

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. BAUDET, M. CALIN & E. CHERBULIEZ, *Helv.*, à paraître.  
[2] L. A. WARREN & S. SMILES, *J. chem. Soc.* 1937, 914.  
[3] C. K. INGOLD, *Structure and Mechanism in Organic Chemistry* 1953.  
[4] A. A. LEVY, H. C. RAINS & S. SMILES, *J. chem. Soc.* 1937, 3264.  
[5] J. F. BUNNETT & R. E. ZAHLER, *Chem. Review* 49, 362 (1951).  
[6] R. KUHN & H. J. HAAS, *Angew. Chem.* 67, 785 (1955).

**115. 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure,  
ein neues Ergolinderivat aus Kulturen eines Stammes von  
*Claviceps paspali* STEVENS et HALL<sup>1)</sup>**

60. Mitteilung über Mutterkornalkaloide [1]<sup>2)</sup>

von H. Kobel, E. Schreier und J. Rutschmann

(4. IV. 64)

Seit die Mutterkornalkaloide als Heilmittel eine grosse Bedeutung erlangt haben, ist immer wieder versucht worden, diese Alkaloide aus Reinkulturen von *Claviceps*-Stämmen auf künstlichen Nährböden oder Nährlösungen zu gewinnen. Solange man diese Versuche mit Roggenmutterkornstämmen durchführte, welche in den Sklerotien hauptsächlich Peptidalkaloide enthielten, waren die Ergebnisse meist negativ, oder die Ausbeuten doch nicht hoch genug, um eine Produktion auf fermentativem Wege zu gestatten. Die höchsten Ausbeuten an Peptidalkaloiden, die bis anhin regelmässig in Standkulturen erreicht wurden, betragen um 160 mg pro Liter Gesamtkultur [2].

Hohe Alkaloidausbeuten in saprophytischen Kulturen wurden erst erhalten, als man *Claviceps purpurea*-Stämme von Wildgräsern, oder *Claviceps*-Stämme anderer Species untersuchte. 1951 begann ABE [3] mit der Veröffentlichung einer Serie von Arbeiten über die Gewinnung der von ihm entdeckten, sogenannten Clavin-Alkaloide aus saprophytischen Kulturen von *Claviceps*-Stämmen, die er auf *Agropyrum*- und *Elymus*-Arten gefunden hatte. Der Sammelbegriff Clavine umfasst eine Anzahl Indolbasen, z.B. V, die im Gegensatz zu den «klassischen» Mutterkornalkaloiden vom Typ des Ergobasins und Ergotamins keine Derivate der Lysergsäure (I) sind, sondern in 8-Stellung des Ergolen- bzw. Ergolin-Systems Substituenten niedrigeren Oxydationszustandes, wie Methyl oder Hydroxymethyl tragen. Von einem Teil dieser Verbindungen darf mit grosser Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass sie Zwischenstufen auf dem biogenetischen Weg sind, der bei den amidartigen Derivaten der Lysergsäure endet [4]. Die anderen Angehörigen dieser Gruppe scheinen Nebenprodukte zu sein, die an verschiedenen Stellen der Biosynthese abzweigen. Über eine *Claviceps*-Art, die auf *Pennisetum typhoideum* parasitiert, und die *in vitro* unter geeigneten Bedingungen 1 bis 2 g Clavinalkaloide pro Liter produziert, berichteten 1954 STOLL *et al.* [5] und 1957 HOFMANN *et al.* [6].

<sup>1)</sup> Auszugsweise vorgetragen an der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Fribourg, 22. 2. 1964, vgl. *Chimia* 18 (im Druck).

<sup>2)</sup> Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1064.

In neuerer Zeit entdeckten ARCAMONE *et al.* [7] [8], dass ein italienischer Stamm von *Claviceps paspali* in Submerskulturen hohe Mengen (bis zu 2 g/l) von einfachen Lysergsäureamiden (II und III) in die Nährlösung ausscheidet. Diese Derivate lassen sich zu Lysergsäure (I) hydrolysieren, welche ihrerseits als Ausgangsmaterial für verschiedene partialsynthetische Therapeutica dienen kann. Die Entwicklung der fermentativen Kultur dieses Stammes hat damit erstmals die Voraussetzungen geschaffen, welche die industrielle Produktion eines als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Pharmaka brauchbaren Mutterkornalkaloides ohne die natürliche Wirtspflanze gestatten.

Auch in unseren Laboratorien wird das Problem der Gewinnung von Alkaloiden aus saprophytischen Kulturen des *Paspalum*-Mutterkorns seit längerer Zeit bearbeitet. Von zahlreichen, rund um die Erde verteilten Fundorten beschafften wir uns Sklerotienmaterial, aus welchem wir mehrere hundert Stämme isolierten und unter geeigneten Bedingungen in Submerskultur züchteten. In den Kulturfiltraten bestimmten wir kolorimetrisch den Gesamtalkaloidgehalt und durch quantitative Papierchromatographie die prozentuale Zusammensetzung der Alkaloidgemische. Es zeigte sich nun, dass alle untersuchten Stämme unter den für dieses Screening gewählten Standardbedingungen sich bezüglich ihres Wachstums und der Ausbildung der Mycelformen nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Was das quantitative Alkaloidbildungsvermögen betrifft, fanden wir alle Übergänge von Stämmen, die nur Spuren von Alkaloiden produzierten, bis zu solchen, die Ausbeuten von 1,5 g pro Liter und mehr ergaben.

Bezüglich der Zusammensetzung des Alkaloidgemisches zeigte es sich, dass 3 wohldefinierte «chemische Rassen» bestehen. In Tab. 1 ist von jeder Rasse ein Beispiel aufgeführt.

