

211. Die Alkaloide eines Mutterkornpilzes von *Pennisetum typhoideum* Rich. und deren Bildung in saprophytischer Kultur.

36. Mitteilung über Mutterkornalkaloide¹⁾

von A. Stoll, A. Brack, H. Kobel, A. Hofmann und R. Brunner.

(27. VIII. 54.)

Neben dem bekannten, auf Roggen parasitierenden Mutterkornpilz, *Claviceps purpurea*, ist eine Anzahl von Mutterkornarten bekannt, die auf anderen Gräsern wachsen. Zum Teil befallen sie mehrere verschiedene Wirtspflanzen; zum Teil ist ihr Vorkommen streng spezifisch auf eine Grasart beschränkt. Die Alkaloide, die in den Sklerotien solcher Gras bewohnender Stämme gebildet werden, unterscheiden sich oft von den Alkaloiden des Roggen-Mutterkorns. In neuerer Zeit haben Abe und Mitarbeiter^{2) 3)} Gras-Mutterkorn untersucht, das auf *Agropyrum semicostatum* Nees bzw. auf *Elymus mollis* Tri. in Japan gefunden wurde. Daraus konnten sie zwei neue Alkaloide, das Agroclavin²⁾ und das Elymoclavin³⁾, isolieren.

Durch Vermittlung von Dr. J. Renz erhielten wir aus Afrika Sklerotien, die auf der tropischen Kolbenhirse *Pennisetum typhoideum* Rich. gefunden worden waren⁴⁾. Es handelt sich um Sklerotien eines Pilzes, der ähnlich wie der Mutterkornpilz auf Roggen die Blüten der Kolbenhirse befällt und anstelle des Fruchtknotens zu dunklen Körnern auswächst (siehe Fig. 1 und 2). Da es bisher nicht

¹⁾ 35. Mitteilung, Helv. **37**, 1725 (1954).

²⁾ M. Abe, Ann. Rep. Takeda Res. Lab. **10**, 73 (1951).

³⁾ M. Abe, T. Yamano, Y. Kozu & M. Kusumoto, J. Agric. Chem. Soc. Japan **25**, 458 (1952).

⁴⁾ Herr Dr. J. Renz schreibt uns hiezu: „Die kleinen Sklerotien wurden von Herrn Dr. A. Saccas auf *Pennisetum typhoideum* (petit mil à chandelle) im Tschad-Gebiet gefunden. Herr Dr. Saccas überliess mir anlässlich eines Besuches im Januar 1953 auf der Station Centrale de Boukoko in Oubangui-Chari eine Probe dieser Sklerotien für eine chemische Prüfung auf Alkaloide. Die Menge (ca. 0,5 g) reichte jedoch für eine präparative Untersuchung nicht aus; es war mir aber möglich, durch liebenswürdige Vermittlung von Herrn G. Didot, Directeur de la Station Centrale de Boukoko, und unter Mithilfe der Inspection Générale de l'Agriculture in Brazzaville weiteres Drogenmaterial (enthaltend 17,7 g Sklerotien) direkt aus dem Tschad-Gebiet zu erhalten. Für diese Mitarbeit habe ich ganz besonders den folgenden Herren zu danken: Herrn P. Coleno, Inspecteur Général de l'Agriculture de l'A.E.F. in Brazzaville, Herrn F. Cloché, Ingénieur Principal de l'Agriculture de l'A.E.F., Protection des Végétaux in Brazzaville, Herrn E. Hibon, Ingénieur Principal des Services de l'Agriculture Outre-Mer, Territoire du Tschad, A.E.F., Herrn M. Niqueux, Chef de travaux du laboratoire de Génétique, Station Principale Agronomique du Ba-Jilli, Territoire du Tschad, A.E.F.“ Den Herren Dr. A. Saccas und G. Didot sei auch an dieser Stelle für die Überlassung des Drogenmaterials bestens gedankt.

gelingen ist, diese Sklerotien zum Keimen zu bringen, kann der Pilz vorderhand noch nicht eindeutig identifiziert werden. Auf Grund der Anatomie der Sklerotien und des einwandfrei nachgewiesenen Sphacelia-Stadiums, das der Sklerotienbildung vorangeht, gehört er mit grösster Wahrscheinlichkeit der Gattung *Claviceps* an. Das Vorkommen von *Claviceps* auf dieser Wirtspflanze wurde bereits 1906 von *Zimmermann*¹⁾ erwähnt. Ferner beschrieb *M. J. Thirumalachar*²⁾ 1945 einen Mutterkornpilz, den er auf einem nahe verwandten Grase, *Pennisetum alopecuroides* *Nees*, gefunden hatte, und den er als *Claviceps microcephala* bestimmte.

