

BURCHARD FRANCK und TILL RESCHKE

Mutterkorn-Farbstoffe, II¹⁾

**Isolierung der Hydroxy-anthrachinon-carbonsäuren
Endocrocin und Clavorubin aus Roggenmutterkorn²⁾**

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 29. September 1959)

Aus dem Methanolextrakt von ungarischem Mutterkorn wurden zwei neue Farbstoffe isoliert. Der eine ist mit dem zuerst von Y. ASAHIKA aus *Nephromopsis endocrocea* isolierten *Endocrocin*, 1,6,8-Trihydroxy-2-carboxy-3-methyl-anthrachinon (V), identisch. Von den acht bisher beschriebenen Mutterkorn-Farbstoffen, die biogenetisches Interesse besitzen, konnte damit der erste aufgeklärt werden. *Clavorubin*, der zweite Farbstoff, ist wahrscheinlich ebenfalls ein Trihydroxy-anthrachinon-Derivat.

Die violett und schwarz gefärbten Sklerotien des Roggenmutterkornpilzes *Claviceps purpurea* enthalten außer den therapeutisch verwendeten Mutterkorn-Alkaloiden eine Reihe gelber bis violetter Farbstoffe. Im Gegensatz zu den vor allem von A. STOLL³⁾ erschöpfend untersuchten Alkaloiden ist über die Farbstoffe wenig bekannt. Sie sind durch neuere Befunde interessant geworden, die einen Zusammenhang mit der Biosynthese der Mutterkorn-Alkalioide vermuten lassen.

A. ST. GARAY und H. ADAM⁴⁾ fanden bei verschiedenen Sklerotien ein fast konstantes Verhältnis von Alkaloiden und gelben Mutterkorn-Farbstoffen. Untersuchte Leukosklerotien enthielten weniger Alkalioide, als die pigmentierten. Einen „Leukostamm“ von *Claviceps purpurea* mit gelblich-weißen Sklerotien, der völlig alkaloidfrei ist, beschreiben A. SILBER, K. MOTHES und D. GRÖGER⁵⁾.

Wie man annimmt, werden phenolische Naturfarbstoffe aus Acetat- bzw. Polyacetateinheiten⁶⁾ und Alkalioide durch Umwandlung von Aminosäuren gebildet⁷⁾. Jedoch bestehen insofern Übergänge⁸⁾ zwischen diesen beiden Biosynthesewegen, als manche Alkalioide, wie z. B. *Chaksin* (I)⁹⁾, *Pilocerein* (II)¹⁰⁾ und *Sedinin* (III)¹¹⁾

1) I. Mitteil.: B. FRANCK und T. RESCHKE, Angew. Chem. 71, 407 [1959].

2) Vorgetragen auf dem Symposium über Biochemie des XVII. IUPAC-Kongresses am 3. Sept. 1959 in München.

3) A. STOLL in L. ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe IX, S. 114, Wien, Springer-Verlag 1952.

4) Naturwissenschaften 42, 646 [1955]. 5) Die Kulturpflanze III, 90 [1955].

6) A. J. BIRCH in L. ZECHMEISTER, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe XIV, S. 186, Wien, Springer-Verlag 1957.

7) R. ROBINSON, The Structural Relations of Natural Products, Clarendon Press, Oxford 1955, S. 59.

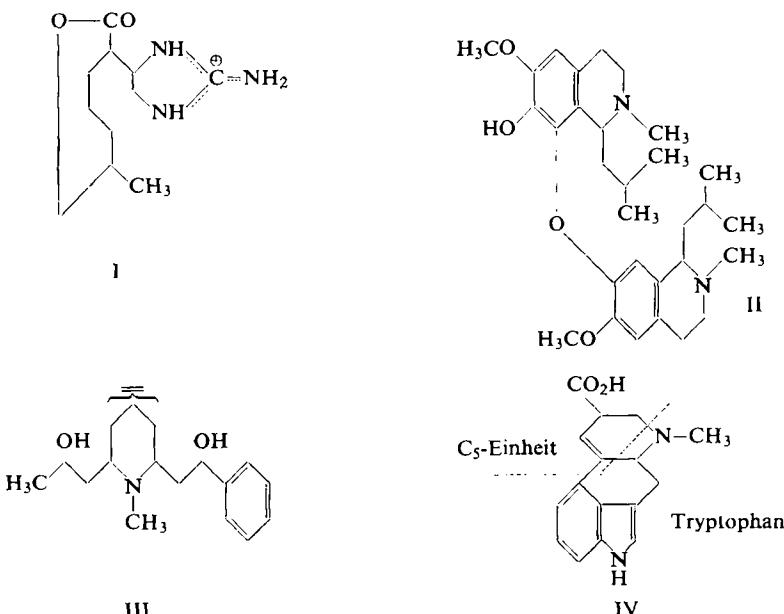
8) E. WENKERT, Experientia [Basel] 15, 165 [1959].

9) K. WIESNER, Z. VALENTA, B. S. HURLBERT, F. BICKELHAUPT und L. R. FOWLER, J. Amer. chem. Soc. 80, 1521 [1958].

10) C. DJERASSI, S. K. FIGLER, J. M. BOBBIT und F. X. MARKLEY, J. Amer. chem. Soc. 79, 2203 [1957].

