

(probably a polymer of styrene) containing only a trace amount of chromium was also isolated.

Reaction of β -Phenyl Ethynylmagnesium Bromide with Chromic Chloride

β -Phenyl ethynylmagnesium bromide (0.1 mole) and 4.71 g. (0.03 moles) chromic chloride were reacted as

above. The coupled product 1,4-di-phenyl, 1,3-butadiene was isolated while no π -complex was detected.

Acknowledgment is made to the donors of The Petroleum Research Fund, administered by the American Chemical Society and the Arakawa Forest Chemical Company, Osaka, Japan for support of this research.

Biosynthese der Mutterkornalkaloide. Einbau von Chanoclavin-I in Ergolin-Derivate

D. GRÖGER *, D. ERGE * und H. G. FLOSS **

Institut für Biochemie der Pflanzen der DAW, Halle (Saale) *

und

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München **

(Z. Naturforschg. **21 b**, 827—832 [1966]; eingegangen am 6. Mai 1966)

The reaction sequence tryptophan $\rightarrow$ chanoclavine-I $\rightarrow$ agroclavine $\rightarrow$ elymoclavine $\rightarrow$ lysergic acid derivatives was demonstrated in *Claviceps*. Incorporation of chanoclavine-I into ergoline derivatives ranged up to 40 per cent. No conversion of elymoclavine or agroclavine into chanoclavine-I could be demonstrated.

Die Biosynthese der Mutterkornalkaloide konnte in den letzten Jahren in den Grundzügen geklärt werden¹⁻³. Über viele Einzelheiten besteht jedoch noch weitgehende Unklarheit. Eines der interessantesten noch ungelösten Probleme ist die Frage nach der Stellung des Chanoclavins im Stoffwechsel der Mutterkornalkaloide. Im Unterschied zu allen anderen Mutterkornalkaloiden ist bei dieser Verbindung der Ring D nicht geschlossen. Die Strukturaufklärung des Chanoclavins⁴ gab den Anstoß zur Aufstellung der später bewiesenen⁵ Hypothese^{6, 7}, daß als zweiter Baustein der Mutterkornalkaloide neben dem Tryptophan die Mevalonsäure dient.

In der Folgezeit ist das Chanoclavin sowohl als Abbauprodukt der Alkaloide mit geschlossenem D-Ring angesehen worden^{8, 9}, als auch als Zwischen-

produkt¹⁰⁻¹³ oder Nebenprodukt¹ bei deren Bildung. Für jede dieser Auffassungen liegen gewisse experimentelle Hinweise vor. MOTHES und WINKLER⁹ erhielten nach Verfütterung von markiertem Elmyoclavlin an reifende Sklerotien des Mutterkornpilzes radioaktives Chanoclavin. AGURELL und RAMSTAD¹⁴ fanden keinen Einbau von markiertem Chanoclavin in andere Clavin-Alkaloide und machten wahrscheinlich, daß in ihrer Versuchsanordnung Chanoclavin auch nicht aus Agroclavin oder einem seiner Folgeprodukte gebildet wird. Zu dem gleichen Ergebnis kamen ursprünglich auch BAXTER et al.¹⁵; später berichtete die gleiche Arbeitsgruppe jedoch über Einbau von Chanoclavin in Agroclavin (4,5% Einbaurrate)¹⁶. ABE hat ursprünglich auf Grund von Beziehungen zwischen Redoxpotential und Alkaloid-

¹ F. WEYGAND u. H. G. FLOSS, Angew. Chem. **75**, 783 [1963]; Angew. Chem. Intern. Ed. in English **2**, 243 [1963].

² E. RAMSTAD u. S. AGURELL, Ann. Rev. Plant Physiol. **15**, 143 [1964].

³ H. PLIENINGER, Vortrag beim 3. Internat. Symposium „Biochemie und Physiologie der Alkaloide“, Halle (Saale), Juni 1965, im Druck.

⁴ A. HOFMANN, R. BRUNNER, H. KOBEL u. A. BRACK, Helv. chim. Acta **40**, 1358 [1957].