Tabelle 1. *Alkaloid-Spektrum von Submerskulturen eigener Claviceps-paspali-Stämme*

Nährmedium: Sorbit, Ammoniumsuccinat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$

Fermentationsdauer: 8–10 Tage

Stämme isoliert aus Sklerotien von <i>Paspalum dilatatum</i> Herkunft	Alkaloid- gehalt mg/l	Zusammensetzung % quantitative PC**)						
		Ergolen- carbon- säuren	Lyserg- säureamid Isolyserg- säureamid	Ergo- basin	Ergo- basinin	Clavine		
						Chano- clavin	Elymo- clavin	andere
Neuguinea	1400		90*)	4	2	2	1	1
Argentinien	400		14*)	65	13	4	1	3
Portugal	a) 620	86	8*)	1	0,5	2	1	1
	b) 550	95				2	1	2

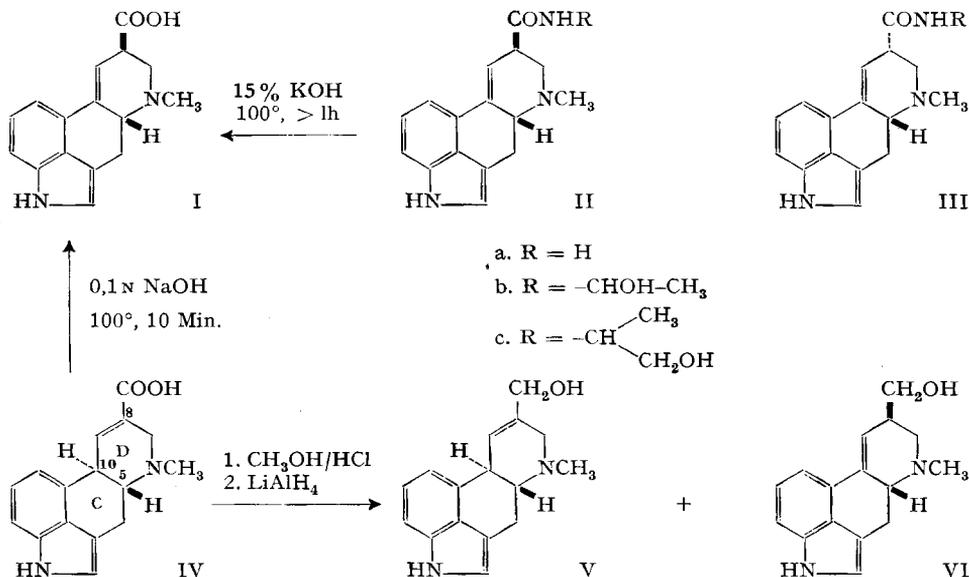
\*) inkl. Methylcarbinolamide

\*\*) PC = Papierchromatographie

Zur ersten, zusammen mit den Wirtsspecies *Paspalum dilatatum* und *Paspalum distichum* über die wärmeren Zonen der ganzen Erde verbreiteten Rasse gehören 98% aller untersuchten Stämme. Ihr sind auch die in den Publikationen von ARCAMONE *et al.* [7] [8] und von GRÖGER & TYLER [9] erwähnten Stämme zuzuordnen. Als Hauptalkaloide finden sich hier das Amid und das Methylcarbinolamid der Lysergsäure (IIa, IIb) und der Isolysergsäure (IIIa, IIIb). Neu und bisher nicht beschrieben

sind die beiden anderen, sehr seltenen Rassen. Bei der zweiten Rasse, die wir aus Argentinien erhalten haben, bestehen 75 bis 80% aller Alkaloide aus Ergobasin (IIc) und Ergobasinin (IIIc). Die dritte chemische Rasse, die wir bisher nur in Portugal gefunden haben, bildet fast ausschliesslich amphotere Produkte, die sich der Kulturlösung mit organischen Lösungsmitteln nicht entziehen lassen und sich bei der papierchromatographischen Analyse wie Lysergsäure und Isolysergsäure verhalten.

Für die Isolierung derartiger Aminosäuren gibt es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten. Als eine für den vorliegenden Fall geeignete Methode erwies sich die Adsorption aller Verbindungen mit basischen Gruppen an einem stark sauren Ionenaustauscher, von dem dann die amphoterer Verbindungen leicht mit Ammoniak abgelöst



werden konnten. Beim Einengen des Eluates wurde direkt ein schwerlösliches, sich ähnlich wie Lysergsäure verhaltendes Rohkristalliat erhalten. Die Kontrolle des UV.-Spektrums zeigte dann aber, dass nicht diese Verbindung, sondern eine andere, nahe verwandte Aminosäure den Hauptbestandteil des Gemisches bildete. Auf Grund unserer Untersuchung können wir diesem nun die Struktur der bisher nicht bekannten 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV) zuschreiben.

Die neue Verbindung unterscheidet sich von der Lysergsäure lediglich durch die Lage der Doppelbindung im Piperideinring, die mit dem aromatischen System nicht mehr konjugiert ist. Von der reinen Verbindung wäre demnach ein UV.-Spektrum zu erwarten, wie es die Dihydrolysergsäure oder das Elymoclavin zeigen. Das kristallisierte Rohprodukt weist demgegenüber ein Absorptionsverhalten auf (Fig. 1, Kurve 2), das es als Gemisch von ca. 70% der  $\Delta^{8,9}$ -Säure mit ca. 30% Lysergsäure bzw. Isolysergsäure kennzeichnet. Nach einem Reinigungsschritt über das Hydrochlorid verschiebt sich das Verhältnis nach 90:10%.

Die zur Carboxylgruppe  $\alpha, \beta$ -ständige Doppelbindung ist labil. Sie wandert unter milden Bedingungen in die Konjugation zum Indolkern, wobei Lysergsäure gebildet

wird. Die Leichtigkeit, mit der diese Umwandlung verläuft, ersieht sich am besten aus der bei verschiedenen Temperaturen UV.-spektroskopisch bestimmten Halbwertszeit. Diese beträgt in 0,1N Natronlauge z.B. bei 20° 120 Std. und bei 100° noch 2 Min. Die Reaktionskinetik ist 1. Ordnung. Bei diesem Übergang ändert sich der spezifische Drehwert in 0,1N Natronlauge von ca.  $-200^\circ$  nach  $+100^\circ$ .