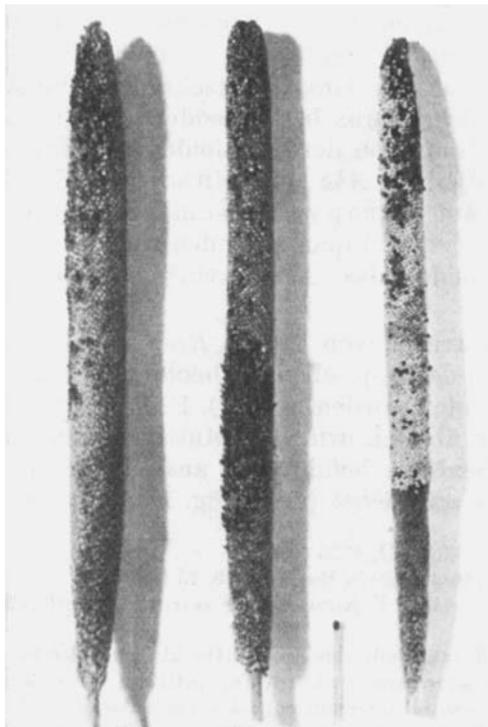


Fig. 1.

Mit Sklerotien befallene Kolben von *Pennisetum typhoideum* *Rich.* (1:4).

Es war für uns naheliegend, die auf *Pennisetum typhoideum* gewachsenen Sklerotien auf Alkaloide zu untersuchen. In der Tat konnten wir mit Hilfe der kolorimetrischen Gehaltsbestimmung nach *van Urk*³⁾ in verschiedenen Proben der afrikanischen Droge Mutter-

¹⁾ *A. Zimmermann*, Z. f. Pflanzenkrankheiten **16**, 99 (1906).

²⁾ *M. J. Thirumalachar*, Nature **156**, 754 (1945).

³⁾ *H. W. van Urk*, Pharm. Weekblad **66**, 473 (1929).

kornalkaloide in Mengen von 0,19 bis 0,43 % (bezogen auf ein Molekulargewicht von 250¹⁾) nachweisen.

Aus der grösseren uns zugegangenen Menge der Sklerotien (17,7 g) haben wir einen Teil zur Züchtung des Pilzstammes verwendet; der Rest (15 g) wurde zur präparativen Isolierung der Alkaloide aufgearbeitet. Wir erhielten bei der chromatographischen Aufteilung 24 mg eines kristallisierenden Alkaloids, das in allen Eigenschaften mit dem von *M. Abe*²⁾ beschriebenen Agroclavin übereinstimmte. Eine zweite Fraktion, die in kleinerer Menge vorhanden war, und die nicht kristallisierte, liess darauf schliessen, dass noch andere Alkaloide vorhanden sein müssen. Leider war die Menge der uns zur Verfügung stehenden Droge zu gering, um aus dieser Fraktion einheitliche Substanzen zu gewinnen.



Fig. 2.

Einzelne Ährchen mit Sklerotien (2:1).

Dagegen verliefen Versuche, den afrikanischen Mutterkornstamm *in vitro* zu züchten, in der Hoffnung, dass er auch in saprophytischer Kultur namhafte Mengen Alkaloide bilde, erfolgreich.

¹⁾ Diese Bezugsgrösse von 250 wählten wir in Abweichung von der sonst bei den Mutterkornalkaloiden üblichen Berechnung (mittleres Mol.-Gew. 600), weil unsere Kulturen niedrigmolekulare Alkaloide, zur Hauptsache Agroclavin und Elymoclavin, enthalten, deren mittleres Mol.-Gew. ca. 250 beträgt.

²⁾ *M. Abe*, l. c.

*M. Abe*¹⁾ beschrieb 1951 Versuche, in welchen er den auf *Agropyrum semicostatum* gefundenen *Claviceps*-Stamm auf einer Nährlösung mit Mannit als C-Quelle und Ammoniumsuccinat als N-Quelle kultivierte und dabei sowohl aus dem Mycel als auch aus dem Kulturfiltrat reines Agroclavin isolieren konnte. In einer weiteren Arbeit beschrieben *M. Abe et al.*²⁾ die Isolierung von Elymoclavin neben andern, bekannten Mutterkornalkaloiden aus der saprophytischen Kultur eines *Claviceps*-Stammes, der aus Sklerotien von *Elymus mollis* gezüchtet worden war.

Nachdem wir in Sklerotien, die auf *Pennisetum* gewachsen waren, Agroclavin nachgewiesen hatten, war es naheliegend, bei der Kultur unseres Stammes auf Nährlösungen sich vorerst an die Arbeiten von *Abe* anzulehnen. Es gelang uns, aus den kleinen Sklerotien mehrere reine Kulturen des Pilzes anzulegen, die auf den üblichen Nährböden wie Malzextrakt-Pepton oder Bierwürze bei 24° gut gediehen. Auf einer Mannit-Ammoniumsuccinat-Nährlösung von ähnlicher Zusammensetzung, wie sie *Abe* beschrieben hat, bildeten unsere Stämme ein kräftiges Mycel; sie waren also imstande, Mannit zu verwerten.