11) B. FRANCK, Chem. Ber. 92, 1001 [1959].

den Einbau von Acetat- oder Mevalonat-Einheiten deutlich erkennen lassen. Auch an der Biosynthese der in den Mutterkorn-Alkaloiden enthaltenen *Lysergsäure* (IV) ist nach K. MOTHES u. a.¹²⁾ eine möglicherweise von Mevalonsäure herrührende



C_5 -Einheit beteiligt. Es ergibt sich die Frage, ob diese C_5 -Einheit auch zum Aufbau der Mutterkorn-Farbstoffe nötig ist und so den Zusammenhang zwischen Alkaloid- und Farbstoffbildung bei *Claviceps purpurea* erklärt. Um diesen Beziehungen nachzugehen, wurde zunächst mit der Konstitutionsermittlung der Mutterkorn-Farbstoffe begonnen.

Obwohl bereits vor achtzig Jahren G. DRAGENDORFF und V. PODWYSSOTSKY¹³⁾ das gelbe *Sclerocristallin* als ersten kristallisierten Mutterkorn-Farbstoff isolierten und späterhin zahlreiche Arbeiten über Isolierung und Charakterisierung weiterer Mutterkorn-Farbstoffe (Tab. 1) erschienen, gelang es bisher nicht, die Struktur eines dieser bemerkenswerten Farbstoffe aufzuklären. Man kann das darauf zurückführen, daß die Farbstoffe alkaliempfindlich und nur in geringer Menge als ein kompliziertes, mit klassischen Methoden schwer trennbares Gemisch im Mutterkorn enthalten sind.

Bedingt durch die Beschaffenheit unseres, aus der Alkaloidfabrikation herrührenden Ausgangsmaterials haben wir uns zunächst den hydrophilen Farbstoffanteilen des Mutterkorns zugewandt und konnten daraus zwei neue Farbstoffe isolieren. Nebenher gewannen wir dabei auch bekannte Mutterkorn-Farbstoffe, über die später berichtet werden soll.

¹²⁾ K. MOTHES, F. WEYGAND, D. GRÖGER und H. GRIESEBACH, Z. Naturforsch. 13b, 41 [1958].

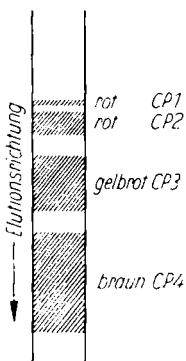
¹³⁾ Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 6, 174 [1877].

Tab. 1. Bisher isolierte Mutterkorn-Farbstoffe

1) Sclerocristallin*)	(G. DRAGENDORFF und V. PODWYSSOTSKY ¹³⁾ 1877)	gelb
2) Sclererythrin	(G. DRAGENDORFF und V. PODWYSSOTSKY ¹³⁾ 1877)	violett
3) Ergochrysin*)	(C. JACOBY ¹⁴⁾ 1897)	gelb
4) Secalonsäure*)	(F. KRAFT ¹⁵⁾ 1906)	gelb
5) Ergoxanthin	(WENZELL ¹⁶⁾ 1910)	gelb
6) Ergoflavin	(A. FREEBORN ¹⁷⁾ 1912)	gelb
7) Chrysergonsäure	(A. STOLL, J. RENZ und A. BRACK ¹⁸⁾ 1952)	zitronengelb
8) Endocrocin	(B. FRANCK und T. RESCHKE ¹⁾ 1959)	gelbrot
9) Clavorubin	(B. FRANCK und T. RESCHKE ¹⁾ 1959)	rot

*) Sclerocristallin, Ergochrysin und Secalonsäure sind möglicherweise z. T. miteinander identisch¹⁹⁾.

Als Ausgangsmaterial stand uns Roggenmutterkorn ungarischer Herkunft zur Verfügung, aus dem Alkaloide und Fette mit hydrophoben Lösungsmitteln extrahiert worden waren. Durch Perkolieren mit 80-proz. wäßr. Methanol und Verteilen zwischen Chloroform/wäßr. Salzsäure ließ sich daraus ein Gemisch saurer Farbstoffe in der auf Mutterkorn bezogenen Ausbeute von 0.03% isolieren. Es konnte Verteilungschromatographisch mit wassergesätt. n-Butanol an pufferimprägniertem Cellulosepulver (s. Versuchsteil) in vier Zonen (Abbild. 1) aufgetrennt werden. Da wir dasselbe Farbstoffgemisch auch aus einer Probe nicht vorextrahierten Mutterkorns isolierten, ist die Vorbehandlung unseres Ausgangsmaterials ohne Einfluß auf die Farbstoffe.



Abbild. 1.
Säulenchromatogramm des
Rohfarbstoffgemisches von
Claviceps purpurea
an pufferimprägniertem
Cellulosepulver

Durch präparative Trennung an einer Säulenbatterie aus pufferimprägniertem Cellulosepulver und Nachchromatographieren an Kieselgel wurden die gelbrote (CP 3) und die rote Hauptkomponente (CP 2) rein dargestellt. Sie sind, wie die Charakterisierung ergab, mit keinem der bisher bekannten Mutterkorn-Farbstoffe identisch. Zur papierchromatographischen Untersuchung dieser Mutterkorn-Farbstoffe war wassergesätt. tert.-Amylalkohol auf Papier, das mit 0.5 m p_{H} 7-Phosphatpuffer imprägniert ist, am besten geeignet. Ein Vergleich mit *Chrysergonsäure*¹⁸⁾, einem Vertreter aus der Reihe der schon bekannten, stärker hydrophoben, hellgelben Mutterkorn-Farbstoffe, gelang in diesem Lösungsmittelsystem nicht, weil der Farbstoff am Startkreis verblieb. Für den Vergleich geeignet war jedoch das System n-Butanol / Triäthylamin / Pyridin / Wasser

14) Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **39**, 104 [1897].