Die Labilität der isolierten Doppelbindung im Ring D erklärt die Schwierigkeiten, die sich bei der papierchromatographischen Bestimmung und bei den Versuchen zur Reindarstellung der neuen Säure ergeben, indem bei allen Manipulationen in neutralem und basischem Medium Lysergsäure neu entsteht. Die präparative Gewinnung der reinen  $\Delta^{8,9}$ -Säure aus dem Gemisch gelingt dadurch, dass die im Gemisch enthaltene Lysergsäure durch die bekannte photochemische Wasseranlagerung an ihre 9,10-ständige Doppelbindung in Lumilysergsäure übergeführt wird [10]. Bei dieser Reaktion bleibt die isomere Säure unverändert. Aus dem Reaktionsgemisch kann die  $\Delta^{8,9}$ -Säure als Hydrochlorid durch fraktionierte Kristallisation isoliert werden.

Noch labiler als in der freien Carbonsäure ist die Doppelbindung in ihrem Methylester. Beim Versuch, die Säure mit Diazomethan zu verestern, wird einzig Lysergsäure-methylester erhalten. Der isomere Ester wird an sich leicht gebildet, wenn die neue Säure, aus Löslichkeitsgründen vorzugsweise als Hydrochlorid, mit Methanol und Chlorwasserstoff behandelt wird. Jedoch ist bei der Aufarbeitung eine weitgehende Umlagerung kaum zu vermeiden, so dass der reine Ester sich bisher lediglich als Hydrochlorid, aber nicht frei hat fassen lassen. In saurem Milieu unterbleibt sowohl bei der Säure als auch beim Ester die Wanderung der isolierten Doppelbindung. Lösungen der  $\Delta^{8,9}$ -Säure in 1N Salzsäure zeigten bei Raumtemperatur nach Tagen und bei 60° nach Std. praktisch keine Änderung des UV.-Spektrums. Auch bei noch höheren Temperaturen (z.B. 90°) wurde im UV. nicht die Ausbildung des Lysergsäure-Chromophors beobachtet, jedoch trat bei diesen energischen Bedingungen nach kurzer Zeit unter Blaufärbung der ursprünglich farblosen Lösung weitgehende Zersetzung ein.

An  $\Delta^{8,9}$ -Verbindung relativ reiche, sehr schonend gewonnene Esterpräparate haben schliesslich die Reaktion ermöglicht, die den chemischen Beweis für die durch die physikochemischen Resultate wahrscheinlich gemachte Struktur der neuen Ergolencarbonsäure IV liefert: die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran, die zu einem Gemisch von Elymoclavine (V) und Lysergol (VI) führt. Elymoclavine kann nur aus einer  $\Delta^{8,9}$ -Verbindung hervorgegangen sein, die überdies eine *trans*-Verknüpfung der Ringe C und D, sowie an C-5 und C-10 die absolute Konfiguration der Dihydrolysergsäure(I) aufweisen muss [11]. In Übereinstimmung mit dieser Stereochemie und im Gegensatz zu Lysergsäure zeigt die neue Säure eine stark negative optische Drehung. Die bei der Umlagerung in Lysergsäure beobachtete starke Verschiebung der spezifischen Drehung von stark negativen zu stark positiven Werten entspricht den analogen Verhältnissen, die man z.B. bei der Umlagerung von Elymoclavine (V) in Lysergol (VI) oder Agroclavine in Lysergin durch energische Alkalieinwirkung [12] findet.

Die neue Aminosäure IV sei noch durch ihre UV-, IR.- und NMR.-Spektren charakterisiert (Fig. 1-4).

Das UV.-Absorptionsspektrum des IV (Fig. 1, Kurve 3) stimmt mit demjenigen von Elymoclavine weitgehend überein. Hier ist darauf hinzuweisen, dass die freie

Säure, anders als alle bisher bekannten Ergolinalkaloide, Unterschiede in der Feinstruktur des UV.-Spektrums bei verschiedenem pH aufweist, die offensichtlich durch die nur in diesem Fall mögliche, direkte Wechselwirkung der  $\alpha, \beta$ -Doppelbindung mit der ionisierten oder nicht dissoziierten Carboxylgruppe und eine leichte Fernwirkung dieses variablen Systems auf den aromatischen Chromophor bedingt ist.

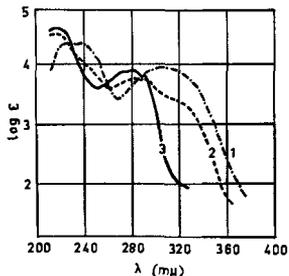


Fig. 1. UV.-Spektrien

Kurve 1: Lysergsäure (0,1N NaOH)

Kurve 2: kristallisiertes Rohprodukt aus dem Kulturfiltrat (0,1N NaOH)

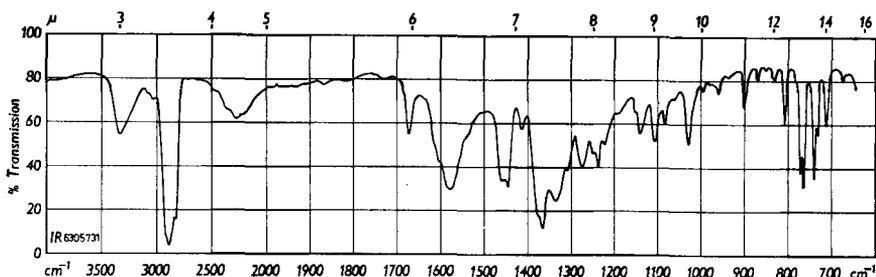
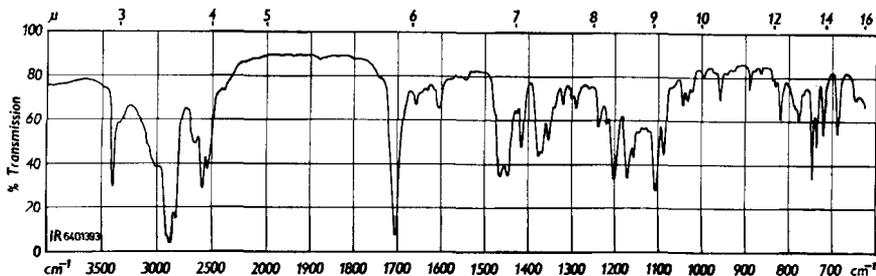
Kurve 3: 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV) ( $\text{CH}_3\text{OH}$ -5-proz.  $\text{NH}_4\text{OH}$ )Fig. 2. IR.-Spektrum: 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV) (Nujol)