Es zeigte sich nun, dass unser Pilz sowohl in Standkultur, als auch in Schüttelkultur in allen Nährlösungen mehr oder weniger Alkaloide bildete. Bei den Standkulturen konnten nach einer Bebrütungszeit von 30 Tagen und mehr, bei den Schüttelkulturen nach 20 und mehr Tagen sowohl im Kulturfiltrat, als auch im Pilzmycel mit Hilfe der *van Urk*'schen Farbreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd Alkaloide nachgewiesen und präparativ isoliert werden. In einer Bierwürzekultur wurde beispielsweise mit den besten Stämmen nach 36tägiger Bebrütung im Kulturfiltrat ein Alkaloidgehalt von 8 bis 10 mg/l (bezogen auf ein Mol.-Gew. 250) gefunden. Auf der Mannit-Ammoniumsuccinat-Nährlösung erreichten die Alkaloidausbeuten bedeutend höhere Werte, in Einzelansätzen bis 170 mg/l (Mol.-Gew. = 250). Dabei trat ein Unterschied zwischen der Schüttelkultur und der Standkultur in Erscheinung.

Die Schüttelkultur ergab im Durchschnitt etwas höhere Ausbeuten, jedoch war bei ihr sowohl das Mycelwachstum als auch die Alkaloidbildung ausserordentlich inkonstant. In Versuchsreihen mit genau gleich beschickten und beimpften Kolben entwickelte sich das Mycel von Kolben zu Kolben verschieden sowohl in der Wachstumsform als auch in der Farbe. Die sich bildenden Mycelballen waren sehr unterschiedlich in Form und Grösse, die Farbe variierte von hellgrau, gelb, orange bis rotbraun. Ähnlich variierte auch die Farbe der Nährlösung. Ebenso unterschiedlich war die bei der Schüttelkultur meistens auftretende Schleimbildung. In einzelnen Kolben wurde die Nährlösung manchmal derart viskos, dass sie sich durch Filtration vom Mycel nicht mehr abtrennen liess. Entsprechend der stark unterschiedlichen Mycelentwicklung innerhalb einer Schüttelkulturreihe waren auch die Alkaloidgehalte der einzelnen Ansätze sehr unterschiedlich.

¹⁾ Ann. Rep. Takeda Res. Lab. **10**, 73 (1951).

²⁾ J. Agric. Chem. Soc. Japan **25**, 458 (1952).

Die Tab. 1 gibt die Analysenergebnisse von je drei Schüttelkulturen zweier Stämme eines Versuchsansatzes wieder.

Tabelle 1.

Alkaloidgehalt in Filtraten von Schüttelkulturen der Stämme B₄ und B₅ nach verschiedener Kulturdauer.

Kolben Nr.	Pilzstamm	Gehalt in mg/l (Mol.-Gew. = 250)		
		nach 20 Tagen	nach 35 Tagen	nach 45 Tagen
1	B ₄	5	7	75
2	B ₄	11	8	13
3	B ₄	0	14	174
21	B ₅	0	8	20
22	B ₅	10	14	40
23	B ₅	8	8	13

Die Schüttelkulturen auf der modifizierten *Abe*'schen Nährlösung ergaben Kulturfiltrate mit einem auf kolorimetrischem Weg bestimmten, durchschnittlichen Alkaloidgehalt von 50–65 mg/l, ferner Trockenmycelien mit einem Gehalt von 0,06 bis 0,10% Alkaloiden (immer berechnet auf ein Mol.-Gew. 250).

In den Standkulturen bildete der Pilz allmählich eine dichte weisse Myceldecke, die sich mit zunehmendem Alter meistens rötlich, später teils rotbraun, teils gelbbraun anfärbte. Auch in den Standkulturen war die Wachstumsgeschwindigkeit und die Farbstoffbildung in den einzelnen Kolben unterschiedlich. Dagegen bildeten sich Schleimstoffe im Gegensatz zu den Schüttelkulturen nicht, oder nur in sehr geringer Menge.

Die Alkaloidbildung war in den einzelnen Standkulturen ebenfalls unterschiedlich, wenn auch nicht in dem Mass wie bei den Schüttelkulturen. In der Tab. 2 sind die Ergebnisse eines Versuchsansatzes wiedergegeben.

Tabelle 2.

Alkaloidgehalt in Filtraten von Standkulturen der Stämme B₄ und B₅ nach verschiedener Kulturdauer.

Kolben Nr.	Pilzstamm	Gehalt in mg/l (Mol.-Gew. = 250)		
		nach 28 Tagen	nach 42 Tagen	nach 50 Tagen
1	B ₄	10	23	20
2	B ₄	0	26	24
41	B ₅	0	11	14
42	B ₅	6	19	23

Grössere Ansätze von Standkulturen ergaben auf der modifizierten *Abe*'schen Nährlösung im Kulturfiltrat einen durchschnittlichen Alkaloidgehalt von 30 mg/l und im Trockenmycel von 0,04% (Mol.-Gew. = 250). Durch Zusatz von 5% Saccharose zu der Mannitnährlösung gelang es, in den Standkulturen ein rascheres und gleichmässigeres Wachstum zu erzielen, womit auch eine bessere Alkaloidausbeute Hand in Hand ging.

Für die präparative Isolierung der Alkaloide aus in-vitro-Kulturen wurden die Ansätze filtriert und das getrocknete Mycel und das Kulturfiltrat getrennt aufgearbeitet. Es konnten dafür die gleichen Extraktions- und Reinigungs-Methoden zur Anwendung kommen, wie sie für die Isolierung der Alkaloide aus dem Mutterkorn üblich sind.