⁵ D. GRÖGER, K. MOTHES, H. SIMON, H. G. FLOSS u. F. WEYGAND, Z. Naturforschg. **15 b**, 141 [1960].

⁶ K. MOTHES, F. WEYGAND, D. GRÖGER u. H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. **13 b**, 41 [1958].

⁷ A. J. BIRCH, in: Ciba Foundation Symposium on „Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity“, A. Churchill Ltd., London 1958, S. 247.

⁸ M. ABE, Abh. Dtsch. Akad. Wiss., Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol. **1963**, 309.

⁹ K. MOTHES u. K. WINKLER, Tetrahedron Letters **1962**, 1243.

¹⁰ H. ROCHELMMEYER, Pharmazeut. Ztg. **103**, 1269 [1958].

¹¹ D. GRÖGER, Arch. Pharm. **292**, 389 [1959].

¹² R. VOIGT, Pharmazie **17**, 156 [1962].

¹³ R. VOIGT u. M. BORNSCHEIN, Pharmazie **19**, 342 [1964].

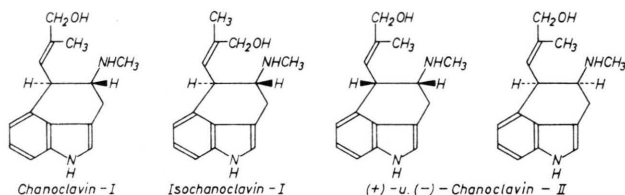
¹⁴ S. AGURELL u. E. RAMSTAD, Arch. Biochem. Biophys. **98**, 457 [1962].

¹⁵ R. M. BAXTER, S. I. KANDEL, A. OKANY u. K. L. TAM, J. Amer. chem. Soc. **84**, 4350 [1962].

¹⁶ S. I. KANDEL, R. M. BAXTER, A. OKANY u. K. L. TAM, Vortrag beim Intern. Symposium on Organic Chemistry of Natural Products, Brüssel 1962.

spektrum von *Claviceps*-Kulturen ein Biogenese-Schema aufgestellt, nach dem Chanoclavin aus Agroclavin entstehen soll⁸. In jüngerer Zeit wurde von ihm über Isotopenversuche berichtet, aus denen er schließt, daß Chanoclavin sowohl aus Agroclavin entstehen als auch in dieses übergehen kann^{17, 18}. VOIGT und BORSCHEN¹³ beobachteten nach Fütterung von nichtmarkiertem Chanoclavin an reife Sklerotien eines Roggenmutterkornstammes auffällige Steigerungen im Gehalt an Ergotamin und Ergometrin verglichen mit unbehandelten Kontrollen und führen dies auf eine Umwandlung des Chanoclavins in diese Alkaloide zurück. Wir¹ beobachteten, daß nach Fütterung von Tryptophan- $^{[3]}\text{H}$ im Überschuß an Kulturen des *Claviceps*-Stammes SD 58 das Chanoclavin eine höhere spezifische Radioaktivität hatte als Agroclavin, Elymoclavin und Penniclavine. Das Chanoclavin kann in dem Falle also nicht aus einem dieser Alkaloide entstanden sein.

Die experimentellen Ergebnisse über die biogenetische Stellung des Chanoclavins sind also außerordentlich widersprüchlich. Eine gewisse Klärung und neue Impulse für die Untersuchung des Problems brachte eine Arbeit von STAUFFACHER und TSCHERTER¹⁹. Diese Autoren isolierten aus Roggenmutterkorn Isomere des Chanoclavins und ordneten den damit insgesamt 4 bekannten Chanoclavinen folgende Konfigurationen zu:



Das bisher bekannte Chanoclavin wird nunmehr als Chanoclavin-I bezeichnet.

Die widersprüchlichen experimentellen Ergebnisse über das „Chanoclavin“ beruhen sicher zumindest teilweise darauf, daß es sich vermutlich bei den untersuchten Chanoclavin-Präparaten nicht immer um Reinsubstanzen und nicht immer um das gleiche Isomere gehandelt hat. Es ist aber nicht von vornherein sicher, daß alle Chanoclavin-Isomere biogenetisch die gleiche Stellung einnehmen. Das ganze

Problem muß daher von neuem unter Verwendung reiner, isomerenfreier Präparate untersucht werden. In der folgenden Arbeit soll über Versuche mit reinem, markiertem Chanoclavin-I berichtet werden.