Fig. 3. IR.-Spektrum: IV-Hydrochlorid (Nujol)

Auf Grund des IR.-Spektrums (Fig. 2) liegt die freie  $\Delta^{8,9}$ -Säure IV in kristallisierter Form als Betain vor. Die Bande bei  $1678 \text{ cm}^{-1}$  rührt vermutlich von der zur Carboxylgruppe  $\alpha, \beta$ -ständigen Doppelbindung her. Entsprechende, etwas schwächere Banden bei  $1660 \text{ cm}^{-1}$  treten auch beim IV-Hydrochlorid (Fig. 3), sowie beim Methylester und beim Methylesterhydrochlorid von IV auf, während bei den analogen Ver-

bindungen aus Lysergsäure-Reihe und bei den 8,9-ungesättigten Clavinen (z.B. Elymoclavin und Agroclavin) in diesem Frequenzbereich keine Absorption zu beobachten ist. Die Carbonylschwingung bei  $1708\text{ cm}^{-1}$  der Säure-Funktion des Hydrochlorids von IV (Fig. 3), sowie der Ester-Funktion des IV-Methylester-hydrochlorids spricht für das Vorliegen einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäure. Die entsprechende Bande beim Lysergsäure-hydrochlorid erscheint dagegen bei  $1724\text{ cm}^{-1}$  und beim Lysergsäure-methylester bei  $1728\text{ cm}^{-1}$ .

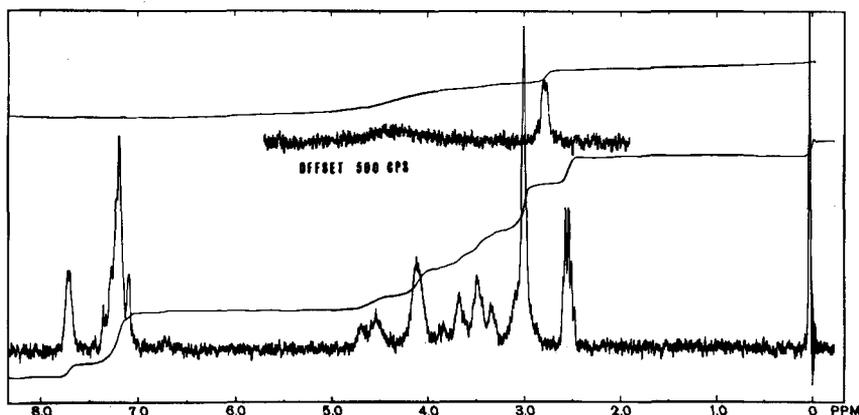


Fig. 4. NMR.-Spektrum von IV-Hydrochlorid. Absorptions- und Integrationspektrum einer 10-proz. Lösung in Deuteriodimethylsulfoxid. Tetramethylsilan ( $\delta = 0$  ppm) als internes Bezugssignal; Dimethylsulfoxid  $\delta = 2,54$  ppm.

Das NMR.-Spektrum (Fig. 4) des Hydrochlorids von IV steht, obwohl nicht alle Signale eindeutig interpretiert werden können, in bester Übereinstimmung mit der für die neue Säure ermittelten Struktur. Von Interesse ist vor allem der Vergleich mit dem Spektrum des Lysergsäure-hydrochlorids. Beide Verbindungen weisen im Frequenzbereich von 7,0 bis 7,35 ppm komplexe Signale für 4 aromatische Protonen auf. Ein weiteres, einem Proton entsprechendes Signal erscheint beim Lysergsäure-hydrochlorid bei 6,67 ppm und beim IV-Hydrochlorid bei 7,68 ppm. Beide Signale sind dem Proton an C-9 zuzuordnen. Bei der Lysergsäure ist dieses Proton Teil eines aromatischen Systems, während es bei der  $\Delta^{8,9}$ -Säure einem  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäure-System angehört. Dieser verschiedenartige Bindungscharakter bedingt die grosse Differenz der chemischen Verschiebung, wobei, wie erwartet, das Vinyl-Proton der 8,9-ungesättigten Verbindung bei tieferem Feld absorbiert.

Über die genaue Stellung der  $\Delta^{8,9}$ -Säure IV im Gesamtbild der Biogenese der Mutterkornalkaloide möchten wir noch keine (z.T. naheliegende) Hypothesen äussern, bevor diesbezügliche eingehendere Versuche durchgeführt sind. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass wir Stämme der neuen Rasse besitzen (vgl. Tab. 1, Beispiel b der 3. Rasse), die keine nachweisbaren Mengen von Lysergsäureamiden zu bilden vermögen. Auf Grund der neuesten Ergebnisse von Produktionsversuchen, die unter schonendsten Aufarbeitungsbedingungen ein Rohkristallisat mit mehr als 80% der  $\Delta^{8,9}$ -Säure und entsprechend vermindertem Lysergsäure-Gehalt ergeben haben, sind wir der Ansicht, dass die neue Säure das einzige von diesem Stamm gebildete Ergolin-

derivat ist – abgesehen von kleinen Mengen der als biogenetische Zwischenprodukte zu betrachtenden Clavine –, während die Lysergsäure als Artefakt während der Fermentationszeit in der Kulturlösung und dann bei der Aufarbeitung entsteht.

### Experimenteller Teil

Die Smp. wurden im evakuierten Röhrchen auf dem Apparat nach TOTTOLI bestimmt und sind nicht korrigiert. Für die Elementaranalysen und die physikochemischen Messungen wurden die Substanzen 2 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Die Messung der optischen Drehwerte erfolgte bei 20° im 1-dm-Rohr mit einem PERKIN-ELMER-Elektropolarimeter Modell 141 und die Aufnahme der NMR.-Spektren auf einem VARIAN-Spektrographen Modell A 60 mit Tetramethylsilan als internem Standard ( $\delta = 0$  ppm).