Nach dem Vorextrahieren der sauer gestellten Lösung mit Äther zur Entfernung von Ballaststoffen wurden die Alkaloide mit Soda in Freiheit gesetzt, mit einem Gemisch von Chloroform-Isopropylalkohol oder mit Äther ausgeschüttelt und zur Trockne eingedampft. Schon aus dem rohen Alkaloidgemisch kristallisierte beim Aufnehmen mit Methanol eine einheitliche Base aus, die durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt werden konnte. Die kristalllösungsmittelfreien Prismen, die bei $245-247^{\circ}$ unter Zersetzung schmolzen und einen spez. Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -152^{\circ}$ (in Pyridin) zeigten, lieferten bei der Elementaranalyse Werte, die auf die Bruttoformel des von *M. Abe* und Mitarbeitern¹⁾ entdeckten Elymoclavins, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ON}_2$, stimmten. Auch das UV.-Absorptionsspektrum, ein typisches Indolspektrum (Maxima bei 227, 283 und 293 $\text{m}\mu$), stimmt mit den Angaben der japanischen Autoren über Elymoclavin überein.

Das nach der Abtrennung der Hauptmenge von Elymoclavin verbleibende Alkaloidgemisch liess sich an der Aluminiumoxydsäule durch Elution mit Chloroform mit steigenden Zusätzen von Methanol in drei einheitliche Alkaloide aufteilen. Als die am schwächsten haftende Fraktion liess sich ein Alkaloid extrahieren, das nach dem Umkristallisieren aus Aceton in farblosen Nadeln erhalten wurde, die bei 205° unter Zersetzung schmolzen. Die Werte der Elementaranalyse stimmten auf die Formel $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2$ des Agroclavins. Auch der spez. Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -155^{\circ}$ (in Chloroform) entsprach dem von *M. Abe*¹⁾ beschriebenen Alkaloid. Es besitzt ein typisches Indolspektrum mit Maxima bei 225, 284 und 293 $\text{m}\mu$.

Als nächste Fraktion erschien jeweils im Eluat noch etwas Elymoclavin, das nach einmaligem Umkristallisieren aus Methanol in allen Eigenschaften mit dem aus dem rohen Alkaloidgemisch vor dem Chromatographieren auskristallisierten Alkaloid übereinstimmte.

Aus der am stärksten an der Säule haftenden Alkaloidfraktion kristallisierten beim Aufnehmen mit Methanol kleinere Mengen eines bis anhin unbekanntes Alkaloids, für das wir die Bezeichnung Penniclavin vorschlagen. Das aus Methanol oder Aceton in Plättchen kristallisierende Alkaloid schmilzt bei 222° unter Zersetzung und besitzt die Bruttoformel $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$. Der spez. Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +151^{\circ}$ (in Pyridin) ist für ein einheitliches Mutterkornalkaloid ungewohnt. Auch in seinen Farbreaktionen unterscheidet sich das neue Alkaloid sowohl von Agroclavin und Elymoclavin als auch von den Alkaloiden der Ergotamin-, Ergotoxin- und Ergobasin-Gruppe.

¹⁾ L. c.

Während diese mit dem *van Urk*'schen und dem *Keller*'schen Reagens blaue Färbungen geben, zeigt das neue Alkaloid eine grüne Farb-reaktion. Dagegen löst sich dieses in konz. Schwefelsäure ohne jeden Zusatz mit intensiver, rein blauer Farbe auf. Das UV.-Spektrum des neuen Alkaloids stimmt mit demjenigen der Lysergsäure und ihren Derivaten überein.

Aus Kulturfiltraten sowie aus den Mycelien der saprophytischen Kulturen konnten somit drei Alkaloide präparativ isoliert werden, nämlich das auch in der natürlichen Droge aufgefundene Agroclavin, ferner das Elymoclavin, das wir wegen der zu kleinen verfügbaren Menge der Sklerotien darin nicht sicher nachweisen konnten, und ein neues Alkaloid, $C_{16}H_{18}O_2N_2$, das Penniclavin. Ob dieses Alkaloid sich auch in den Sklerotien vorfindet, vermögen wir einstweilen nicht zu entscheiden. Es ist zu erwähnen, dass in den saprophytischen Kulturen das Verhältnis der drei gebildeten Alkaloide stark variiert, manchmal überwiegt das Agroclavin, manchmal das Elymoclavin, während das Penniclavin bisher immer nur in kleinerer Menge gebildet wurde.

Über die strukturelle Beziehung des Penniclavins zu den beiden andern vom gleichen Pilzstamm gebildeten Alkaloiden, dem Agroclavin und dem Elymoclavin, lässt sich aus biogenetischen Erwägungen und auf Grund der gleichen Anzahl Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffatome in der Bruttozusammensetzung mit grosser Wahrscheinlichkeit aussagen, dass das Penniclavin wie die beiden andern Alkaloide¹⁾ ein Derivat des 6,8-Dimethyl-ergolens ist. Ein charakteristischer Unterschied zwischen Penniclavin einerseits und Agroclavin und Elymoclavin andererseits besteht im Hinblick auf die Lage der ausserhalb des Indolsystems liegenden Kohlenstoffdoppelbindung. Wie aus dem Vergleich der UV.-Spektren hervorgeht, ist diese Doppelbindung im Penniclavin konjugiert, in den beiden andern Alkaloiden isoliert. Die grosse Haftfestigkeit des Penniclavins an der Aluminiumoxydsäule deutet darauf hin, dass eines der beiden Sauerstoffatome oder beide als Hydroxylgruppen vorliegen. Genauere Angaben über die Konstitution des neuen Alkaloids und über seine Beziehung zu den bereits bekannten Mutterkornalkaloiden hoffen wir in einer späteren Mitteilung machen zu können.