Methodik

Markierte Verbindungen

L-Tryptophan wurde durch Austausch mit $\text{HO}^3\text{H}/\text{HCl}$ Tritium-markiert²⁰. Elymoclavin- $^{[3]}\text{H}$ wurde durch Verfüterung von L-Tryptophan- $^{[3]}\text{H}$ an den *Claviceps*-Stamm SD 58 erhalten.

Kulturtechnik

Zur Gewinnung von Chanoclavin-I- $^{[3]}\text{H}$ wurde der von uns isolierte *Claviceps paspali*-Stamm Li 342/SE 156 eingesetzt. Dieser durch Selektion gewonnene Stamm bildet etwa 60–80% Chanoclavin-I (bezogen auf Gesamtalkaloidgehalt) und in wechselnden Mengen einfache Lysergsäure-Derivate. Im Durchschnitt werden Alkaloidausbeuten von 500–700 γ/ml erreicht.

Zur Anzucht des Impfmateri als Mycel 14 Tage alter Agarröhrchen in Vorkulturmedium NL 563 überführt und nach 8-tägiger Kulturdauer das Mycel von der Nährlösung unter sterilen Bedingungen abgetrennt. $1/4$ des gewaschenen Mycels wurde nun in das eigentliche Fermentationsmedium NL 500 übertragen. Nach 2–3 Tagen wurden die markierten Verbindungen appliziert und die Versuche nach 8–10-tägiger Fermentation abgebrochen.

Zur Kultivierung des Pilzes verwendeten wir 500 ml Langhalskolben, die mit 100 ml Nährlösung beschickt waren. Die Bebrütung wurde bei $23^\circ \pm 1^\circ$ auf Rundschüttelmaschinen des VEB Fanal, Bad Frankenhausen, durchgeführt.

Für die Umwandlung von Chanoclavin-I in Lysergsäure-Derivate kam der *Claviceps paspali*-Stamm MAR 413/SE 126 (Herkunft Südfrankreich) zum Einsatz. Die Kulturbedingungen waren die gleichen wie oben.

NL 563: 20 g Saccharose; 20 g corn steep solids (Staley); 1,0 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; Aqua dest. ad 1 l; pH eingestellt mit 1-n. NaOH auf 5,4.

NL 500: 30,0 g Ammoniumsuccinat; 30,0 g Mannit; 30 ml Propandiol; 1,0 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; Aqua dest. ad 1 l; pH eingestellt mit HCl auf 5,4.

Die Nährlösungen wurden 15 min bei 120° im Autoklav sterilisiert.

Isolierung von Chanoclavin-I

Die Nährlösungen wurden mit Ammoniak auf pH 10 eingestellt und erschöpfend mit Methylchlorid extrahiert. Nach Einengen wurde der Rohextrakt an einer

¹⁷ M. ABE, S. YAMATODANI, T. YAMANO, Y. KOZU u. S. YAMADA, Agr. Biol. Chem. **27**, 659 [1963].

¹⁸ M. ABE, Vortrag beim 3. Internat. Symposium „Biochemie und Physiologie der Alkaloide“, Halle (Saale), Juni 1965, im Druck.

¹⁹ D. STAUFFACHER u. H. TSCHERTER, Helv. chim. Acta **47**, 2186 [1964].

²⁰ D. GRÖGER, K. MOTHES, H. SIMON, H. G. FLOSS u. F. WEYGAND, Z. Naturforsch. **16b**, 432 [1961].