**1. Züchtung des Organismus.** – Zur Isolierung und Züchtung des Pilzes dienten folgende Nährmedien:

*Medium A:* 50 g Malzextrakt, 18 g Agar, mit destilliertem Wasser auf 1 l verdünnt; Lösung 20 Min. bei 120° sterilisiert.

*Medium B:* 500 ml Bierwürze<sup>3)</sup>, 250 ml Cornsteep-Extrakt<sup>4)</sup>, 20 g Agar, mit destilliertem Wasser auf 1 l verdünnt; Lösung 20 Min. bei 108° sterilisiert.

*Medium C* (Vorkulturmedium): 45 g Malzextrakt, mit destilliertem Wasser auf 1 l verdünnt; Lösung 20 Min. bei 120° sterilisiert.

*Medium D* (Hauptkulturmedium): 50 g Sorbit, 36 g Bernsteinsäure, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g  $\text{MgSO}_4$ , 1 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  und 10 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  werden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird mit 25-proz. Ammoniak auf pH 5,4 gestellt, mit destilliertem Wasser auf 1 l verdünnt und 20 Min. bei 108° sterilisiert.

1.1. *Isolierung des Pilzes und Verifizierung der Reinkultur durch Infektionsversuch.* Aus dem Innern eines Sklerotiums wird ein kleines Gewebestück steril entnommen und auf Malzagar (Medium A) übertragen. Es entwickelt sich ein üppiges, weisses Mycel. Üblicherweise bilden *Claviceps*-Stämme auf Malzagar oder auf Kartoffel-Glukose-Agar reichlich Konidien. Die Kulturen von *Claviceps paspali* bleiben jedoch auf diesen Nährböden völlig steril, wie dies auch ARCAMONE [8] und TONOLO [13] beobachtet haben. Das Fehlen von Konidien erschwert das Arbeiten mit solchen Kulturen erheblich [9] 14].

Als erstes bemühten wir uns daher um die Auffindung von Bedingungen, die bei *Claviceps paspali* in saprophytischer Kultur zur Konidienbildung führen. Von den zahlreichen geprüften Medien eignet sich Medium B. Dieser Agar wird zunächst mit Mycelstücken von einer Malzagar-Kultur beimpft. Um jedes Impfstück bildet sich eine kleine Kolonie von zunächst weissem, später rotbraunem Mycel. Nach 10 Tagen beginnen sich an den Hyphenspitzen Konidien abzuschnüren. Nach 20 Tagen sind genügend Konidien vorhanden, um damit eine dichte wässrige Suspension herzustellen, mit welcher 20 Schrägagar-Röhrchen des Mediums B beimpft werden können. Dabei ist *dichte* Beimpfung des Agars wichtig, da auf diesem sehr konzentrierten und sauren Nährboden das anfängliche Wachstum nur mühsam anläuft.

Diese Kulturen werden bei 24° bebrütet. Die Konidien keimen nach 24–36 Std. Nach 6 Tagen ist die Agaroberfläche von einem feinen, weissen Mycel gleichmässig überzogen, nach 10 Tagen ist eine braungraue, feingefurchte Myceldecke gebildet, welche dem Agar eng aufliegt und nur kurze Lufthyphen hat. An diesen werden Konidien abgeschnürt. Nach 12 Tagen entstehen an mehreren Stellen im Mycel Zentren, an welchen kleine Tröpfchen einer rotbraunen Flüssigkeit ausgeschieden werden. Die Tröpfchen erreichen einen Durchmesser von 1–3 mm und werden bald von sehr zahlreichen Konidien milchig-trüb. Nach 16–18 Tagen ist die Konidienbildung praktisch abgeschlossen. Eine Schrägagarkultur in einem Reagenzglas von 2 cm Durchmesser mit 12 ml Agar-Nährboden enthält ca.  $10^9$  Konidien, welche in Grösse und Form mit Honigttau-Konidien übereinstimmen, jedoch stärker vakuolisiert sind als diese.

<sup>3)</sup> Bierwürze hell, ungehopft, Trockensubstanz 17%; mit Milchsäure auf pH 4,5 eingestellt.

<sup>4)</sup> 240 g Cornsteep-Solids (STALEY) und destilliertes Wasser *ad* 1 l werden im Autoklav auf 120° erhitzt. Nach dem Abkühlen und Absetzen der Feststoffe wird der klare Extrakt dekantiert und mit Milchsäure auf pH 4,5 eingestellt.

Mit solchen Konidien führten wir im Freiland Infektionsversuche durch. Pflanzen von *Paspalum dilatatum*, die im Februar im Gewächshaus ausgesät und im Mai ins Freiland gepflanzt wurden, entwickelten sich auch im Klima von Basel sehr gut und blühten von Anfang Juli bis zum ersten Frost im Oktober. (*Paspalum distichum* dagegen begann erst Ende September spärlich zu blühen.) Zur Beimpfung besprühten wir blühende Ähren mit einer Konidien suspension. Nach 10 Tagen wurde Honigtaubildung beobachtet, und drei Wochen später konnten die ersten Sklerotien geerntet werden. Die Primär-Infektionen waren im allgemeinen nicht sehr zahlreich. Dagegen waren die Sekundär-Infektionen derart stark, dass häufig sämtliche Blüten einer Ähre Sklerotien trugen.

*Claviceps*-Stämme, die wir aus Sklerotien von *Paspalum distichum* isoliert hatten, vermochten *Paspalum dilatatum* ebensogut zu befallen wie Stämme, die von *dilatatum*-Sklerotien isoliert worden waren. Offenbar ist *Claviceps paspali* bezüglich dieser beiden doch sehr verschiedenen Wirtsarten nicht spezialisiert.

1.2. *Züchtung in Submerskultur*. Im Medium D, das sich für die Alkaloidbildung als das geeignetste erwiesen hat, keimen die Konidien nicht aus. Es ist daher notwendig, den Pilz zunächst in einem Vorkultur-Medium zu schnellem Wachstum zu bringen.