Experimenteller Teil²⁾.

Übersicht.

1. Isolierung der Alkaloide aus Sklerotien von *Pennisetum typhoideum*.
2. Züchtung des Pilzes in vitro.

¹⁾ *M. Abe et al.*, l. c.

²⁾ Alle Smp. wurden auf dem *Kofler*-Block bestimmt. Die Analysen wurden in unserm mikroanalytischen Laboratorium (Dr. *W. Schöniger*) ausgeführt. Die UV.-Spektren sind in unserm spektralanalytischen Laboratorium (Dr. *H. G. Leemann*) auf einem *Beckman*-Spektrophotometer, Modell DU, aufgenommen worden. Die kolorimetrischen Alkaloidbestimmungen wurden von Fr. *H. Gisi* ausgeführt.

3. Isolierung der Alkaloide aus in-vitro-Kulturen.

- a) Isolierung aus einem Standkulturansatz.
- b) Isolierung aus einem Schüttelkulturansatz.

4. Beschreibung der Alkaloide.

- a) Agroclavin.
- b) Elymoclavin.
- c) Penniclavin.

1. Isolierung der Alkaloide aus Sklerotien von *Pennisetum typhoideum*. 15 g Sklerotien wurden fein gemahlen und mit Petroläther entfettet. Dann extrahierte man einmal mit 75 cm³ und dann noch dreimal mit je 45 cm³ 2-proz. Weinsäurelösung in 70-proz. Aceton, indem man das Drogenpulver jeweils 15 Min. mit dem Lösungsmittel schüttelte. Die vereinigten weinsäuren Extrakte wurden durch Eindampfen im Vakuum vom Aceton befreit und die wässrige weinsäure Lösung zur Entfernung von Ballaststoffen zweimal mit je 60 cm³ Äther vorextrahiert. Dann setzte man die Alkaloide mit Soda in Freiheit und schüttelte die Lösung einmal mit 75 cm³ und dann noch dreimal mit je 45 cm³ Äther aus. Der Rückstand der vereinigten Ätherextrakte wog 85 mg und enthielt nach der kolorimetrischen Bestimmung 46 mg Alkaloide (auf ein Mol.-Gew. von 250 berechnet), entsprechend einem Alkaloidgehalt der Droge von 0,13%.

Beim Chromatographieren an Aluminiumoxyd mit Chloroform als Lösungsmittel liessen sich aus dem Rohprodukt 24 mg einer kristallisierenden Fraktion und 18 mg amorphes Alkaloid abtrennen. Der kristallisierte Anteil erwies sich als Agroclavin (Beschreibung siehe Abschnitt 4. a). Die amorphe Substanz konnte nicht weiter charakterisiert werden.

2. Züchtung des Pilzes in vitro. Durch steriles Abimpfen von Gewebe aus dem Innern von Sklerotien auf Bierwürze-Agar wurden mehrere Stämme rein gezüchtet. Werden diese bei einer Temperatur von 24° bebrütet, so bilden sie ein weisses, leicht gefaltetes Mycel, das sich nach 4–6 Wochen rosarot verfärbt. Dabei wird in den Agar ein violettbrauner Farbstoff ausgeschieden.

Zur Verifizierung der Reinkulturen führten wir kleine Infektionsversuche an *Pennisetum typhoideum* durch. Im Gewächshaus wurden einige Samen von *Pennisetum typhoideum* ausgesät. Nach ca. drei Monaten hatten sich mehrere Blütenstände entwickelt, die wir mit saprophytisch gezüchteten Pilzstämmen beimpfen konnten. Es geschah das durch Einstiche mit Injektionsnadeln oder durch kurzes Eintauchen der Blütenstände in den Impfstoff. Als Impfstoff wurde eine wässrige Aufschwemmung von Konidien ab Agarkulturen verwendet.

22 Tage nach dem Beimpfen wurden an einer Ähre zwei junge Sklerotien und ein Tropfen brauner Honigtau festgestellt. Im Honigtau fanden sich reichlich Konidien, aus denen wir wiederum Reinkulturen des Pilzes isolieren konnten. Diese Kulturen erwiesen sich als identisch mit den Mutterkulturen, die für die Beimpfung verwendet worden waren. Der Infektionserfolg war gering, er genügt jedoch zum sicheren Beweis für die Identität unserer Reinkulturen mit dem als Ausgangsmaterial verwendeten Pilz von *Pennisetum typhoideum*.