15) Arch. Pharmaz. **244**, 336 [1906].

16) Amer. J. Pharm. **82**, 410 [1910].

17) Pharmac. J. **88**, 568 [1912].

18) Helv. chim. Acta **35**, 2022 [1952].

19) W. BERGMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1486 [1932].

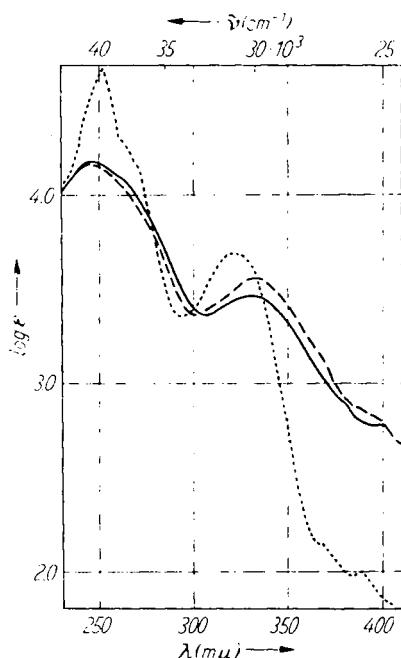


Abbildung 2. UV-Spektren der acetylierten Mutterkorn-Farbstoffe CP3 (—) und CP2 (---), sowie von Anthrachinon (····) in Methanol

mit den charakteristischen Absorptionsbanden des Anthracens.

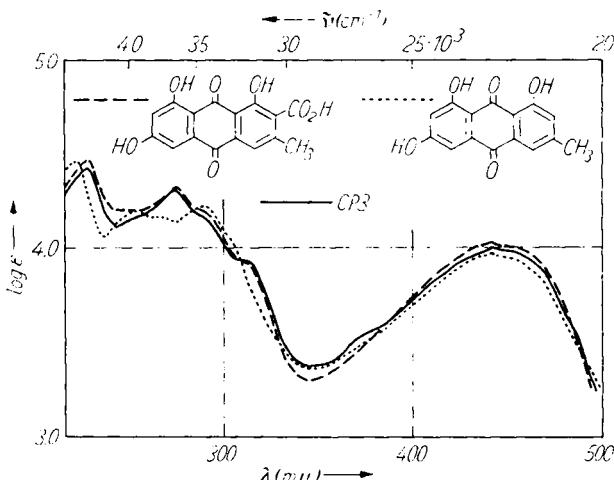


Abbildung 3. UV-Spektren des gelb-roten Mutterkorn-Farbstoffes CP3 (—) sowie von Endocrocin²⁴⁾ (---) und Emodin (····) in Methanol

²⁰⁾ Laufstrecke des Farbstoffes dividiert durch die der Chrysergonsäure.

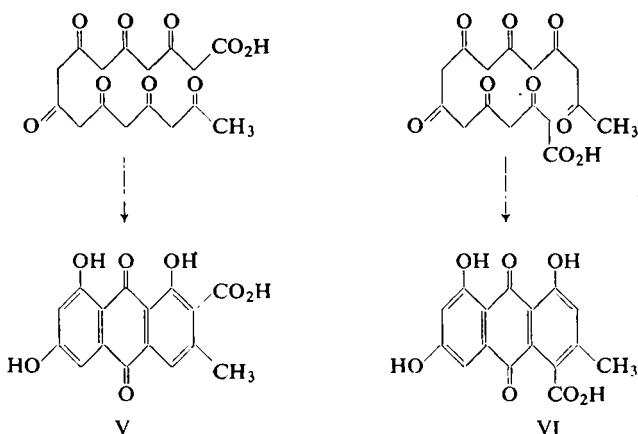
²¹⁾ Chem. Ber. 86, 432 [1953].

(4:4:1:6) auf $p_{\text{H}} 6$ -Citratpuffer-Papier, worin CP 2 und CP 3 langsamer als Chrysergonsäure wanderten und die R_S -Werte²⁰⁾ 0.46 bzw. 0.72 ergaben.

Der aus Chloroform in gelbroten Blättchen vom Schmp. 340° (Zers.; im vorerhitzten Berl-Block) kristallisierende Farbstoff CP 3 (Abbild. 1) hat nach Analysen sowie Molekulargewichtsbestimmung nach RAST in Campher die Summenformel $C_{16}H_{10}O_7$ und enthält, wie die KUHN-ROTH-Oxydation ergab, eine C-Methylgruppe. Methoxylgruppen sind nicht vorhanden. Löslichkeit in wässr. Natriumhydrogen-carbonat und eine IR-Bande bei 5.83 μ (1715/cm) (Abbild. 4) lassen eine freie Carboxylgruppe erkennen. Das UV-Spektrum weist auf ein Hydroxy-anthrachinon hin. Dementsprechend zeigte das mit Pyridin/Acetanhydrid dargestellte Acetat des Farbstoffes ein Anthrachinon-Spektrum (Abbild. 2), und die zur Bestimmung des Grundgerüstes nach dem Verfahren von H. BROCKMANN und G. BUDDE²¹⁾ durchgeführte reduzierende Acetylierung ergab ein Leukoacetat

Die neben Carboxylgruppe und Chinonsystem verbleibenden drei Sauerstoffatome konnten nunmehr Hydroxylgruppen am Anthrachinongerüst des Mutterkorn-Farbstoffes CP 3 zugeschrieben werden, und zwar in den Stellungen 1, 6 und 8, dem *Emodin* entsprechend, wie UV-spektroskopische Vergleiche mit Modellverbindungen zeigten (Abbildung. 3).