Säule von Kieselgel 0,05–0,2 mm (Merck) (200-fache Menge bezogen auf den Alkaloidgehalt) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit Ammoniak-gesättigtem CH_2Cl_2 , dem steigende Mengen Methanol (1–3%) zugesetzt wurden. Zuerst ließen sich Lysergsäure-Derivate eluieren und anschließend Chanoclovin gewinnen. Die Chanoclovin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, eingeengt und erneut an einer kurzen Säule von Kieselgel 0,05–0,2 mm (Merck) chromatographiert. Lösungsmittelgemisch: CH_2Cl_2 : Methanol : Äthylacetat (5 : 4,5 : 0,5). Spuren von Lysergsäure-Derivaten ließen sich mit den ersten Fraktionen entfernen und anschließend konnte reines Chanoclovin eluiert werden. Die Chanoclovin-Fractionen wurden vereinigt, vorsichtig unter N_2 zur Trockne gebracht und mit 2-proz. Weinsäurelösung aufgenommen. Nach dem Alkalisieren und erschöpfender Extraktion mit CH_2Cl_2 fiel beim Einengen der organischen Phase reines Chanoclovin-I aus. Schmp. 213–215° (Boetius-Heitzsch). Das IR-Spektrum war mit dem einer Vergleichsprobe völlig identisch, insbesondere fehlten Banden, die für Chanoclovin-II und Isochanoclovin-I charakteristisch sind¹⁹, völlig. Bei der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G, Merck) in verschiedenen Lösungsmittelsystemen ließ sich jeweils nur ein Fleck nachweisen. Spuren anderer Chanoclovin-Isomere waren nicht feststellbar.

System 1: Äthylacetat : Aceton : Dimethylformamid 5 : 5 : 1,

System 2: Chloroform : Methanol (3 : 1) und 1 ml 25-proz. Ammoniak/100 ml organische Phase,

System 3: Chloroform : Methanol (9 : 1) gesättigt mit 25-proz. Ammoniak, Chromatographie in NH_3 -Atmosphäre (15%),

Systeme 2 und 3 in Anlehnung an ACKLIN.

Zur Gewinnung von kleineren Mengen Chanoclovin kann auch die präparative Dünnschichtchromatographie benutzt werden. Wir verwendeten 10 g Kieselgel G Merck pro Platte (20·20 cm). Zur Abtrennung von Lysergsäure-Derivaten und anderen Clavin-Alkaloiden ist das System 1 geeignet. Die weitere Reinigung läßt sich durch mehrfache Chromatographie in den Systemen 2 und 3 erreichen.

Das nach Applikation von Elymoclovin-[³H] erhaltene, kristalline Chanoclovin-I (Versuch 24 V) wurde nach der Radioaktivitätsmessung in Methanol gelöst, mit Aktivkohle behandelt und wieder kristallisiert. Seine Radioaktivität nahm dabei um 80% ab. Wegen Substanzmangel war eine weitere Reinigung nicht möglich.

Isolierung von Lysergsäure-Derivaten (Versuch 23 X 4)

Nach Beendigung der Fermentation haben wir die Alkaloide extrahiert und dünnschichtchromatographisch

(System 1) getrennt. Die Banden der isomeren Lysergsäurecarbinolamide und Lysergsäureamide wurden abgeschabt und eluiert. Nach Umwandlung der Lysergsäurecarbinolamide²¹ in die isomeren Lysergsäureamide wurden diese weiter dünnschichtchromatographisch bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt.

Einbau von Chanoclovin-I in Elymoclovin und Agroclavin

Für diese Versuche dienten der *Claviceps*-Stamm SD 58¹¹ und der von STOLL et al.²² beschriebene *Claviceps*-Stamm vom Pennisetum-Typ. Die Versuche mit dem ersteren wurden submers, die mit dem letzteren in Standkultur durchgeführt. Die Isolierung und Reinigung von Elymoclovin erfolgte in der früher beschriebenen Weise²³, mit folgenden Abwandlungen:

Zur Abtrennung der Hauptmenge des Chanoclavins wurden die aus dem Medium extrahierten Alkaloide in 2-proz. Weinsäure aufgenommen. Diese Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,2 gebracht und das Elymoclovin mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Chanoclovin liegt bei diesem pH-Wert noch als Salz vor²⁴. Nach der Säulenchromatographie wurde das Elymoclovin, ggf. nach Verdünnung mit Trägermaterial, aus Methanol bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität umkristallisiert. Es zeigte sich, daß bei der Umkristallisation mitunter Spuren von Chanoclovin hartnäckig mitgeschleppt werden. Zur Entfernung dieser Verunreinigungen erwies sich die Behandlung mit Aktivkohle als sehr wirksam. Als weitere Reinheitskontrolle wurden nach der letzten Umkristallisation 1–2 mg des Elymoclavins an Kieselgel G (Merck) im System 1 chromatographiert und die Radioaktivität der Elymoclovin-Zone und der dem R_f des Chanoclavins entsprechenden Zone gemessen. Das Präparat wurde als radiochemisch rein angesehen, wenn die Chanoclovin-Zone weniger als 2% der Radioaktivität der Elymoclovin-Zone enthielt.