Nachdem die Stämme rein gezüchtet waren, verwendeten wir anfänglich eine modifizierte Abe'sche Nährlösung von folgender Zusammensetzung:

Mannit	50,0 g	ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0,004 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g	Bernsteinsäure	5,4 g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,3 g	NH ₄ OH bis pH 5,2	
FeSO ₄ ,7H ₂ O	0,013 g	Dest. Wasser ad 1000 cm ³	

Für spätere Versuche wurde diese Nährlösung noch ergänzt durch einen Zusatz von 50,0 g Rohrzucker pro Liter. Die Nährlösung sterilisierte man im Autoklaven jeweils während 20 Min. bei 107°.

Zur Herstellung des Impfmateri als wurde eine vier bis sechs Wochen alte Reagensglaskultur auf Bierwürzeagar oberflächlich sorgfältig abgeschabt, worauf man die Konidien in steriler physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmte und die mit dieser Auf-

schwemmung beimpften Kulturkolben bei 24° bebrütete. Die Schüttelkulturen wurden in *Erlenmeyer*-Kolben von 200 oder 300 cm³ Inhalt mit 80 bzw. 100 cm³ Nährlösung angelegt und dauernd auf einer Schüttelmaschine in rotierender Bewegung (ca. 270 Umdrehungen/min.) gehalten, während man die Standkulturen in 1,6 l *Fernbach*-Kolben mit je 500 cm³ Nährlösung ansetzte und im Dunkeln ruhend bebrütete.

Zur kolorimetrischen Bestimmung des Alkaloidgehaltes wurde das abgeerntete Mycel gewaschen, bei 45° im Luftstrom getrocknet und gemahlen. Die eingewogene Menge wurde mit Petroläther entfettet, nach Zusatz von Wasser mit MgO alkalisch gemacht, mit Äther extrahiert und der ätherische Extrakt mit Weinsäurelösung ausgeschüttelt. Zu 1,0 cm³ weinsaurer Lösung wurden 2,0 cm³ *van Urk*'sches Reagens (0,25% p-Dimethylaminobenzaldehyd in 50-Gew.-proz. H₂SO₄-Lösung) beigegeben und die Farb-reaktion durch 15 Min. langes Belichten unter der Quarzlampe entwickelt. Die Intensität der Blaufärbung wurde im Kolorimeter gemessen, der entsprechende Alkaloidgehalt aus einer Eichkurve ermittelt und in Prozenten des Trockengewichtes angegeben, wobei der Berechnung ein Molekulargewicht von 250 zugrunde gelegt wurde.

In der abfiltrierten Nährlösung bestimmten wir den Gehalt an Alkaloiden entweder nach der Extraktionsmethode oder meist direkt, indem wir 2,0 cm³ *van Urk*'sches Reagens zu 1,0 cm³ des Filtrates gaben. Auf diese Weise konnten Serienbestimmungen mit grosser Zeitersparnis und mit bedeutend geringeren Mengen an Filtrat durchgeführt werden. Die Genauigkeit dieses abgekürzten Verfahrens war für vergleichende Bestimmungen ausreichend (Abweichungen nicht über 10%).

3. Isolierung der Alkaloide aus in-vitro-Kulturen. a) Isolierung aus einem Standkulturansatz. Ein Ansatz von 14 l Nährlösung mit einem Zusatz von 5% Rohrzucker ergab nach einer Bebrütungszeit von 47 Tagen und Abtrennung des Mycels 11,7 l Kulturfiltrat mit einem kolorimetrisch bestimmten Alkaloidgehalt von 226 mg/l (für das Mol.-Gew. 250 berechnet). Das Filtrat enthielt somit 2,65 g Alkaloide. Zur Entfernung von Ballaststoffen wurde die weinsauer gestellte Lösung zweimal mit je 10 l Äther vor-extrahiert. Die mit Soda freigesetzten Alkaloide wurden hierauf einmal mit 4 l und dreimal mit je 3 l Chloroform-Isopropylalkohol (3 : 1) ausgeschüttelt.

Den beim Eindampfen hinterbliebenen öligen Extrakt-Rückstand (4,0 g) löste man in 20 cm³ Methanol und liess über Nacht stehen, wobei 1,78 g eines rohen Alkaloides auskristallisierten. Durch Umkristallisieren aus Methanol wurden daraus 1,39 g eines reinen Präparates gewonnen, das in allen seinen Eigenschaften mit dem von *M. Abe* und Mitarbeitern¹⁾ beschriebenen Elymoclavin (Beschreibung siehe Abschnitt 4. b) übereinstimmte.

Der Eindampfrückstand der Elymoclavin-Mutterlauge wurde in Chloroform gelöst und an der 150fachen Menge Aluminiumoxyd (nach *Brockmann*) chromatographiert. Mit abs. Chloroform liessen sich 1,18 g ölige Substanz eluieren, die mit Petroläther verrieben wurde. Es blieb eine feste, ölfreie Alkaloidfraktion (0,75 g) ungelöst, aus der sich durch Umkristallisieren aus Aceton 338 mg reines Agroclavin gewinnen liessen. Es stimmte in seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften mit dem aus dem natürlichen Ausgangsmaterial isolierten Präparat vollkommen überein.

Die fortgesetzte Elution des Chromatogramms mit Chloroform, das 0,5% Methanol enthielt, lieferte 0,40 g rohes Elymoclavin. Durch Umkristallisieren aus Methanol liessen sich daraus 0,31 g reines Alkaloid gewinnen, das zusammen mit dem vor dem Chromatographieren direkt auskristallisierten Alkaloid die Gesamtausbeute an reinem Elymoclavin auf 1,70 g erhöhte.