Im IR-Spektrum ließen Carbonylbanden bei 6.00 (1666/cm) und 6.19 μ (1615/cm) das Vorliegen einer durch *peri*-ständige Hydroxylgruppen chelierten und einer nicht chelierten Chinon-CO-Gruppe erkennen. Für die noch zu ermittelnde Stellung von Methyl- und Carboxylgruppe ließ die bei Konstitutionsermittlungen vielfach bewährte Acetat-Hypothese von A. J. BIRCH⁶⁾ nur zwei Möglichkeiten (V, VI) offen, die sich durch 2- bzw. 4-Stellung der Carboxylgruppe unterscheiden.



V ist das zuerst von Y. ASAHIWA und F. FUZIKAWA²²⁾ aus der Baumflechte *Nephromopsis endocrocea* und später von S. SHIBATA und S. NATORI²³⁾ aus *Aspergillus amstelodami* isolierte *Endocrocin*. Tatsächlich erwies sich der gelbrote Mutterkorn-Farbstoff CP 3 mit *Endocrocin*, das wir in diesem Stadium unserer Untersuchung für Vergleichszwecke erhielten²⁴⁾, nach IR-Spektrum (Abbildung 4), Misch-Schmp. und *R*_F-Wert als identisch²⁵⁾ (Tab. 2). Damit konnte erstmals die Struktur eines Mutterkorn-Farbstoffes festgestellt werden. Es ist bemerkenswert, daß *Endocrocin* erneut aus einem Pilz isoliert wurde und sich dadurch als ein typisches Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen erweist. Hiernach ist es unwahrscheinlich, daß der Farbstoff möglicherweise aus dem Stoffwechsel der als Wirt dienenden Roggenpflanze in die Sklerotien des *Claviceps purpurea* gelangt ist. Gegen eine solche Annahme spricht auch die Beobachtung, daß es „Leukostämme“ von *Claviceps purpurea* gibt, die auf der-

22) Ber. dtsch. chem. Ges. **68**, 1558 [1935].

23) Pharmac. Bull. Japan 1, 160 [1953]; C. A. 48, 7701 [1954].

24) Herrn Prof. Dr. SHOJI SHIBATA, Universität Tokio, danken wir herzlich für die Über-
sendung je einer Probe von *Endocrocin* und *Endocrocin-triacetat*.

25) Womit die in unserer ersten Mitteilung¹⁾ vorgeschlagene Bezeichnung *Clavoxanthin* für diesen Mutterkorn-Farbstoff entfällt.

selben Roggenpflanze, welche mit normalen *Claviceps*-Stämmen pigmentierte Sklerotien liefert, Mutterkorn bilden, das keine Farbstoffe enthält^{4,5)}.

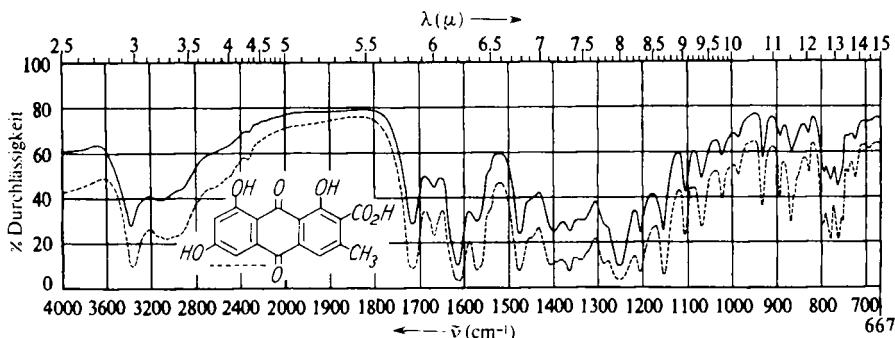


Abbildung. 4. IR-Spektren des gelbroten Mutterkorn-Farbstoffes CP 3 (—), sowie von Endocrocin²⁴⁾ (-----) in Kaliumbromid

Tab. 2. Eigenschaften des gelbroten Mutterkorn-Farbstoffes CP 3 und von Endocrocin aus *Nephromopsis endocrocea*

	Mutterkorn-Farbstoff CP 3	Endocrocin
Analyse	$C_{16}H_{10}O_7$	$C_{16}H_{10}O_7$
R_f -Wert mit tert.-Amylalkohol auf pH_7 -Phosphatpuffer-Papier	0.38	0.38
Schmp.	340° (Zers.)	340° (Zers.)
λ_{max}	441, 287, 274, 227 μm	441, 287, 274, 227 μm