Im Versuch M 101 B wurde das Agroclavin aus den ersten Fraktionen der Säulenchromatographie isoliert und durch Dünnschichtchromatographie, zuerst an Al_2O_3 G im System CH_2Cl_2 + 0,5% CH_3OH , dann an Kieselgel G im System 1, gereinigt. Seine spezifische Radioaktivität blieb nach der ersten Dünnschichtchromatographie konstant.

Die Radioaktivitätsanalysen erfolgten durch Scintillationszählung (Tri-Carb der Fa. Packard) in BRAYS Lösung²⁵ unter Verwendung eines inneren Standards. Durchschnittliche Meßgenauigkeit ± 2 Prozent.

Ergebnisse

Schon vor längerer Zeit haben wir in Versuchen mit dem *Claviceps*-Stamm SD 58 beobachtet, daß mar-

²¹ D. GRÖGER, *Flora* **153**, 373 [1963].

²² A. STOLL, A. BRACK, H. KOBEL, A. HOFMANN u. R. BRUNNER, *Helv. chim. Acta* **37**, 1815 [1954].

²³ H. G. FLOSS u. D. GRÖGER, *Z. Naturforsch.* **18b**, 519 [1963].

²⁴ S. YAMATODANI, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **34**, 584 [1960]; *C. A.* **59**, 3098 [1963].

²⁵ D. A. BRAY, *Anal. Biochem.* **1**, 279 [1960].

kirtes Chanoclain reproduzierbar mit Einbauraten zwischen 7 und 13% in Elymoclavin umgewandelt wurde²⁶. Nach der Isolierung der Chanoclain-Isomeren¹⁹ tauchten natürlich Zweifel an der Einheitlichkeit der verwendeten Präparate auf. In der Tat zeigte die nachträgliche Untersuchung einer der Proben, daß sie aus einem Gemisch von Chanoclain-I und Chanoclain-II bestand, in dem nur ca. 30% der Radioaktivität als Chanoclain-I vorlagen. Eine Wiederholung der Versuche mit reinem Chanoclain-I war daher notwendig.

Die Möglichkeit dazu ergab sich, als es gelang, durch Selektion einen *Claviceps paspali*-Stamm zu erhalten, der bei guten Alkaloidausbeuten ganz überwiegend Chanoclain-I produziert. Durch Verfütterung von Tryptophan-[³H] an diesen Stamm konnte isomerenfreies, kristallines Chanoclain-I-[³H] hoher spezif. Aktivität gewonnen werden. Tab. 1 zeigt die Ergebnisse zweier derartiger Fütterungsversuche. Die

relativ hohen Einbauraten bestätigen die an sich schon bekannte Tatsache^{14, 1}, daß Chanoclain ebenso wie die übrigen Mutterkornalkaloide aus Tryptophan aufgebaut wird.

Das so gewonnene Chanoclain-I-[³H] wurde in einer Reihe von Versuchen an den *Claviceps*-Stamm SD 58 verfüttert und der Einbau in das Elymoclavin bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tab. 2. Wie man sieht, wird Chanoclain-I sehr gut in Elymoclavin eingebaut. Die außerordentlich hohen Einbauraten lassen kaum einen Zweifel daran, daß es sich um eine direkte Umwandlung, d. h. ohne vorherige Zerlegung des Chanoclain-I in kleinere Bruchstücke und deren Wiedereinbau, handelt. Die Möglichkeit, daß die hohen Einbauraten nur durch Verunreinigung des Elymoclavins mit Chanoclain vorgetauscht werden, konnte durch rigorose Reinigung des Elymoclavins ausgeschlossen werden.