Nach der erschöpfenden Elution des Elymoclavins aus dem Chromatogramm wurde der Methanolgehalt des Chloroforms auf 2% erhöht. Mit diesem Lösungsmittel liessen sich insgesamt 0,52 g einer relativ gut haftenden Alkaloidfraktion eluieren. Beim Aufnehmen in wenig Methanol kristallisierten 0,22 g des neuen Alkaloids Penniclavin aus (Beschreibung siehe Abschnitt 4. c). Der in der Mutterlauge verbleibende Anteil dieser Fraktion war dunkel gefärbt und liess sich nicht mehr auf reine Substanz verarbeiten.

¹⁾ L. c.

Von 2,65 g kolorimetrisch ermitteltem Gesamtalkaloid in 11,7 l Kulturfiltrat konnten somit im ganzen 2,26 g kristallisiert in Form einheitlicher Alkaloide isoliert werden.

Das Mycel dieses Ansatzes, das nach dem Trocknen 270 g wog, zeigte einen kolorimetrisch ermittelten Alkaloidgehalt von 0,237% (Mol.-Gew. 250); es enthielt somit 640 mg Alkaloide. Zur Isolierung derselben wurde es nach dem Entfetten mit Petroläther auf gleiche Weise extrahiert wie die Sklerotien (siehe Abschnitt 1). Der Extrakt-rückstand (1,05 g) schied nach dem Aufnehmen in 5 cm³ Methanol 0,32 g kristallisiertes Elymoclavin ab.

Der Eindampfrückstand der Mutterlauge wurde auf die gleiche Weise chromatographiert wie das entsprechende Präparat aus dem Kulturfiltrat. Aus der mit abs. Chloroform eluierten Alkaloidfraktion liessen sich 0,08 g aus Essigester umkristallisiertes, reines Agroclavin gewinnen. Das Eluat mit Chloroform, das 0,5% Methanol enthielt, lieferte weitere 0,11 g von aus Methanol kristallisiertem Elymoclavin. Mit Chloroform, dem 2% Methanol zugesetzt waren, wurden schliesslich noch 0,13 g Rohalkaloid eluiert, aus dem sich 0,06 g Penniclavine in kristallisierter, reiner Form gewinnen liessen.

Aus dem Mycel sind somit die gleichen Alkaloide wie aus dem Kulturfiltrat in einer Ausbeute von total 570 mg in kristallisierter Form isoliert worden.

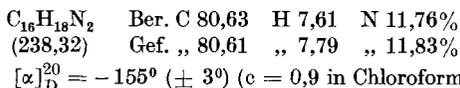
b) Isolierung aus einem Schüttelkulturansatz. Ein Ansatz mit Nährlösung ohne Rohrzucker ergab nach 33 Tagen Bebrütung auf der Schüttelmaschine nach dem Abfiltrieren des Mycels 1,7 l Kulturfiltrat mit einem kolorimetrisch bestimmten Alkaloidgehalt von 74 mg/l (berechnet auf Mol.-Gew. 250); das Filtrat enthielt somit 126 mg Alkaloide.

Das Kulturfiltrat wurde in gleicher Weise vorextrahiert, wie unter Abschnitt 3. a) beschrieben wurde. Nach Zusatz von Natriumhydrogencarbonat schüttelte man zweimal mit je 1 l Äther und nach Zufügen von etwas Natronlauge und Sättigung mit festem Kochsalz noch zweimal mit je 1 l Äther aus. Die vereinigten und getrockneten Ätherauszüge lieferten 158 mg Eindampfrückstand mit einem kolorimetrisch ermittelten Alkaloidgehalt von 127 mg (Mol.-Gew. 250). Beim Chromatographieren an Aluminiumoxyd liessen sich mit abs. Chloroform 108 mg Alkaloid eluieren, aus dem nach dem Aufnehmen in Aceton 95 mg reines Agroclavin auskristallisierten. Chloroform, das 2% Alkohol enthielt, eluierte 11 mg eines zweiten Alkaloids, das beim Umkristallisieren aus Methanol 8 mg reines Elymoclavin lieferte.

Der Ansatz ergab somit aus 1,7 l Kulturfiltrat eine Ausbeute von 103 mg kristallisierten Alkaloiden und 16 mg amorphen Mutterlaugepräparaten.

Das abfiltrierte Mycel wog nach dem Trocknen 22 g. Es besass einen kolorimetrisch ermittelten Alkaloidgehalt von 0,096% (Mol.-Gew. 250), enthielt also 21 mg Alkaloide. Bei der präparativen Aufarbeitung wurden 11 mg Agroclavin und 4 mg Elymoclavin isoliert.

4. Beschreibung der Alkaloide. a) Agroclavin kristallisiert aus Aceton in farblosen Nadeln, die bei 205° unscharf und unter Zersetzung schmelzen. Für die Analyse wurde das Alkaloid im Hochvakuum bei 110–130° sublimiert.