Zur Gewinnung einer *Vorkultur* wird 1 l Medium C in einem 2-l-Erlenmeyer mit ca.  $5 \times 10^8$  Konidien von einer 15 bis 18 Tage alten Agarkultur beimpft und 3 Tage bei 24° auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Es entsteht eine dichte Kultur aus feinen Mycelflocken. Die Flocken bestehen aus einem lockeren Knäuel von Hyphen und haben einen Durchmesser von 2–4 mm. Es sind keine Alkaloide nachweisbar.

Für die Gewinnung grösserer Mengen Vorkultur können in analoger Weise NEW-BRUNSWICK-Glasfermenter, welche 10 l Medium C enthalten, mit ca.  $5 \times 10^9$  Konidien beimpft und 3 Tage bei 24° unter Durchleiten von Luft (6 l/Min.) und Röhren (300 U/Min.) bebrütet werden. Die so erhaltenen Fermenterkulturen sind von gleicher Beschaffenheit wie die Schüttelkulturen.

Ein Fermenter, welcher 9 l Medium C enthält, kann auch mit 1 l einer oben beschriebenen Vorkultur beimpft werden. Nach dreitägiger Inkubation unter den oben angegebenen Bedingungen erhält man eine sekundäre Vorkultur, die ähnlich beschaffen ist wie eine primäre, jedoch etwas grössere Mycelflocken hat. Tertiäre Vorkulturen sind grobflockig und als Impfstoff nicht geeignet.

Zur Gewinnung einer *Hauptkultur* werden 100 ml Medium D in einem 500-ml-Erlenmeyer mit 10 ml einer 3 Tage alten Vorkultur beimpft und auf einer reziprok schüttelnden Maschine bei 24° bebrütet. Für die Gewinnung grösserer Mengen beimpften wir in einem Fermenter aus rostfreiem Stahl 170 l Medium D mit 17 l 3 Tage alter Vorkultur, belüfteten mit 170 l Luft pro Minute und rührten anfänglich mit 70, später mit 180 U./Min. Auf diese Weise entstehen Kulturen aus zahlreichen, gleichartigen Mycelpartikeln. Diese haben einen Durchmesser von ca. 5 mm und besitzen einen kugeligen, kompakten Kern von ca. 1 mm Durchmesser aus pseudoparenchymatischem Gewebe. Dieser Kern trägt sternartig angeordnete, ca. 2 mm lange Fortsätze aus parallel gelagerten Hyphen. Am Ende der ca. 10tägigen Kulturdauer ist das Mycel dunkelbraun und das Filtrat intensiv rotbraun gefärbt. Der pH-Wert verändert sich nur unwesentlich.

Tabelle 2. *Typischer Verlauf einer Fermentation*

Alter Tage	Myceltrockengewicht g/l	Gesamtalkaloidgehalt mg/l (Molgew. 270)	pH
0	0,7		5,4
1	1,4		
2	3,3		
3	5,6	49	5,4
4	8,2	221	
5	11,5	379	
6	15,0	462	5,4
7	17,1	540	
8	19,3	575	
9	21,0	602	
10	21,8	620	5,4

Der Verlauf einer typischen Fermentation bezüglich Mycelentwicklung, Alkaloidgehalt und pH ist in Tabelle 2 dargestellt.

Für die im folgenden Abschnitt beschriebene Isolierung der Alkaloide verwendeten wir das Kulturfiltrat eines nach obiger Beschreibung durchgeführten Hauptkultur-Ansatzes mit einem durch Monosporisolierung gewonnenen Stamm unserer portugiesischen «Säure-Rasse».

**2. Isolierung der sauren Alkaloidanteile aus dem Kulturfiltrat**, – 10 l Kulturfiltrat des neuen Stammes von *Claviceps paspali* STEVENS et HALL (pH = 5,4) mit einem kolorimetrisch [5] bestimmten Gesamtalkaloidgehalt an Ergolinen von 620 mg/l (bezogen auf ein Molgew. von 270), wovon 86,5% bzw. 536 mg/l auf nicht extrahierbare amphotere Anteile entfallen, behandelt man unter Rühren über Nacht bei Raumtemperatur mit 500 g Amberlite IR 120 (H<sup>+</sup>-Form), filtrierte den Ionenaustauscher ab und behandelt das Filtrat auf gleiche Weise nochmals mit 250 g desselben Kationenaustauschers. Die Farbreaktion nach KELLER (Ferrichlorid-Eisessig-konz. Schwefelsäure) einer zur Trockne eingedampften Probe (5 ml) der nach zweimaliger Behandlung mit dem Austauscherharz resultierenden Kulturlösung fällt negativ aus. Die beiden Ionenaustauscher-Portionen werden einzeln zweimal während je 4 Std. mit der gleichen Gewichtsmenge Wasser verrührt. Hierauf werden die Säuren vom gewaschenen Harz abgelöst, indem man jede Harz-Fraktion dreimal mit der gleichen Menge 5-proz. Ammoniak unter Rühren und Ausschluss von Kohlendioxid über Nacht bei 5–10° behandelt. Die einzelnen Extrakte werden im Rotationsverdampfer bei 13 Torr und 30° Badtemperatur auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingeeengt, die Konzentrate mit Eisessig auf pH 5,5 gestellt, eventuell geringe Mengen ausgefallenen Harzes (KELLER-Farbreaktion negativ) abfiltriert und die Filtrate im Vakuum auf 15 bis 25 ml eingedampft, wobei die Säuren in der Regel auskristallisieren. Nach dem Zufügen der gleichen Menge Methanol kocht man die Suspension kurz auf und lässt sie bei 5° einige Std. stehen. Die ausgefallenen Säuren werden abfiltriert, mit Wasser und Methanol gewaschen und bei 80° im Vakuum getrocknet.

Auf diese Weise werden aus der 1. Portion Amberlite (500 g) durch dreimalige Extraktion mit je 500 ml 5-proz. Ammoniak 2,43; 0,81 g und 0,13 g und aus der 2. Portion Amberlite (250 g) mit dreimal 250 ml 5-proz. Ammoniak noch 0,54 g; 0,14 g und Spuren, insgesamt 4,05 g (75% Ausbeute, bezogen auf den Säuregehalt von 10 l Kulturlösung) rohe, kristallisierte Säuren gewonnen.

