Abb. 6. Liquiduskurve im System Arsenetrichlorid – Äthylbenzol, $\text{AsCl}_3 - \text{C}_6\text{H}_5\text{C}_2\text{H}_5$.

nommen (Abb. 2 – 6). Die Mischungen neigen zur Unterkühlung, wodurch die Messungen sehr erschwert wurden. Der Verlauf der Liquiduskurven in

den Systemen $\text{AsCl}_3 - p\text{-Xylol}$ und $\text{AsCl}_3 - \text{Äthylbenzol}$ ist deswegen teilweise unsicher und in den Abbildungen nur gestrichelt eingezeichnet. Im System $\text{AsCl}_3 - (\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CH}_2$ konnten Mischungen von 45 bis 60 Mol-% AsCl_3 überhaupt nicht zur Kristallisation gebracht werden. Anm. b. d. Korrr.: Kürzlich haben W. S. GRETSCHISCHKIN u. I. A. KJUNZEL KQR-Untersuchungen an AsCl_3 - und AsBr_3 -Aromat-Verbindungen veröffentlicht (Tr. Estestv. Nauchn. Inst. pri Permsk. Univ. 11 (4), 9 [1966]; nach C. A. 67, 77742j [1967]).

Für die Durchführung der Schmelzpunktbestimmungen in den Systemen $\text{AsCl}_3 - \text{ArH}$ sind wir Fräulein K. SHANNON zu Dank verpflichtet. Dem Verband der Chemischen Industrie danken wir für eine Beihilfe.

Biosynthese der Mutterkornalkaloide

Über die Herkunft der Seitenkette im d-Lysergsäure-methylcarbinolamid

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

Institut für Biochemie der Pflanzen der DAW, Halle (Saale)* und School of Pharmacy,
Purdue University- Lafayette/USA **

(Z. Naturforsch. 23 b, 177–180 [1968]; eingegangen am 24. Mai 1967)

Using a strain of *Claviceps paspali* Mar 488 it has been shown that alanine-2- ^{14}C is incorporated with high efficiency in the carbinol amide moiety of d-Lysergic acid- α -hydroxyethylamide=II. After feeding of DL-alanine- ^{15}N , DL-aspartic acid- ^{15}N and L-glutamine- ^{15}N the highest specific incorporation rate was observed with DL-alanine- ^{15}N . Short term experiments with DL-alanine- ^{15}N revealed, that the greater part of the ^{15}N -excess is localized in the N-atom of the side-chain of II. The carbinolamide moiety of the isolated alkaloid arises probably from alanine or a closely related compound.

Die Biosynthese des Ergolin-Ringsystems – ausgehend von Tryptophan und einer C_5 -Einheit – sowie die biogenetischen Beziehungen der Clavine und Lysergsäure untereinander sind in verschiedenen Laboratorien intensiv untersucht worden¹. Wenig ist dagegen über die in vivo-Synthese der Seitenketten säureamidartiger Derivate der Lyserg- bzw. Isolysergsäure vom Peptid-, Alkanolamid-, Amid- und Carbinolamid-Typ (I) bekannt. Die Herkunft der Seitenkette im Lysergsäuremethylcarbinolamid = II, des Hauptalkaloids zahlreicher *Claviceps paspali*-Stämme, ist von AGURELL^{2, 3} untersucht worden. Nach Applikation von Lysergsäure- bzw. Iso-

lysergsäureamid- H^3 (III) an einen Carbinolamid-bildenden Stamm ließ sich nur inaktives (II) isolieren. Die Bildung von (II) durch Alkylierung (Acetylierung und nachfolgende Reduktion) der entsprechenden Lysergsäureamide findet offenbar nicht statt. Weiterhin wäre denkbar, daß im Zuge der Synthese von (II) die Amidgruppe des Lysergsäureamids durch Äthylamin ersetzt wird und nachfolgend die Oxydation zum Carbinolamid stattfindet, in Analogie etwa zur Theanin-Biosynthese. Bei Versuchen mit Äthylamin- ^{14}C konnte AGURELL² jedoch nur nicht-markierte Alkaloide nachweisen.

¹ Übersichten: F. WEYGAND u. H. G. FLOSS, Angew. Chem. 75, 783 [1963]; E. RAMSTAD u. S. AGURELL, Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 143 [1964]; H. PLIENINGER, Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Biol. Geol. 1966, No. 3, 387.

² S. AGURELL, Acta pharmac. Suecia 3, 33 [1966].

³ S. AGURELL, Acta pharmac. Suecia 3, 71 [1966].