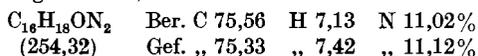


Bei der Keller'schen Farbreaktion (mit eisenchloridhaltigem Eisessig und konz. Schwefelsäure) gibt das Agroclavin eine violettblaue Färbung.

Das UV.-Spektrum ist durch folgende Maxima charakterisiert: $\log \epsilon_{\text{max.}} = 4,47$ bei 225 m μ ; $\log \epsilon_{\text{max.}} = 3,88$ bei 284 m μ ; $\log \epsilon_{\text{max.}} = 3,81$ bei 293 m μ .

b) Elymoclavin ist in den üblichen organischen Lösungsmitteln schwer löslich. Einzig in Pyridin zeigt es eine beträchtliche Löslichkeit. Aus Methanol, in dem es sich bei Siedehitze in 70 Teilen löst, kristallisiert Elymoclavin in Prismen, die bei 245–247°

unter Zersetzung schmelzen. Für die Analyse wurde das Kristallisat aus Methanol im Hochvakuum bei 100° getrocknet, wobei kein Gewichtsverlust eintrat.



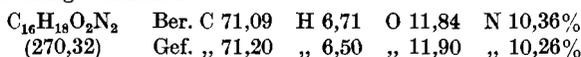
$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -152^\circ (\pm 2^\circ) \quad (c = 0,9 \text{ in Pyridin})^1$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -111^\circ (\pm 3^\circ) \quad (c = 0,1 \text{ in Äthanol})^1$$

Mit *Keller's* Reagens gibt das Elymoclavin eine violettblaue Färbung.

Das UV.-Spektrum des Elymoclavins ist durch folgende Maxima charakterisiert: $\log \epsilon_{\text{max.}} = 4,31$ bei 227 m μ ; $\log \epsilon_{\text{max.}} = 3,84$ bei 283 m μ ; $\log \epsilon_{\text{max.}} = 3,76$ bei 293 m μ .

c) Penniclavine. Das aus Methanol auskristallisierte Alkaloid wurde aus Methanol und aus Aceton umkristallisiert. Es löst sich bei Siedehitze in 30 Teilen Methanol und in 80 Teilen Aceton und scheidet sich beim Erkalten aus diesen Lösungsmitteln in rechteckigen Plättchen aus, die kein Kristalllösungsmittel enthalten, und die bei 222° unscharf und unter Zersetzung schmelzen.



$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +151^\circ (\pm 2^\circ); [\alpha]_{5461}^{20} = +201^\circ (\pm 2^\circ) \quad (c = 0,5 \text{ in Pyridin})$$

Potentiometrische Titration: 45,8 mg Base, in wässrigem Alkohol gelöst, verbrauchten 1,69 cm³ 0,1-n. HCl. Mol.-Gew. ber. 270; gef. 271.

Das UV.-Spektrum stimmt mit demjenigen der Lysergsäure- und der Isolysergsäure- und anderer Ergolen-Derivate überein²⁾. Es ist durch folgende Maxima charakterisiert: $\log \epsilon_{\text{max.}} = 4,29$ bei 240 m μ ; $\log \epsilon_{\text{max.}} = 3,93$ bei 315 m μ .

Farbreaktionen: Bei der *Keller's*chen und bei der *van Urk's*chen Farbreaktion entsteht zum Unterschied von allen bisher bekannten Mutterkornalkaloiden nicht eine blaue, sondern eine grüne Färbung, die sich nach gelbgrün verfärbt. Charakteristisch für das neue Alkaloid ist die intensive, reinblaue Farbe, die beim Auflösen einer Spur der Substanz in konz. Schwefelsäure entsteht, und die mehrere Std. beständig ist.

Zusammenfassung.

Aus den Sklerotien eines auf der afrikanischen Kolbenhirse *Pennisetum typhoideum Rich.* gefundenen Mutterkornpilzes konnte das Alkaloid Agroclavin isoliert und identifiziert werden. Aus den Sklerotien wurden Pilzstämme isoliert, welche die Fähigkeit besitzen, in saprophytischer Kultur in vitro Alkaloide zu bilden. Aus Kulturfiltraten und aus Mycelien konnten die beiden bereits bekannten Alkaloide Agroclavin und Elymoclavin, sowie ein neues Alkaloid mit der Bruttoformel C₁₆H₁₈O₂N₂, für das wir die Bezeichnung Penniclavine vorschlagen, isoliert und charakterisiert werden.

Pharmazeutisch-Chemisches Laboratorium
Sandoz, Basel.

¹⁾ *M. Abe, T. Yamano, Y. Kozu & M. Kusumoto*, l. c., geben für Elymoclavin die folgenden, von den unsrigen ziemlich stark abweichenden Drehwerte an: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -136^\circ$ ($c = 0,5$ in Pyridin) und $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -59^\circ$ ($c = 0,1$ in Äthanol). Da aber die übrigen Daten mit unseren Beobachtungen übereinstimmen, zweifeln wir nicht daran, dass unser Alkaloid aus dem Pilz von *Pennisetum typhoideum* mit dem Elymoclavin der japanischen Autoren identisch ist.

²⁾ Vgl. z. B. *A. Stoll, A. Hofmann & F. Troxler*, *Helv.* **32**, 506 (1949).