Der rote, als *Clavorubin*¹⁾ bezeichnete Mutterkorn-Farbstoff CP 2 (Abbildung. 1) vom R_f -Wert²⁰⁾ 0.46 ist in noch geringerer Menge als Endocrocin im Mutterkorn enthalten. Durch mehrfaches Chromatographieren und Abscheiden aus heißem Methyläthylketon/Tetrachlorkohlenstoff gewannen wir 29 mg eines dunkelroten, reinen, aber nicht eindeutig kristallisierten Produktes. Obwohl der Farbstoff einen hohen Reinheitsgrad erkennen lässt, möchten wir eine Summenformel erst aufstellen, wenn uns aus einem weiteren Aufarbeitungsansatz größere Substanzmengen verfügbar sind. *Clavorubin* wird von gesätt. Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen. Seine IR-Bande bei 5.79 μ (1727/cm) zeigt daher eine freie Carboxylgruppe an. Kryoskopisch in Campher wurde das Molekulargewicht 328 ermittelt. Auf dieses bezogen, enthält *Clavorubin* nach dem Ergebnis der KUHN-ROTH-Oxydation eine C-Methylgruppe. Das UV-Spektrum des mit Acetanhydrid/Pyridin dargestellten Acetates entspricht dem des Anthrachinons (Abbildung. 2). Aus der UV-Absorption des *Clavorubins* selbst (s. Versuchsteil) und der Lage seiner Carbonylbanden bei 6.10, 6.16 und 6.25 μ (1639, 1623 und 1600/cm) kann deshalb angenommen werden, daß sich dieser Mutterkorn-Farbstoff von einer *1.4.5-Trihydroxy-anthrachinon-carbonsäure* herleitet.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und den FARBENFABRIKEN BAYER AG., Werk Elberfeld, danken wir für großzügige Förderung unserer Untersuchungen. Besonderen Dank schulden wir auch der Dr. SCHWARZ ARZNEIMITTELFABRIK GMBH., Monheim bei Düsseldorf, die uns mit wertvollem Drogenmaterial versorgte.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Isolierung des Rohfarbstoffgemisches

a) *Vorextrahiertes Mutterkorn*: 2.5 kg dunkelviolette, mit einer Hafermühle grob zerkleinerte Sklerotien ungarischer Herkunft von *Claviceps purpurea*, aus denen Alkaloide und Fette mit hydrophoben Lösungsmitteln extrahiert worden waren, wurden in einem 10-l-Steinzeug-Perkolator mit 5 l Methanol, 20% Wasser enthaltend, übergossen. Nach 24 Stdn. ließ man den tiefrot gefärbten Extrakt abfließen, wiederholte die Extraktion noch zweimal in derselben Weise und dampfte die vereinigten Extrakte im Vakuumumlaufverdampfer bei 30° auf 750 ccm ein, wobei der wäßrigen Lösung wegen starker Schaumbildung etwas n-Octanol zugesetzt wurde. Zur Extraktion der sauren Farbstoffe stellte man die wäßrige Lösung mit verd. Salzsäure auf p_{H} 2 ein, wonach sich die rote Lösung unter Abscheidung einer braunen, harzigen Fällung braun färbte, schüttelte dreimal mit je 400 ccm Chloroform aus, wusch die vereinigten, kirschroten Extrakte mit 50 ccm gesätt. Natriumsulfatlösung neutral und dampfte bei 50° i. Vak. ein. 33 g rotes Öl (Cl). Aus der klaren, rotbraun gefärbten wäßr. Phase der Chloroformextraktion ließen sich mit Essigester nur sehr geringe Farbstoffmengen extrahieren. Neutralisieren der wäßr. Phase mit verd. KOH und Eindampfen i. Vak. bei 40° ergab einen dunkelbraunen, salzhaltigen Rückstand, aus dem sich durch 1 stdg. Kochen mit Äthanol keine Farbstoffanteile herauslösen ließen. Beim Versetzen des ölichen Rückstandes (Cl) mit 400 ccm Petroläther entstand ein feinkörniger, brauner Niederschlag, der abzentrifugiert und noch zweimal mit je 200 ccm Petroläther gewaschen wurde. 8.3 g hellbraunes, entfettetes Sediment, das nach dem Ergebnis papierchromatographischer Untersuchungen 90% des Gesamtfarbstoffes enthält. Der Destillationsrückstand der vereinigten Petrolätherlösungen (24 g hellrotes Öl) enthielt nur geringe Farbstoffmengen und wurde verworfen.

b) *Natives Mutterkorn*: 1 kg zerkleinerte Sklerotien von *Claviceps purpurea* wurden in einem kleinen Perkolator mit 2 l Petroläther versetzt. Nach 24 Stdn. ließ man den fetthaltigen Extrakt ab, wiederholte die Extraktion noch zweimal mit je 1 l Petroläther und dampfte die vereinigten Petrolätherauszüge ein: 106 g hellgelb gefärbter, aus Fetten bestehender Rückstand. Das entfettete Mutterkorn extrahierte man in gleicher Weise dreimal mit je 2 l 80-proz. Methanol, dampfte die vereinigten Methanolauszüge bei 30° i. Vak. auf 400 ccm ein und isolierte aus diesem wässrigen Rückstand, wie unter a) beschrieben, die sauren Farbstoffe. Der Chloroformextrakt lieferte beim Eindampfen i. Vak. 7.4 g eines braunen, festen Rückstandes. Er enthielt nur noch wenig Fette, die sich mit wenig Petroläther auswaschen ließen.