I Allgemeine Formel
Derivate der Lysergsäure. R=Tripeptid oder einfachere
Amid-Derivate.

II R=CH₃CH(OH)
III R=H

Diese beiden Möglichkeiten scheiden also aus, und AGURELL postuliert nun, daß Lysergsäure und Alanin durch eine Peptidbindung zu Lysergylalanin = (IV) verknüpft werden. Reduktion der Carboxylgruppe des Alanins in (IV) würde zum Ergometrin führen; eine Hydroxylierung des Lysergylalanins und nachfolgende Decarboxylierung könnte Carbinolamid ergeben. CASTAGNOLI und TONOLO⁴ applizierten eine Reihe von ¹⁴C-markierten Verbindungen an *Cl. paspali*, isolierten (II) und bestimmten die Einbauraten sowie den %-Gehalt der in der Seitenkette lokalisierten Radioaktivität. Hohe Einbauraten in das Alkaloid ergaben Tryptophan-3-¹⁴C (24%), Acetat-1-¹⁴C (10,1%), Formiat-¹⁴C (6,6%). Der Carbinolamid-Teil vom (II) war bei diesen Versuchen praktisch inaktiv. Nach Serin-3-¹⁴C-Fütterung ließen sich 2,4% der Radioaktivität des Alkaloids in der Seitenkette nachweisen. Besonders hoch war der Anteil der Radioaktivität im Monoalkylamid-Teil von (II) nach der Applikation von Pyruvat-2-¹⁴C und Alanin-U-¹⁴C. Er betrug jeweils 38,9% und 41,3% der Gesamt-Radioaktivität. Die Einbauraten dieser Vorstufen in das Lysergsäurecarbinolamid lagen bei 1,6% und 3,75 Prozent.

Wir haben ähnliche Versuche unter Verwendung von Alanin-2-¹⁴C und verschiedener ¹⁵N-markierter Verbindungen durchgeführt. Insbesondere interessierte uns die Herkunft des Stickstoffs im Monoalkylamidteil von (II).

Methodik

Für diese Untersuchungen wurde der *Claviceps paspali*-Stamm MAR 488 eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in einem zweistufigen Prozeß. Zur Anzucht des Mycels diente ein corn-steep-Medium (NL 521)⁵. Nach etwa 6-tägiger Kultivierung wurde das Mycel abgetrennt, gewaschen und in das eigentliche Fermentationsmedium NL 619 überführt.

Hauptkultur NL 619 Sorbit 50,0 g; Ammonsuccinat 30,0 g; Propylenglycol 20 ml; KH₂PO₄ 1,0 g; MgSO₄ 0,3 g; Aqua dest. at 1000,0 ml, pH 5,4 eingestellt mit HCl.

Nach 2–3 Tagen erfolgte die Zugabe der markierten Verbindungen. Die Versuchsdauer ist den Tabn. 1–3 zu entnehmen. Nach Abtrennen des Mycels wurde die Nährlösung sofort mit Bicarbonat schwach alkalisch gestellt (pH 7,8) und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Beim Einengen am Rotationsverdampfer fiel Lysergsäure-methylcarbinolamid, welches etwa 2–5% Ergometrin enthielt, aus. Das so erhaltene Rohalkaloid haben wir aus Chloroform umkristallisiert.

Der Schmelzpunkt, das IR-Spektrum sowie das DC-chromatographische Verhalten unseres Präparates stimmten mit dem einer authentischen Probe von Lysergsäure-methylcarbinolamid überein.

Abspaltung von Acetaldehyd: Etwa 20–30 mg des Alkaloids wurden in 6 ml Sörensen-Puffer pH 7,8 gelöst und das Ganze unter Durchleiten von Stickstoff 2 Stdn. auf 70–80° erhitzt. Als Vorlage diente eine 0,5 proz. Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2-n. HCl. Das ausgefallene Acetaldehyd-dinitrophenylhydrazon haben wir wiederholt aus Äthanol umkristallisiert, Schmp. 147°.

Hydrolyse von Lysergsäuremethylcarbinolamid: Etwa 50 mg des Alkaloids wurden in wenig Methanol gelöst und anschließend 5 ml 8-proz. KOH hinzugegeben. Sodann wurde unter Durchleiten eines N₂-Stromes 1 Stde. auf dem Wasserbad erhitzt. Als Vorlage diente 7 ml 0,1-n. HCl. Nach Abdestillieren blieb NH₄Cl zurück, welches über P₂O₅ getrocknet wurde.

