

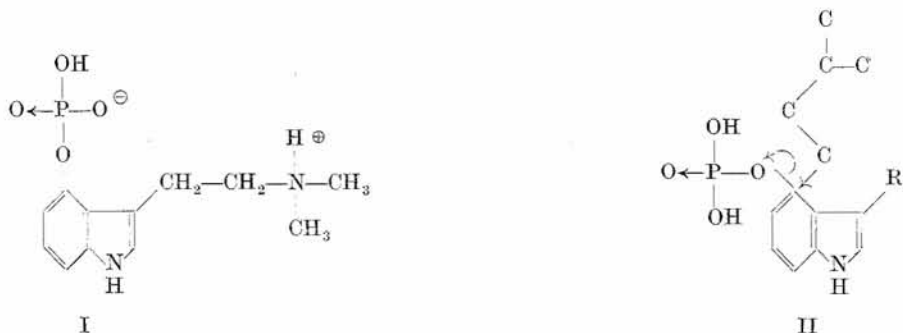
1977. A. Brack, A. Hofmann, F. Kalberer, H. Kobel und J. Rutschmann

Tryptophan als biogenetische Vorstufe des Psilocybins

Aus dem Pharm.-chem. Labor. der Firma Sandoz, Basel*)

(Eingegangen am 12. November 1960)

Es ist in den letzten Jahren durch eine Reihe von Untersuchungen gezeigt worden, daß einerseits das in verschiedenen tierischen Geweben, aber auch in Pflanzen vorkommende 5-Hydroxy-tryptamin oder Serotonin¹⁾ und andererseits das den Mutterkornalkaloiden zugrundeliegende Ergolin-Ringsystem²⁾ ³⁾ ⁴⁾ sich biogenetisch vom Tryptophan ableiten. Es schien uns nun von Interesse, zu prüfen, ob auch der Wirkstoff der mexikanischen Rauschpilze aus der Gattung *Psilocybe*, das 4-Hydroxy-indol-Derivat Psilocybin (I), welches in unseren Laboratorien isoliert, aufgeklärt und synthetisiert worden ist⁵⁾, aus Tryptophan gebildet wird.



Das wesentliche und einzigartige Strukturelement des Psilocybins ist die gegenüber dem Serotonin aus der 5- in die 4-Stellung des Indolkernes verschobene und phosphorylierte Hydroxylgruppe, die somit an derselben Stelle steht, an der bei der Biogenese des Ergolin-Gerüsts die in ihrem Mechanismus vorläufig noch vollständig ungeklärte C-C-Kondensation zwischen Tryptophan und einer isoprenoiden Einheit eintreten muß⁶⁾. Die Auffindung des Psilocybins hat uns seinerzeit sofort

*) Herrn Prof. Dr. K. Mothes zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ S. Udenfriend et al., J. biol. Chemistry 219, 335 (1956); 224, 803 (1957); vgl. auch R. M. Donaldson, S. G. Gray, Arch. int. Méd. 104, 330 (1959).²⁾ D. Gröger, H. J. Wendt, K. Mothes, F. Weygand, Z. Naturforsch. 14 B, 355 (1959).³⁾ H. Plöninger, R. Fischer, W. Lwowski, A. Brack, H. Kobel und A. Hofmann, Angew. Chem. 71, 383 (1959).⁴⁾ W. A. Taber, L. C. Vining, Chem. & Ind. (1959), 1218.⁵⁾ A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, Th. Petrzilka und F. Troxler, Helv. chim. Acta 42, 1558 (1959).⁶⁾ D. Gröger, K. Mothes, H. Simon, G. Floß und F. Weygand, Z. Naturforschung 15 B, 141 (1960).

zur Spekulation verführt, daß eine ähnliche 4-Hydroxy-Verbindung, besonders in der Form eines Phosphats oder Pyrophosphats, an diesem wesentlichen Schritt der Ergolin-Biosynthese beteiligt sein könnte, wobei der Hydroxy-indol-phosphorsäure-ester mit Isopentenyl-pyrophosphat bzw. Dimethyl-allylpyrophosphat^{7) 8)} in einer „Schwanz-an-Schwanz“-Kondensation zusammentreten müßten (II), wie z. B. 2 Molekeln Farnesyl-pyrophosphat bei der Bildung des Squalens^{8) 9) *)}.

