufen, 15H),  $\delta = 3,47$  (s, 1H),  $\delta = 4,32$  (d,  $J = 1$ , 1H),  $\delta = 5,75$  (q,  $J = 1$ , 1H),  $\delta = 6,9-7,5$  (Signalhaufen 4H),  $\delta = 7,8$  (breites s, 1H). - IR. (4% in  $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{max}(\text{cm}^{-1}) = 3450$  (NH), 2930 und (2850) (CH), 1670 und (1620) (C=C-C=O), 1440 (C=C arom), 1350, (1320), 1295, 1260, 1140, 1120, (1110), (1090), 1070, 1040, 1010, 995, 980, 965, 950, 895, 865. - IR. in Nujol:  $\nu_{max}(\text{cm}^{-1}) = 3330$ , 1660 (1620), 1300, 1270, 1250, 1220, 1180, 1140, 1120, 1110, (1090), 1075, (1060), 1040, 1010, (995), 980, 970, 910, 895, 885, 870, 845, 740 (4 benachbarte arom. H) (720), (705).

$\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}$	Ber. C 76,67	H 7,27	O 13,18	N 2,88%
(485)	Gef. „ 76,50	„ 7,66	„ 13,69	„ 3,21%

Die Aufnahme von IR.-Spektren in KBr und NMR.-Spektren sowie die Ausführung von Molekulargewichtsbestimmung und Titration erfolgten in unserer Instrumentalabteilung (Leitung: Prof. W. SIMON). Die Elementaranalysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung: W. MANSER) ausgeführt. Herrn Dr. J. SEIBL verdanken wir Aufnahme und Diskussion der Massenspektren. Herrn H. GROSSMANN möchten wir für die Extraktion grösserer Mycel-Mengen danken.

#### SUMMARY

Investigation of the dried mycelium of *Claviceps paspali* STEVENS *et* HALL has led to the isolation of two new neutral metabolites, *paspalin*,  $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{N}$ , and *paspalicin*,  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}$ , both of which contain a 2,3-disubstituted indole nucleus.

The mevalonoid origin of paspalin has been demonstrated in experiments with 2- $^{14}\text{C}$ -mevalonate.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. ACKLIN, TH. FEHR & D. ARIGONI, Chem. Comm. 1966, im Druck.
- [2] H. KOBEL, E. SCHREIER & J. RUTSCHMANN, Helv. 47, 1052 (1964).
- [3] Zusammenfassende Darstellung: F. WEYGAND & H. G. FLOSS, Angew. Chem. 75, 783 (1963).
- [4] A. J. BIRCH, G. E. BLANCE, S. DAVID & H. SMITH, J. chem. Soc. 1967, 3128.
- [5] A. R. BATTERSBY, R. T. BROWN, J. A. KNIGHT, J. A. MARTIN & A. O. PLUNKETT, Chem. Comm. 1966, 346; P. LOEW, H. GOEGGEL & D. ARIGONI, *ibid.* 1966, 347; E. S. HALL, F. McCAPRA, T. MONEY, K. FUKUMOTO, J. R. HANSON, B. S. MOOTOO, G. T. PHILLIPS & A. I. SCOTT, *ibid.* 1966, 348.
- [6] CH. CHYLEWSKY & W. SIMON, Helv. 47, 515 (1964).
- [7] W. SIMON, Helv. 41, 1835 (1958).
- [8] D. GRÖGER & D. ERGE, Pharmazie 18, 346 (1963).
- [9] F. WALLS, O. COLLERA & A. SANDOVAL L., Tetrahedron 2, 173 (1958).
- [10] C. W. YOUNG, R. B. DU VALL & N. WRIGHT, Analyt. Chemistry 23, 709 (1951).