Vers. Nr.	appliziert	appl. Ges. Aktivität [dpm]	Alkaloid-gehalt [mg]	Anteil des Chanoclain-I am ges. Alkaloid [%]	spez. Akt. Chanoclain-I [dpm/mMol]	Ges. Akt. i. Chanoclain-I [dpm]	Einbau-rate in Chanoclain-I [%]
1 (2 Schüttelkulturen)	19.44 mg L-Tryptophan-[³ H], spez. Akt. 3.64 mC/mMol	$7.74 \cdot 10^8$	125	ca. 80	$5.5 \cdot 10^8$	$2.14 \cdot 10^8$	27.7
2 (2 Schüttelkulturen)	17.6 mg L-Tryptophan-[³ H], spez. Akt. 4.37 mC/mMol	$8.3 \cdot 10^8$	188	83	$4.1 \cdot 10^8$	$2.45 \cdot 10^8$	29.5

Tab. 1. Einbau von L-Tryptophan-[³H] in Chanoclain-I durch Schüttelkulturen des *Claviceps paspali*-Stammes Li 342/SE 156.

Versuch Nr.	appliziert	applizierte Aktivität [dpm]	Alkaloid-gehalt [mg]	spez. Akt. d. Elymoclavins [dpm/mMol]	Ges. Aktivität ber. a. Elymocl. [dpm]	Einbau-rate [%]
M 101 A (2 Schüttelkolben)	5 mg Chanoclain-I-[³ H], spez. Akt. 0.25 mC/mMol	$1.07 \cdot 10^7$	110	$7.98 \cdot 10^6$	$3.45 \cdot 10^6$	32.2
M 103 A	1 mg Chanoclain-I-[³ H], spez. Akt. 0.25 mC/mMol	$2.15 \cdot 10^6$	75	$2.42 \cdot 10^6$	$7.15 \cdot 10^5$	33
M 103 B	2.5 mg Chanoclain-I-[³ H], spez. Akt. 0.10 mC/mMol	$2.15 \cdot 10^6$	81	$2.28 \cdot 10^6$	$7.25 \cdot 10^5$	34
M 103 C	5.5 mg Chanoclain-I-[³ H], spez. Akt. 0.045 mC/mMol	$2.15 \cdot 10^6$	81	$2.97 \cdot 10^6$	$8.65 \cdot 10^5$	40

Tab. 2. Einbau von Chanoclain-I-[³H] in Elymoclavin durch Schüttelkulturen des *Claviceps*-Stammes SD 58.

²⁶ Dissertation U. Mothes, TH München 1964; Habilitationsschrift H. G. Floss, TH München 1966.

Versuch	appliziert	applizierte Aktivität	Alkaloid-gehalt	Ges. Aktivität in Lysergsäureamiden	Einbaurate
23 X 4	1,6 mg Chanoclain-I- ^{3}H , 0,186 mC/mMol	$2,52 \cdot 10^6$ dpm	60 mg	$1,19 \cdot 10^5$ dpm	4,7%

Tab. 3. Einbau von Chanoclain-I- ^{3}H in Lysergsäureamide durch *Claviceps paspali*-Stamm MAR 413/SE 126.

Versuch	appliziert	applizierte Aktivität	Alkaloid-gehalt	spezifische Aktivität	Einbau-rate	Ver-dünnung
M 101 B (2 Ober-flächen-kulturen)	15 mg Chanoclain-I- ^{3}H , spez. Akt. 0,25 mC/mMol	$3,21 \cdot 10^7$ dpm	80,4 mg, davon 65 mg Elymoclain	Elymoclain: $1,01 \cdot 10^7$ dpm/mMol Agroclavin: $2,6 \cdot 10^7$ dpm/mMol	Elymoclain 8,0%	Elymoclain 55 Agroclavin 21

Tab. 4. Einbau von Chanoclain-I- ^{3}H in Agroclavin und Elymoclain durch Oberflächenkulturen eines *Claviceps*-Stammes von *Pennisetum typhoideum*.