Hätte es sich gezeigt, daß die 4-Hydroxygruppe des Psilocybins schon vor der Bildung des Tryptophansystems eingeführt wird, daß also das unsubstituierte Tryptophan nicht auf dem Synthesenweg unserer Verbindung liegt, hätten derartige Spekulationen nicht viel Sinn. In der vorliegenden Arbeit wird nun aber bewiesen, daß das Tryptophan eine biogenetische Vorstufe des Psilocybins darstellt, d. h. daß ein Pilz zur 4-Hydroxylierung des Tryptophans (oder, unwahrscheinlicher Weise, eines Metaboliten davon) befähigt ist. Es muß also in Zukunft bei Versuchen zur Abklärung der Biosynthese der Ergolinalkaloide durch den Mutterkornpilz an die angedeutete Möglichkeit gedacht werden.

Experimentelles

Züchtung des Pilzes: Der Pilz *Psilocybe semperiva* Heim et Cailleux, Stamm Nr. 16¹⁰⁾ wurde in Gegenwart von D,L-Tryptophan-[β -¹⁴C] als ruhende Oberflächenkultur in 1,6 L Fernbachkolben, welche je 500 ml Nährlösung enthielten, bei 24° gezüchtet. Pro Versuch wurden 4 Kolben angesetzt. Die Nährlösung, die 25 Minuten bei 120° sterilisiert wurde, hatte folgende Zusammensetzung:

Bierwürze (18% Trockensubstanz)	250 g
Cornsteep-Solids	10 g
NH ₄ OH 25%	1,2 g
Agar	2 g
Leitungswasser	ad 1 l
pH	4,5

Das radioaktive Tryptophan wurde dem Nährmedium nach der Sterilisation in sterilfiltrierter, wäßriger Lösung zugesetzt und der Ansatz darauf nach dem früher beschriebenen Verfahren¹¹⁾ beimpft. Das Mycel wurde nach 60 Tagen durch Abnutschen und Waschen mit Wasser geerntet und bei 30–35° getrocknet.

*) Hier finden sich auch hypothetische Betrachtungen zur Erklärung solcher mechanistisch noch schwer verständlicher Reaktionen.

⁷⁾ S. Chaykin, I. Law, A. H. Phillips, T. T. Tchen, K. Bloch, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 998 (1958).

⁸⁾ F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, I. Kessel, Angew. Chem. 70, 738 (1958).

⁹⁾ De W. S. Goodman und G. Popják, J. Lipid Res. 1, 286 (1960).

¹⁰⁾ R. Heim und R. Cailleux, Rev. Mycologie 23, 352 (1958).

¹¹⁾ R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Hofmann und R. Cailleux, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. 246, 1346 (1958).

Tabelle 1
Extraktion des Psilocybins

	Menge g	ipm	%
Tryptophan (1,32 mg radioaktives D,L- und 1,00 g inaktives L-)	1,00	$104,2 \cdot 10^6$	100
Trockenmycel	36,9	$63,8 \cdot 10^6$	61,2
Kulturfiltrat		$29,9 \cdot 10^6$	28,7
als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet (aus Differenz)		$10,5 \cdot 10^6$	10,1
Mycel zur Extraktion	35,0	$60,5 \cdot 10^6$	100
Methanolextrakt	2,9	$10,95 \cdot 10^6$	18,1
Mycelrückstand	30,8	$47,6 \cdot 10^6$	78,6
Petrolätherextrakt	0,62	$1,40 \cdot 10^6$	2,3
Psilocybin rein, aus Methanol	0,135	$4,18 \cdot 10^6$	6,9

Isolierung des Psilocybins: Das getrocknete und feinst pulverisierte Mycel (pro Versuch ca. 30 g aus 2 l Kulturlösung) wurde 4mal mit 250–400 ml Methanol extrahiert. Die eingeeengten Extrakte wurden durch Ausschütteln mit Petroläther entfettet, weiter eingeeengt und das Konzentrat an 10–20 g Cellulosepulver aufgezogen. Dann chromatographierte man an einer Säule von Whatman-Cellulosepulver (10fache Menge des Trockenmycels) mit wassergesättigtem n-Butanol als Lösungsmittel, wobei Fraktionen von 50 ml aufgefangen wurden. Sämtliche Fraktionen mit positiver Keller-Reaktion wurden vereinigt, eingedampft und der Rückstand aus wenig Wasser zur Kristallisation angesetzt. Das Psilocybin-Rohkristallisat wurde dann aus Methanol umgelöst, wonach es sich als radiochemisch rein erwies (konstante spezifische Aktivität eines mit inaktivem, reinstem Material verdünnten Präparates beim wiederholten Umkristallisieren). Ein typischer Arbeitsgang (Versuch Ps II) ist in der Tabelle 1 zahlenmäßig dargestellt.