Die ¹⁵N-Bestimmung erfolgt nach dem von MUNSCH⁶ angegebenen Verfahren. Zur Lichtemission wurde der Stickstoff mit dem Hochfrequenzgenerator HF 3 angeregt und das Spectrum mit dem Quarzspektrographen Q 24 aufgenommen. Zur Radioaktivitätsbestimmung diente der Methan-Durchflußzähler der Firma Friesecke und Höpfner.

⁴ N. CASTAGNOLI, JR., u. A. TONOLO, IX. Int. Congr. for Microbiology, Moscow 1966, Symposia, p. 31.

⁵ H. G. FLOSS, H. GÜNTHER, D. GRÖGER u. D. ERGE, Z. Naturforschg. **21b**, 128 [1966].

⁶ D. MUNSCH, Kernenergie **8**, 32 [1965].

Ergebnisse und Diskussion

Die Einbauraten nach Fütterung von Alanin-2-¹⁴C (Tab. 1) liegen bei etwa 3 Prozent. Beide Versuche zeigen, daß in der Seitenkette des Lysergsäure-methylcarbinolamids ein erheblicher Teil der Radioaktivität lokalisiert ist. Im Vergleich zu den Ergebnissen von CASTAGNOLI und TONOLO⁴, die etwa 40% der Radioaktivität im Monoalkylamid-Teil von (II) fanden, liegen die Werte unter unseren Bedingungen noch höher. Dies könnte einmal durch das unterschiedliche Pilzmaterial sowie eine andere Kulturtechnik bedingt sein (so ist z. B. die Versuchsdauer von (4) nicht bekannt). Weiterhin ist von (4) Alanin-U-¹⁴C eingesetzt worden, während wir in 2-Stellung markiertes Alanin verfüttert haben. Man darf annehmen, daß im Zuge der Carbinolamid-Synthese Alanin decarboxyliert wird und die in der Carboxylgruppe lokalisierten Radioaktivität nicht oder unspezifisch inkorporiert worden ist.

In weiteren Versuchen sollte die Herkunft des Carbinolamid-Stickstoffs geklärt werden. So wurden unter gleichen Versuchsbedingungen (Versuch 36 B, Tab. 2) verschiedene ¹⁵N-markierte Verbindungen appliziert und der ¹⁵N-Überschuß im Alkaloid und im Monoalkylamid-Teil bestimmt. Gefüttert wurden Alanin-¹⁵N, Aspartat-¹⁵N sowie Glutamin-CO¹⁵NH₂. Die beiden letztgenannten Verbindungen sind an zahl-

reichen Transaminierungs-Reaktionen beteiligt und der Amid-N des Glutamins wird leicht auf andere Verbindungen übertragen (z. B. bei der Anthranilsäure-, Purin- und Histidin-Synthese). Ähnliches wäre auch hier denkbar: Eine Reaktion von Lysergsäure und Ammoniak (vom Glutamin) könnte zum Lysergsäureamid (III) führen und dieses eventuell mit einer C₂-Einheit zum Carbinolamid umgesetzt werden. Allerdings sprechen die Befunde von AGURELL² mit Lysergsäureamid-³H gegen eine derartige Reaktionsfolge. Auch in unseren Versuchen war der ¹⁵N-Überschuß bei Glutamin-CO-¹⁵NH₂-Fütterung wesentlich geringer als nach Aspartat- und Alaninfütterung (Tab. 2). Die höchste spezifische Einbaurate wurde mit Alanin erzielt. Der Einbau des Aspartat-¹⁵N könnte durch eine Transaminierungs-Reaktion vielleicht nach dem Schema Aspartat + Pyruvat → Alanin erklärt werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund von CASTAGNOLI und TONOLO, die nach Pyruvat-2-¹⁴C-Fütterung einen ähnlich großen Einbau im Carbinolamid wie nach Fütterung von Alanin-U-¹⁴C finden konnten.

Vergleicht man in den Versuchen 36 B₅₋₈ (Tab. 2) sowie 35 K (Tab. 3) den ¹⁵N-Überschuß im Alkaloid (3 N-Atome) und im Carbinolamid-Anteil (1 N-Atom), so fällt auf, daß die ¹⁵N-Anreicherung im Monoalkylamid-Teil nur geringfügig größer ist als die im Alkaloid. Bei einem spezifischen Einbau des

Versuch	Alanin appliziert	Gebildetes Alkaloid	Gesamtaktivität des Alkaloids	Spez. Aktivität des Alkaloids	Spez. Aktivität Acetaldehyd-DNP	Radioaktiv. in der Seitenkette [%]
30 P	6 mg 6 · 10 ⁷ Ipm	70 mg	1,47 · 10 ⁶ Ipm	6,55 · 10 ⁶ Ipm/mMol	3,7 · 10 ⁶ Ipm/mMol	57
36 Y	12,2 mg	205 mg	3,52 · 10 ⁶ Ipm	5,35 · 10 ⁶ Ipm/mMol	3,82 · 10 ⁶ Ipm/mMol	71

Tab. 1. Einbau von L-Alanin-2-¹⁴C in Lysergsäure-methylcarbinolamid. Spezifische Aktivität des Alanins 8,8 · 10⁸ [Imp/mM]. Versuchszeit 4 Tage.