Zu prinzipiell dem gleichen Ergebnis, nämlich, daß Chanoclain-I in Ergolin-Derivate umgewandelt wird, führte ein Versuch, bei dem Chanoclain-I- ^{3}H an einen Lysergsäureamide-bildenden *Claviceps paspali*-Stamm verfüttert wurde. Die Einbaurate (Tab. 3) ist hier mit 4,7% wesentlich niedriger, jedoch ebenfalls durch konstante spezifische Radioaktivität der erhaltenen Lysergsäureamide gesichert.

Uns interessierte weiter die Frage, ob Chanoclain-I nur in Elymoclain und seine Folgeprodukte umgewandelt wird oder ob es auch in Agroclavin übergeht. Wir haben daher Chanoclain-I- ^{3}H auch an den von STOLL et al.²² beschriebenen *Claviceps*-Stamm vom *Pennisetum*-Typ verfüttert und danach aus dem Alkaloidgemisch, das Agroclavin, Chanoclain und Elymoclain im Verhältnis 1 : 10 : 45 enthielt, Elymoclain und Agroclavin isoliert. Chanoclain-I wurde in beide Verbindungen eingebaut (Tab. 4) und der Verdünnungsfaktor für Elymoclain war $2^{1/2}$ -mal höher als der für Agroclavin. Da Agroclavin sehr leicht in Elymoclain übergeht^{14, 26}, ist also anzunehmen, daß die Umwandlung von Chanoclain-I in Elymoclain über das Agroclavin erfolgt.

Es war schließlich noch zu klären, ob Chanoclain-I auch aus Elymoclain entstehen kann. Ein

entsprechender Versuch, bei dem Elymoclain- ^{3}H verfüttert wurde, ergab eine außerordentlich niedrige Einbaurate (Tab. 5). Dieser Wert ist noch als Maximalwert anzusehen, da das erhaltene Chanoclain-I nicht bis zur konstanten spezif. Aktivität gereinigt werden konnte. Eine Umwandlung von Elymoclain in Chanoclain-I findet also in dem verwendeten *Claviceps paspali*-Stamm nicht statt. Auch in früheren Versuchen mit dem Stamm SD 58 haben wir keine Umwandlung von Elymoclain oder Agroclavin in Chanoclain nachweisen können²⁶.

Diskussion

Die angeführten Versuche zeigen eindeutig, daß Chanoclain-I in drei untersuchten *Claviceps*-Stämmen in Ergolin-Derivate umgewandelt wird. Der Reaktion kommt also offensichtlich allgemeinere Bedeutung zu. In zwei untersuchten Stämmen erwies sich die Umwandlung von Chanoclain-I in Elymoclain bzw. Agroclavin außerdem als irreversibel. Die von anderen Autoren^{9, 17, 18} angenommene Ringöffnung von Ergolin-Derivaten war in unseren Versuchen nicht nachweisbar.

Da im Chanoclain-I die Hydroxymethylgruppe in *trans*-Stellung zum Ring steht, gibt es für seine

Versuch	appliziert	applizierte Aktivität	Alkaloid-gehalt	Ges. Aktivität in Chanoclain-I	Einbaurate
24 V	19 mg Elymoclain- ^{3}H , spez. Akt. 0,3 mC/mMol	$4,95 \cdot 10^7$ dpm	92 mg, davon 46 mg Chanoclain-I	$1,3 \cdot 10^4$ dpm	0,027%

Tab. 5. Nichteinbau von Elymoclain- ^{3}H in Chanoclain-I durch *Claviceps paspali*, Stamm Li 342/SE 156.

Umwandlung in Elymoclavin zwei Möglichkeiten: oxydativer Ringschluß zwischen der *cis*-ständigen Methylgruppe und dem Aminostickstoff oder Ringschluß zwischen der Hydroxymethylgruppe und dem Aminostickstoff nach vorheriger *cis-trans*-Isomerisierung. Mit dem Nachweis, daß Chanoclavin-I auch in Agroclavin übergeht, — und zwar mit geringerer biologischer Verdünnung als in Elymoclavin —, ist gezeigt, daß wahrscheinlich die zweite der beiden Möglichkeiten zutrifft.