Papierchromatographie der Mutterkorn-Farbstoffe

a) *Methodik*: 5-proz. methanolische Lösungen eines Farbstoffgemisches wurden am Startkreis des Ringpapierchromatogrammbogens (25 cm Durchm., SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b) aufgetragen. Zur Pufferimprägnierung tränkte man die fertig zugeschnittenen Chromatogrammbögen mit der angegebenen Pufferlösung, preßte sie auf einer Glasplatte mit einer Gummiwalze ab und trocknete an der Luft. Zum Erkennen der Chromatogrammzonen reicht deren Eigenfarbe aus. Die vom Anthrachinon abgeleiteten Mutterkorn-Farbstoffe sind durch ihre intensive Fluoreszenz im UV-Licht besonders deutlich sichtbar.

b) *Lösungsmittelsysteme*: 1) Wassergesätt. n-Butanol auf Papier, das mit 0.5 m p_{H} 7-Phosphatpuffer imprägniert ist (Laufzeit 4 Stdn. bei 20°); 2) Wassergesätt. tert.-Amylalkohol auf Papier, das mit 0.5 m p_{H} 7-Phosphatpuffer imprägniert ist (Laufzeit 16 Stdn. bei 20°); 3) n-Butanol/Triäthylamin/Pyridin/Wasser (4:4:1:6) auf Papier, das mit p_{H} 6-Citratpufferlösung imprägniert und unmittelbar vor dem Chromatographieren mit der Unterphase des Lösungsmittelsystems besprührt wird (Laufzeit 4 Stdn. bei 20°).

c) *Untersuchung der Mutterkorn-Farbstoffe:* Mit den Lösungsmittelsystemen 1) und 2) trennen sich die aus nativem und vorextrahiertem Mutterkorn isolierten Rohfarbstoffgemische gleichermaßen in eine rote (R_F 0.17) und eine gelbrote (R_F 0.38) Zone auf, wobei Lösungsmittelsystem 2) schärfere Zonen ergibt. Die als Bezugssubstanz verwendete gelbe *Chrysergonsäure*¹⁸⁾ aus Mutterkorn blieb mit beiden Lösungsmittelsystemen am Startkreis haften. Mit Lösungsmittelsystem 3), das für diesen Zweck entwickelt wurde, lief sie schneller als die beiden neuen Mutterkorn-Farbstoffe CP2 und CP3 (Abbild. I), für welche sich die R_F -Werte²⁰⁾ 0.46 bzw. 0.72 ergaben. Außer im Ringpapierchromatogramm wurde das Rohfarbstoffgemisch an einer Testsäule (Abbild. I) aus Cellulosepulver mit Lösungsmittelsystem 1) untersucht. Das Säulenchromatogramm entsprach dem Papierchromatogramm. Jedoch zeigte sich oberhalb der roten Zone eine schmale zusätzliche Zone gleicher Farbe, und eine braune Begleitsubstanz, die im Ringpapierchromatogramm mit der Lösungsmittelfront läuft, bildete hier eine breite, braune Zone unterhalb der gelbroten aus.

Verteilungschromatographische Auf trennung des Rohfarbstoffgemisches: Auf 16 Cellulosepulversäulen (5.2 × 41 cm), die durch Einschlämmen von je 240 g Cellulosepulver (SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 123) mit der Unterphase des Lösungsmittelsystems 1), leichtes Andrücken und Verdrängen nicht aufgesogener Unterphase durch Nachwaschen mit Oberphase bereitet worden waren, gab man je 100 ccm einer Lösung von 54 g des aus Mutterkorn isolierten Rohfarbstoffgemisches in 1600 ccm Oberphase. Beim Entwickeln des Chromatogrammes mit der Oberphase bildeten sich innerhalb von 9 Stdn. die schon an Testsäulen beobachteten Zonen (Abbild. I) aus. Nach Zerlegen der Säulen suspendierte man die Abschnitte, welche die Farbstoffzonen enthielten, in Methanol, saugte ab, wusch mit Methanol nach, dampfte die Filtrate ein, nahm den salzhaltigen Rückstand mit Chloroform auf, trocknete mit Na_2SO_4 , filtrierte den Chloroformauszug durch ein Blaubandfilter, dampfte wieder ein, wusch mit etwas Petroläther und trocknete den Rückstand i. Vak. über KOH.

Farbstoffausbeuten: Zone CP 1 (rot): 0.067 g; Zone CP 2 (rot): 0.8 g; Zone CP 3 (gelbrot): 2.5 g; Zone CP 4 (braun): 20.8 g.