Versuchs-Nr.	Applizierte Verbindungen, in Klammern ¹⁵ N-Überschuß	¹⁵ N-Überschuß im Alkaloid [%]	¹⁵ N-Überschuß im Carbinolamid-N [%]	Spez. Einbaurate im Carbinolamid-N [%]
36 B 5—8	90 mg DL-Alanin- ¹⁵ N (52,2%)	0,47	0,58	1,11
36 B 9—12	84 mg DL-Asparaginsäure- ¹⁵ N (40%)	0,26	0,33	0,82
36 B 13—16	80 mg L-Glutamin-CO- ¹⁵ NH ₂ (52%)	0,24	0,18	0,35

Tab. 2. Applikation verschiedener ¹⁵N-markierter Verbindungen an *Cl. paspali*. Für jeden Versuch wurden 4 100-ml-Schüttelkulturen eingesetzt. Der Gesamtalkaloidgehalt betrug ~350 mg. Versuchsdauer: 4 Tage.

Versuchs-Nr.	Versuchsdauer	¹⁵ N-Überschuß im Alkaloid [%]	¹⁵ N-Überschuß im Carbinolamid-N [%]	Spez. Einbaurate im Alkaloid [%]	Spez. Einbaurate im Carbinolamid-N [%]
36 Y 3—4	8 ^h	0,50	1,03	0,96	1,98
36 Q 1—4	22 ^h	0,82	1,49	1,57	2,88
36 Q 5—8	48 ^h	0,60	0,97	1,15	1,9
35 K	4 Tage	0,48	0,53	0,92	1,02

Tab. 3. Einbau von DL-Alanin-¹⁵N in Lysergsäure-methylcarbinolamid. Es wurden jeweils 80 mg an 2 bzw. 4 100-ml-Kulturen appliziert. Der ¹⁵N-Überschuß im Alanin betrug 52,2 Prozent.

Alanin-¹⁵N in die Seitenkette des Alkaloids müßten sich die Werte (¹⁵N-Überschuß) Carbinolamid-N : Alkaloid-N wie 3 : 1 verhalten. Das ist aber nicht der Fall. Daraus geht hervor, daß bei Alanin-Fütterung (Versuchsdauer 4 Tage) auch in den beiden N-Atomen des Ergolins sich ein beträchtlicher Teil des ¹⁵N befinden muß. Offenbar wird ein großer Teil des Alanin-Stickstoffs schnell durch Transaminierungs-Reaktionen in den allgemeinen Stickstoffpool eingeschleust und von dort der Ergolin-Synthese zugeführt. Wir haben deshalb Kurzzeitversuche unternommen und nach der Applikation von Alanin-¹⁵N in Intervallen von 8, 22 und 48 Std. (Tab. 3) geerntet. Verläuft der Einbau von Alanin in die Seitenkette schneller als die Transaminierung und der nachfolgende Einbau des Stickstoffs in das Ergolin-System, so sollte der ¹⁵N-Überschuß im Carbinol-

amid größer als im Alkaloid sein. Wie die Tab. 3 zeigt, ist diese Annahme richtig, da bei den kurzen Versuchszeiten sich die ¹⁵N-Werte Carbinolamid : Alkaloid etwa wie 2 : 1 verhalten. Das theoretisch zu erwartende Verhältnis 3 : 1 ließ sich nicht erreichen, da Transaminierungs-Reaktionen nicht verhindert werden können. Auf Grund der Versuche mit Alanin-¹⁵N und Alanin-2-¹⁴C darf man annehmen, daß diese Aminosäure am Aufbau der Seitenkette des Lysergsäurecarbinolamids beteiligt ist. Ob Lysergylalanin dabei als Zwischenstufe durchlaufen wird und in welcher Weise die Hydroxylierung erfolgt, muß noch geprüft werden.

Wir danken Herrn Professor Dr. ARCAMONE, Mailand, Farmitalia, für die Überlassung einer Probe d-Lysergsäure-methylcarbinolamid.