Es konnte gezeigt werden, daß der Mutterkornpilz alle Schritte der Reaktionsfolge Tryptophan → Chanoclavin-I → Agroclavin → Elymoclavin → Lysergsäure-Derivate ausführen kann. Ob diese Sequenz der Hauptweg der Ergolin-Biosynthese ist, das Chanoclavin-I also ein obligatorisches Zwischenprodukt darstellt, oder ob daneben noch eine Reaktionsfolge vom Tryptophan zu den Ergolinen existiert, die nicht über das Chanoclavin-I führt, läßt sich nach

den bisherigen Versuchen nicht eindeutig entscheiden. Obwohl die z. T. sehr hohen Einbauraten bei den einzelnen Schritten dafür sprechen, daß es sich um den Hauptweg der Biosynthese handelt, wird man doch die Möglichkeit im Auge behalten müssen, daß das Chanoclavin-I nur in einem Nebenweg der Biosynthese liegt oder daß es mit einem der Zwischenprodukte des Hauptweges im Gleichgewicht steht. Versuche zur Klärung dieser Frage und der nach dem Mechanismus der Isomerisierung des Chanoclavin-I sind gegenwärtig im Gange.

Wir danken den Herren Dr. A. HOFMANN und Dr. A. BRACK, Basel, für die Überlassung von Reinkalkaloiden und Pilzmaterial. Herrn Dr. W. ACKLIN, Zürich, sind wir für die Mitteilung unveröffentlichter Arbeitsvorschriften zur chromatographischen Trennung der Chanoclavin-Isomere zu großem Dank verpflichtet. Einer der Autoren (H. G. F.) dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung einer Sachbeihilfe.

Remarks on the Biosynthesis of Gramine

ALBERTO BRECCIA and ANNA MARIA CRESPI

Istituto Chimico "G. Ciamician" Università di Bologna
Centro Nazionale Chim. Rad. del C.N.R. Sez. III, Bologna, Italy

(Z. Naturforsch. **21 b**, 832—835 [1966]; eingegangen am 2. Juni 1966)

The biosynthesis of gramine was tested by growing the germinating barley in media containing pyruvic, 2-¹⁴C acid, *N*-benzyloxycarbonyl-tryptophan β -¹⁴C and tryptophan, β -¹⁴C. Iso-nicotinylhydrazide was also added in a series of experiments to inhibit the cleaving action of pyridoxal phosphate. The presence of the inhibitor reduces the total uptake of tryptophan and benzyloxycarbonyl-tryptophan by a factor of 15–20, while the uptake of pyruvic acid and the total production of gramine were reduced by a factor of only 0.5. This fact suggests an alternative route for the biosynthesis of gramine, when the path via tryptophan is blocked.

Recent investigations carried out by LEETE et al.^{1, 2} have confirmed that 3-methyleneindole nucleus derived from tryptophan is utilized entirely for the synthesis of gramine, an indole alkaloid present in barley sprouts. The 3-methyleneindole nucleus is thus a direct precursor of gramine. Formation of the latter is suggested to involve the removal of the amine group from tryptophan by pyridoxal phosphate.

There is, however, some disagreement about the nature of precursors and the extent to which they are incorporated in the gramine formed. This is

partly due to the fact that different authors used different culture media^{1–4}. Not well stated results have also been published on the period of the *in vivo* formation of gramine⁶. These facts have prompted us to re-examine the mechanism of the gramine synthesis.

Barley sprouts were grown from grains on the presence of labelled precursors such as tryptophan, β -¹⁴C, *N*-benzyloxycarbonyl-tryptophan, β -¹⁴C, and pyruvic acid, 2-¹⁴C. Iso-nicotinyl hydrazide was added in one series of experiments to inhibit specifically the cleaving action of pyridoxal phosphate;

¹ D. O. DONOVAN and E. LEETE, J. Amer. chem. Soc. **85**, 461 [1963].

² B. G. GOWER and E. LEETE, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3683 [1963].

³ A. BRECCIA and L. MARION, Can. J. Chem. **37**, 1066 [1959].

⁴ F. WHIGHTMAN, M. D. CHISOLM, and A. C. NEISH, Phytochemistry **1**, 30 [1961].