Reindarstellung und Charakterisierung des gelbrot Farbstoffes CP 3: Eine Lösung des gelbrot Farbstoffes CP 3 (2.5 g) in 100 ccm Chloroform wurde auf eine Säule (4.5 × 60 cm) von 700 g säureaktiviertem Kieselgel gegossen (GEBR. HERRMANN, Sorte Em, in konz. Salzsäure suspendiert, abgesogen, bis zur neutralen Reaktion mit Wasser dekantiert, in *n* HCl suspendiert, wieder abgesogen, bei 120° getrocknet und durch Zusatz von 5 Gew.-% Wasser partiell desaktiviert). Beim Eluieren mit Chloroform, das zunehmend bis zu 25% Aceton enthielt, wurde eine orangegelbe Zone von braunen Verunreinigungen abgetrennt, die am Säulenkopf zurückblieben. Eindampfen des mit Na_2SO_4 getrockneten und durch ein Blaubandfilter filtrierten Eluates ergab 1.46 g gelbrote Farbstoff. Zur weiteren Reinigung extrahierte man eine Lösung dieses Farbstoffes in 500 ccm Chloroform dreimal mit je 50 ccm gesätt. Natriumhydrogencarbonat, wusch die vereinigten Auszüge dreimal mit je 200 ccm reinem Chloroform aus, säuerte mit verd. Salzsäure auf $p\text{H}$ 2 an, wobei der Farbstoff ausfiel, schüttelte dreimal mit je 200 ccm Chloroform aus, trocknete die Chloroformauszüge und dampfte ein. 0.483 g hydrogencarbonatlöslicher Farbstoff (A). Eindampfen der ersten, mit Natriumhydrogencarbonat extrahierten Chloroformlösung ergab 0.935 g eines braunen Rückstandes (B), der bei einem erneuten Verteilungsversuch nicht von wäsr. Natriumhydrogencarbonat aufgenommen wurde und ein uncharakteristisches, von (A) völlig verschiedenes UV-Spektrum zeigte. Mehrfaches Umkristallisieren von (A) aus Methyläthylketon/Tetrachlorkohlenstoff (2:1) und aus Chloroform ergab 65 mg gelbrote Blättchen vom Schmp. 340° (Zers., vorerhitzter BERL-Block). Leicht löslich in Methanol, Aceton und Essigester, sehr wenig löslich in Tetrachlorkohlenstoff und Cyclohexan. Farbreaktion mit konz. Schwefel-

säure kirschrot, mit methanol. Eisen(III)-chlorid rotbraun. Nach 2 Stdn. langem Kochen mit 5 n HCl bzw. n NaOH waren im Papierchromatogramm (Lösungsmittelsystem 2) keine qualitativen Veränderungen der Zone zu erkennen. R_f -Wert²⁰⁾ 0.72; IR-Banden (KBr): ν_{OH} 2.95, 3.23; $\nu_{C=O}$ 5.82, 6.00, 6.19 μ (Abbild. 4). UV-Absorption (Methanol): 442 (ϵ 9850), 311 (ϵ 8750), 287 (ϵ 16400), 274 (ϵ 20100), 227 (ϵ 26700) $\mu\mu$.

$C_{16}H_{10}O_7$ (314.2) Ber. C 61.25 H 3.21 1 C-CH₃ 4.79 Gef. C 60.59 H 3.71 C-CH₃ 5.6

Misch-Schmp. mit *Endocrocin*²⁴⁾: 340° (s. auch Tab. 2 und Abbild. 4).

Molekulargewichtsbestimmung: Gef. in Campher nach RAST Mol.-Gew. 309. Chrysazin (240.2), Gef. 237; Emodin (270.2), Gef. 217, 278.

Acetylierung des Mutterkorn-Farbstoffes CP 3: Eine Lösung von 443 mg des gelbroten Rohfarbstoffes CP₃ in einer Mischung aus 10 ccm Pyridin und 5 ccm essigsäurefreiem Acetanhydrid wurde 16 Stdn. auf 20° gehalten, bei 35° i. Vak. auf 2 ccm eingedampft, in 50 ccm Eiswasser gegossen, der hellgelbe Niederschlag nach Hydrolyse des überschüssigen Acetanhydrids abgesogen, mit Wasser gewaschen und i. Vak. über KOH getrocknet (189 mg). Anschließend gab man das Acetat, in 40 ccm Chloroform gelöst, auf eine Säule (4 × 20 cm) von 200 g Kieselgel (s. o.), das durch Zusatz von 10 Gew.-% Wasser partiell deaktiviert worden war, eluierte mit Chloroform/Aceton (9:1) eine hellgelbe Hauptzone (182 mg) und kristallisierte viermal aus heißem Benzol/Cyclohexan (3:2) um. 82.5 mg hellgelbes Acetat, Zers. gegen 199°. UV-Spektrum s. Abbild. 2. IR-Banden (KBr): 2.92, 3.44, 5.64, 5.87, 6.20, 6.84, 6.99, 7.31, 7.68, 7.92, 8.39, 9.24, 9.62, 9.82, 10.14, 10.45, 11.12, 11.93 μ . Übereinstimmung der in konz. Schwefelsäure gemessenen Absorptionsbanden von CP 3 und seinem Acetat bei 536 und 503 $\mu\mu$ zeigt an, daß bei der Acetylierung keine tiefergehende Umwandlung eingetreten ist.

Reduzierende Acetylierung des Mutterkorn-Farbstoffes CP 3: 3.4 mg krist. Farbstoff CP 3, 23 mg Zinkstaub (beides 3 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet) und 3 mg wasserfreies Natriumacetat wurden in 2.5 ccm essigsäurefreiem Acetanhydrid 25 Min. unter Rückfluß gekocht. Die von Orange nach Hellgelb umgeschlagene Lösung saugte man vom überschüssigen Zinkstaub ab, wusch mit 2 ccm Acetanhydrid nach, dampfte bei 60° i. Vak. ein, nahm den Rückstand mit 10 ccm trockenem, säurefreiem Chloroform auf und dampfte ein. Die farblose, blau fluoreszierende Chloroformlösung des i. Vak. getrockneten Rückstandes zeigte ein Anthracenspektrum (λ_{max} 399, 379, 363, 339 und 265 $\mu\mu$).