Die ^{14}C -Analysen wurden wie üblich durch nasse Verbrennung und Messung der Aktivität im Proportional-Gaszählrohr vorgenommen.

Ergebnisse

Die erhaltenen Resultate sind in Tab. 2 zusammengefaßt, wobei zum Vergleich die Ergebnisse eines analogen Versuches von *Mothes, Weygand* und Mitarb.²⁾ mit *Claviceps* beigelegt sind. Da von diesen Autoren wie von uns als markierte Verbindung racemisches Tryptophan verwendet wurde, erhebt sich die Frage, ob nur die natürliche L-Komponente für die Biosynthese der Alkaloide verwendet wird, oder ob auch der D-Antipode ausgenutzt werden kann. Wir haben in der Tab. 2 beide Fälle (a und b) berechnet. Wie *Taber & Vining*⁴⁾ gezeigt haben, dürfte im Falle von *Claviceps* wenigstens ein Teil des vorhandenen D-Tryptophans durch Racemisierung für die Biosynthese der Alkaloide aktiviert werden. Die Tatsache, daß in unseren Versuchen das gewaschene Mycel wesentlich mehr als 50% der als D,L-Tryptophan zugesetzten Radioaktivität enthielt, deutet darauf hin, daß auch bei uns eine teilweise Verwertung der D-Form stattfindet. Die tatsächlichen Einbauraten und Verdünnungsfaktoren*) dürften somit zwischen den beiden jeweils an-

*) Wir ziehen den Ausdruck „biologischer Verdünnungsfaktor“, definiert als das Verhältnis molare spez. Akt. des Vorläufers, dem Begriff „spezifische Einbaurate“¹⁶⁾ als anschaulicher vor. molare spez. Akt. des Metaboliten

gegebenen Extremwerten liegen. Eine eindeutige Klärung dieser Frage müßte durch quantitative Bestimmung des in der Kulturlösung noch vorhandenen, unverbrauchten D-Tryptophans durch Verdünnungsanalyse möglich sein.

Tabelle 2

Einbau von ^{14}C -Tryptophan in Indolalkaloide

	Versuch Ps I		Versuch Ps II*)		Ergot S 2**)	
	a	b	a	b	a	b
Tryptophan total mg***	1,24		1000		2,48	
L-Tryptophan mg		0,62		1000		1,24
spez. Akt. $\mu\text{c}/\text{mMol}$	$7,64 \cdot 10^3$	$7,64 \cdot 10^3$	10,07	5,03	$4,67 \cdot 10^3$	$4,67 \cdot 10^3$
spez. Akt. $\mu\text{c}/\text{mg}$	37,4	37,4	$49,3 \cdot 10^{-3}$	$24,6 \cdot 10^{-3}$	22,8	22,8
Aktivität zugesetzt μc	46,4	23,2	49,3	24,6	56,7	28,3
Alkaloid isoliert mg	25****)	25	140****)	140	60	60
spez. Akt. $\mu\text{c}/\text{mMol}$	7,78	7,78	4,85	4,85	25,6	25,6
spez. Akt. $\mu\text{c}/\text{mg}$	0,0223	0,0223	0,0139	0,0139	0,1	0,1
Aktivität isoliert μc	0,558	0,558	1,95	1,95	6,0	6,0
Einbaurrate %	1,20	2,40	3,98	7,97	10,6	21,2
Verdünnungsfaktor	982	982	2,07	1,04	182	182

*) Im Versuch Ps II wurden der Kultur 1,32 mg ^{14}C -D,L-Tryptophan ($7,64 \text{ mc}/\text{mM}$) und 1,0 g inaktives L-Tryptophan zugesetzt.

**) Nach Mothes, Weygand und Mitarb. Z. für Naturforschung 14b, 357 (1959).

***)) Ohne Rücksicht auf optische Isomerie.

****) Diese Werte sind gegenüber den tatsächlich rein isolierten Mengen an Alkaloid um wenige % aufgerundet, um das in den Mutterlaugen verlorene Material einigermaßen zu berücksichtigen. Die Berechnungen basieren auf der Psilocybin-Formel $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}_2\text{P} \cdot 2 \text{CH}_3\text{OH}$ ($M = 348,3$).

Die Werte der Kolonnen a basieren auf der Annahme, daß D- und L-Tryptophan gleichermaßen metabolisiert werden, die Kolonnen b berücksichtigen nur das L-Tryptophan als Ausgangsmaterial der Biosynthese.