Zur Reinigung werden die kristallisierten Produkte vereinigt, in 5-proz. alkoholischem Ammoniak gelöst, die Lösung nach Filtration mit 2N Essigsäure auf pH 5,5 gestellt, kurz auf dem Wasserbad erwärmt, das Kristallinat nach einigen Std. abfiltriert, mit Wasser und Methanol gewaschen und im Vakuum bei 80° getrocknet. 3,72 g; Smp. 238–243° (Zers.);  $[\alpha]_D = -120^\circ \pm 5^\circ$  (0,1N NaOH); Farbreaktionen nach KELLER und VAN URK [15] wie bei Lysergsäure; Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Alkohol-25-proz. Ammoniak (9:1) als Fließmittel: Doppelfleck mit gleichem R<sub>f</sub>-Wert wie Lysergsäure; der weiter wandernde Teil des Flecks fluoresziert im UV. stark blau (Lysergsäure); beide Flecke geben beim Besprühen mit VAN-URK-Reagens blaue Färbung. UV.-Spektrum: Fig. 1, Kurve 2. Auf Grund der bei 310 m $\mu$  gemessenen Extinktion und des Vergleichs mit zusammengesetzten Spektren von Lysergsäure und Dihydrolysergsäure besteht das Gemisch aus ca. 70% 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV) und 30% Lysergsäure.

$C_{16}H_{16}O_2N_2$  (268,32) Ber. C 71,6 H 6,0 N 10,4% Gef. C 71,3 H 6,1 N 10,4%

### 3. Reindarstellung und Strukturermittlung der neuen Ergolencarbonsäure IV. –

3.1. *Reinigungsversuch über das Hydrochlorid*. Das aus 270 mg roher 70-proz. 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure mit 0,1N Salzsäure gebildete Hydrochlorid wird aus Wasser, Methanol-Wasser und 0,1N Salzsäure umkristallisiert: Smp. 247–249° (Zers.);  $[\alpha]_D = -126^\circ$  (in 90-proz. Alkohol).

Die Suspension des Hydrochlorids in 5 ml Wasser versetzt man unter Umschütteln tropfenweise mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung bis alles gelöst ist. Hierauf stellt man mit Eisessig auf pH 5,5, kocht kurz auf, filtrierte nach einigen Std. die kristallisierte Aminosäure ab und wäscht sie mit Wasser und Methanol. Smp. 243–245° (Zers.);  $[\alpha]_D = -188^\circ$  (0,1N NaOH). Die UV.-spektroskopische Bestimmung ergibt einen Gehalt an  $\Delta^{8,9}$ -Säure von über 90%.

3.2. *Gewinnung der reinen 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV) nach Belichtung des Säuregemisches*. Die Lösung von 500 mg Hydrochlorid der 70-proz.  $\Delta^{8,9}$ -Säure in 50 ml 0,1N Salzsäure belichtet man unter Durchleiten von Stickstoff und Kühlen mit Leitungswasser mit einer Quarzlampe, bis eine Probe der Lösung im UV. praktisch das gleiche Spektrum wie Dihydrolysergsäure

zeigt und im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Wasser als Fließmittel der  $\Delta^{8,9}$ -Säure-Fleck ( $R_f = 0,45$ ) im UV.-Licht praktisch nicht mehr fluoresziert. Die bei der Belichtung aus der Lysergsäure gebildete, ebenfalls nicht mehr fluoreszierende Lumilysergsäure hat im Dünnschichtchromatogramm den  $R_f$ -Wert 0,55. Beide Flecke geben beim Besprühen mit VAN-URK-Reagens blaue Färbung.

Mit der bei diesem Versuch verwendeten Analysen-Quarzlampe «HANAU» beansprucht die photochemische Umwandlung der Lysergsäure 6 bis 8 Std. Nach der Belichtung wird die blaugefärbte Lösung im Vakuum auf ca. 10 ml eingeeengt, wobei die Hauptmenge (310 mg) des  $\Delta^{8,9}$ -Säure-hydrochlorids auskristallisiert, während die Lumilysergsäure in die Mutterlauge geht.

Zur Entfärbung des rohen  $\Delta^{8,9}$ -Säure-hydrochlorids wird dessen methanolische Lösung durch eine Säule von 10 g Kieselgel filtriert, der farblose Durchlauf im Vakuum eingedampft und das dünnschichtchromatographisch einheitliche, im UV. nicht mehr fluoreszierende 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-hydrochlorid aus verdünnter Salzsäure kristallisiert; 230 mg; Smp. 257–258° (Zers.);  $[\alpha]_D = -176^\circ$  ( $c = 0,4$  in 0,1N HCl); UV.-Spektrum:  $\lambda_{\max}^{0,1N \text{ HCl}} = 218/4,60$  und 278/3,78; Minimum bei 246  $\mu$ . IR.-Spektrum: Fig. 3. NMR.-Spektrum: Fig. 4.

$C_{16}H_{17}O_2N_2Cl$	Ber. C 63,1	H 5,6	O 10,5	N 9,2	Cl 11,6%
(304,78)	Gef. „ 63,0	„ 5,5	„ 10,8	„ 9,1	„ 11,6%

Die reine 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV) wird aus dem Hydrochlorid erhalten, indem man dieses in 0,1N Salzsäure löst, die Lösung nach der Zugabe von schwefliger Säure mit gesättigter Natriumacetatlösung auf pH 5,5 bis 6 stellt, kurz erwärmt und nach einigen Std. die auskristallisierte Säure abfiltriert, mit Wasser und Methanol wäscht und im Vakuum bei 80° trocknet. Smp. 245–247° (Zers.);  $[\alpha]_D = -208^\circ$  ( $c = 0,4$  in 0,1N NaOH); UV.-Spektrum in Methanol-5-proz. Ammoniak: Fig. 1, Kurve 3. IR.-Spektrum: Fig. 2.