Reindarstellung und Charakterisierung des roten Clavorubins (CP 2): Eine Lösung von 800 mg Rohclavorubin in 100 ccm Chloroform wurde auf eine Säule (4 × 40 cm) von 400 g säureaktiviertem Kieselgel (s. o.) gegossen, dessen Aktivität durch Zusatz von 5 Gew.-% Wasser vermindert worden war. Beim Eluieren mit Chloroform, bis zu 10% Aceton enthaltend, löste sich vom Säulenkopf neben einer schmalen, vorauslaufenden violetten eine langsamere, breite, rote Zone ab, die durch Zerlegen der Säule abgetrennt, mit Methanol extrahiert wurde und nach Eindampfen der filtrierten Lösung 249 mg Rohclavorubin ergab. Zahlreiche Kristallisierungsversuche führten beim Clavorubin nicht zu einem eindeutig kristallisierten Produkt. Am besten eignete sich mehrfaches Abscheiden aus heißem Methyläthylketon/Tetrachlorkohlenstoff (2:1), was schließlich 29 mg eines sehr reinen, feinkörnigen, dunkelroten Pulvers ergab, das sich gegen 232° unter Gasentwicklung zersetzt. Leicht löslich in Methanol, Aceton und Essigester, sehr wenig löslich in Benzol, Cyclohexan und Tetrachlorkohlenstoff. In wäßr. Natriumhydrogencarbonat ist Clavorubin mit karminroter Farbe mäßig löslich. Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure violett, mit methanol. Eisen(III)-chloridlösung rotbraun. R_f -Wert 0.46. UV-Absorption (Methanol): 535, 503, 473, 264 $\mu\mu$.

IR-Banden (KBr): 2.95, 3.45, 5.78, 6.10, 6.16, 6.25, 6.95, 7.37, 7.96, 8.49, 8.94, 9.26, 9.47, 9.79, 10.94, 11.22, 12.77 μ .

Gef. C-CH₃ 4.7; Mol.-Gew. (nach RAST in Campher) 328

Acetylierung des Clavorubins: Eine Lösung von 225 mg Rohclavorubin in einer Mischung aus 8 ccm Pyridin und 4 ccm Acetanhydrid wurde 16 Stdn. bei 20° gehalten, darauf in 100 ccm Eiswasser gegossen, der gelbe Niederschlag abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet. Zur Reinigung nahm man in Chloroform auf, gab die Lösung auf eine Säule (2 \times 70 cm) von 100 g Kieselgel (s. o.), das durch Zusatz von 10 Gew.-% Wasser desaktiviert war, eluierte eine hellgelbe Hauptzone mit Chloroform + 10% Aceton, dampfte das Eluat i. Vak. ein, schied den Rückstand dreimal nacheinander aus einer Lösung in heißem Benzol/Cyclohexan (3:2) ab und erhielt so das Acetat als hellgelbes, feinkörniges Pulver, das sich gegen 165° unter Gasentwicklung zersetzt. UV-Spektrum s. Abbild. 2. IR-Banden (KBr): 2.91, 3.43, 5.65, 5.89, 6.21, 6.36, 6.84, 6.99, 7.31, 7.68, 7.93, 8.11, 8.40, 9.25, 9.74, 11.26, 11.95, 13.32 μ . Die in konz. Schwefelsäure gemessenen Absorptionsbanden (580, 534 und 492 m μ) von Clavorubin und seinem Acetat stimmen überein und zeigen an, daß bei der Acetylierung keine Änderung des chromophoren Systems eingetreten ist.

—

GEORG JAYME und WERNER DEMMIG

Über eine Synthese von kristallisierter Cellobiuronsäure

Aus dem Institut für Cellulosechemie mit Holzforschungsstelle der Technischen Hochschule
Darmstadt

(Eingegangen am 1. Oktober 1959)

Benzyl- β -cellobiosid wird katalytisch zum Benzyl- β -cellobiuronid oxydiert. Der daraus durch hydrierende Spaltung gewonnenen kristallisierten Cellobiuronsäure kommt die Konstitution einer 4-[β -D-Glucuronosido]-D-glucose zu.

Im Rahmen von chemoimmunologischen Untersuchungen fanden HEIDELBERGER und GOEBEL¹⁾, daß das Kapselpolysaccharid von *Pneumococcus Type III* und *VIII* aus 4-[β -D-Glucuronosido]-D-glucose-(Cellobiuronsäure)-Einheiten aufgebaut ist, ohne daß es ihnen gelang, die freie, kristallisierte Cellobiuronsäure zu gewinnen.

Wir haben nunmehr durch katalytische Oxydation von Benzyl- β -cellobiosid mit Sauerstoff und nachfolgende hydrierende Spaltung des bei der Oxydation gewonnenen Benzyl- β -cellobiuronids die Cellobiuronsäure in kristallisierter Form dargestellt.

Die Darstellung des Ausgangsmaterials erfolgte mit einigen Verbesserungen auf dem Wege: Cellobioseoctaacetat²⁾—Acetobromcellobiose³⁾—Heptaacetyl-benzyl-

¹⁾ M. HEIDELBERGER und W. F. GOEBEL, J. biol. Chemistry 74, 613 [1927]; W. F. GOEBEL, ebenda 110, 391 [1935].

²⁾ K. FREUDENBERG, Ber. dtsch. chem. Ges. 54, 767 [1921].

³⁾ E. FISCHER und G. ZEMPLÉN, Ber. dtsch. chem. Ges. 43, 2536 [1910].