In einem ersten Versuch (Ps I) haben wir der Kulturlösung 1,24 mg hochaktives ^{14}C -Tryptophan zugesetzt. Das isolierte Psilocybin zeigte eine deutliche Radioaktivität, die auf eine Einbaurrate von 1,2–2,4% schließen ließ. Jedoch war die spezifische Aktivität des Produktes sehr gering, so daß wir (immer unter der Voraussetzung, daß die Psilocybinbildung aus dem Tryptophan erfolgt) eine außerordentlich starke Verdünnung des zugesetzten radioaktiven Ausgangsmaterials durch endogenes Tryptophan annehmen mußten. Auf Grund der Annahme, daß der Pilz während der langen Inkubationszeit eine Menge von 500–1000 mg Tryptophan synthetisiert und umsetzt, bzw. in sein Protein einbaut, haben wir deshalb in einem zweiten Versuch zusätzlich zum radioaktiven D,L-Tryptophan der Kultur noch 1,0 g inaktives L-Tryptophan beigelegt. Tatsächlich ergab sich, daß dadurch die Biosynthese der Aminosäure durch den Pilz weitgehend zurückgedrängt wurde

(„negative feedback“⁴⁾ ¹²⁾, und daß das isolierte Psilocybin fast die gleiche spezifische Aktivität aufwies, wie das verdünnte Ausgangsmaterial (Versuch Ps II). Wenn ausschließlich die L-Form verwertet worden war, berechnet sich ein Verdünnungsfaktor von nur 1,04, während bei vollständiger Verwertung auch des D-Tryptophans der entsprechende Wert 2,07 beträgt. Die Einbaurate war gegenüber dem ersten Versuch wegen der höheren Psilocybin-Ausbeute auf das dreifache angestiegen. Diese Ausbeutesteigerung darf jedoch nicht auf den Tryptophanzusatz zurückgeführt werden, denn wir haben in Kontrollversuchen festgestellt, daß unabhängig vom Tryptophanzusatz große, unkontrollierbare Schwankungen der Ausbeute von Ansatz zu Ansatz vorkommen.

Auf Grund dieser Resultate erscheint die Rolle des Tryptophans als Ausgangsmaterial für die Biosynthese des Psilocybins gesichert. In welcher Reihenfolge die notwendigen Reaktionsschritte, 4-Hydroxylierung, Decarboxylierung, N-Methylierung und O-Phosphorylierung erfolgen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Auf Grund des Befundes, daß die Biogenese des Serotonins über das 5-Hydroxytryptophan und nicht durch Hydroxylierung von Tryptamin erfolgt¹³⁾ würden wir allerdings annehmen, daß auch in unserem Falle die erste Reaktion in einem Angriff auf das Tryptophan durch eine für die 4-Stellung des Indolringsystems spezifische Hydroxylase besteht. Die eingangs angedeutete Idee, daß das 4-Hydroxytryptophan, oder ein O-phosphoryliertes Derivat davon, in Kulturen von *Claviceps* als Vorläufer des Ergolinsystems dienen könnte, ist ebenfalls der experimentellen Nachprüfung wert.

Wir danken Herrn *H. Tschertter* für die Isolierung des Psilocybins und Fr. *H. Gisi* und Herrn *K. Rüedi* für technische Mitarbeit bei der Züchtung der Pilze.

¹²⁾ *H. S. Moyed und M. Friedman*, *Science* 129, 968 (1959).

¹³⁾ *S. Udenfriend, C. R. Creveling, H. Posner, B. G. Redfield, J. Daly und B. Witkop*, *Arch. Biochem. Biophysics* 83, 501 (1959).

Anschrift: Dr. A. Hofmann, Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium der Fa. Sandoz, Basel.

1978. K. E. Schulte, J. Reisch und O. Heine *)

Zur Kenntnis der Acetylen-carbonsäuren

14. Mitt.: α -Pyrone aus 3-Hydroxy-alkin-4-säureestern

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Münster (Westf.)

(Eingegangen am 20. November 1960)

Die Umsetzung von α -Acetylen-Ketonen (I) mit α -Brom-fettsäureestern (II) nach *Reformatzki* ergibt in 50–60proz. Ausbeute 3-Hydroxy-alkin-(4)-säureester (III), wenn in dem ungesättigten Keton I R_1 und R_2 aliphatische oder aromatische Reste

*) Teil der Dissertation *O. Heine*, FU Berlin 1959.