3.3. *Umlagerung der  $\Delta^{8,9}$ -Säure IV in Lysergsäure (I)*. Die Lösung von 500 mg 70-proz. 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure in 10 ml 1N Natronlauge wird auf dem Wasserbad 30 Min. erwärmt, die heisse Lösung mit Aktivkohle behandelt und das Filtrat mit verdünnter Salzsäure und Eisessig auf pH 5,5 gestellt. Nach einigen Std. filtriert man die auskristallisierte Lysergsäure ab, wäscht sie mit Wasser und Methanol und trocknet bei 80° im Vakuum. Smp. 245–247° (Zers.);  $[\alpha]_D = +97^\circ$  (0,1N NaOH); 410 mg (80%). UV.-Spektrum: Fig. 1, Kurve 1. IR.-Spektrum: deckungsgleich mit dem Spektrum authentischer Lysergsäure; charakteristische Banden bei 3350, 3200 (OH, NH), 2400 breit ( $\equiv NH$ ) und 1595  $cm^{-1}$  (Nujol).

$C_{16}H_{16}O_2N_2$	Ber. C 71,6	H 6,0	O 11,9	N 10,4%
(268,32)	Gef. „ 71,9	„ 6,1	„ 11,9	„ 10,6%

Die bei der Umlagerung der  $\Delta^{8,9}$ -Säure gebildete Lysergsäure wurde zudem als Hydrochlorid und als Methyl ester identifiziert:

*Hydrochlorid*: Aus Wasser umkristallisiert, Smp. 213–216° (Zers.);  $[\alpha]_D = +122^\circ$  (0,1N HCl). IR.-Spektrum:  $\nu_{\max}^{Nujol} = 3350$  breit, 3200 (NH, OH), 2500–2700 ( $\equiv NH$ ) 1725 (COOH) (Nujol). NMR.-Spektrum: (10-proz. Lösung in Deuteriodimethylsulfoxid); charakteristische Signale bei  $\delta$  (ppm) = 11,10 (1H); 7,0–7,35 komplex (4H); 6,67 (1H); 3,2–4,5 komplex (5H); 3,08 (3H). Nach Smp., UV.- und IR.-Spektrum identisch mit Lysergsäure-hydrochlorid.

$C_{16}H_{17}O_2N_2Cl$	Ber. C 63,1	H 5,6	O 10,5	N 9,2	Cl 11,6%
(304,78)	Gef. „ 62,9	„ 5,9	„ 10,4	„ 9,2	„ 11,3%

*Methylester*: Die Behandlung der umgelagerten Säure mit Methanol-Salzsäuregas bei 0° liefert nach dem Eindampfen der Reaktionslösung und der Aufarbeitung des Rückstandes durch Ausschüteln mit Methylchlorid und Natriumhydrogencarbonatlösung den aus Benzol kristallisierenden Methylester: Smp. 100–102° (Solvat); lösungsmittelfrei aus Äther-Petroläther, Smp. 166–167° (Zers.);  $[\alpha]_D = +85^\circ$  (Chloroform). IR.-Spektrum:  $\nu_{\max}^{CH_2Cl_2} = 3450$  (NH), 1728 (COOCH<sub>3</sub>). Nach Misch-Smp., UV.- und IR.-Spektrum identisch mit Lysergsäure-methylester.

*Reaktionskinetik der Umlagerung der  $\Delta^{8,9}$ -Säure IV in Lysergsäure*: Die Umlagerung der  $\Delta^{8,9}$ -Säure in 0,1N Natronlauge wurde UV.-spektrophotometrisch bei 40°, 60° und 80° verfolgt (Tab. 3). Aus der Ableitung der optischen Dichte nach der Zeit konnte die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ( $k_1$ ) und die dazugehörige Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) berechnet werden. Die Reaktionskinetik ist 1. Ordnung.

Tabelle 3. *Kinetik der Umlagerung von Säure IV in Lysergsäure*

Temperatur °C	20	40	60	80	100
$k_1 \cdot 10^3$ (Min. <sup>-1</sup> )	0,568	2,72	12,8	63,0	310,0
$t_{1/2}$ (Min.)	1220 (extrapol.)	255	54	11	2 (extrapol.)

3.4. *Versuche zur Veresterung der 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV)*. — 3.4.1. *Veresterung mit Diazomethan*. Die Suspension von 100 mg fein pulverisierter 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (90-proz.) in 3 ml Methanol wird nach der Zugabe überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung 6 Std. bei 0° bis 5° gerührt. Die entstandene Lösung wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther aufgenommen, die Ätherlösung mit Wasser ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Methylester kristallisiert aus Benzol; 70 mg; Smp. 102–105° (Schäumen), nach dem Trocknen im Vakuum bei 80° Smp. 156–158° (Zers.); Misch-Smp. mit Lysergsäure-methylester nicht erniedrigt; UV.-Spektrum wie bei Lysergsäure, vgl. Fig. 1, Kurve 1.

Selbst bei schonendster Aufarbeitung wies das rohe Reaktionsprodukt bereits das Spektrum der Lysergsäure auf.

3.4.2. *Veresterung mit Methanol und Dicyclohexylcarbodiimid*. Die Lösung von 305 mg 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-hydrochlorid (90-proz.) in 30 ml Methanol versetzt man bei 0° mit 230 mg Dicyclohexylcarbodiimid (1,1 Äquivalente) und hält das Gemisch unter Rühren bei 0° bis 5°. Nach 2 Std. zeigt das UV.-Spektrum einer Probe der Lösung gegenüber dem eingesetzten Ausgangsmaterial eine Zunahme des Lysergsäureanteils; nach Dünnschichtchromatogramm ist die Veresterung nach 1 Std. praktisch vollständig. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther aufgenommen, die Ätherlösung mit 10-proz. Weinsäurelösung extrahiert, der weinsaure Auszug mit gesättigter Pottasche und Eis alkalisch gestellt, mit Äther extrahiert, die Ätherlösung mit Wasser ausgeschüttelt, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der aus Benzol kristallisierte Ester besteht nach UV.-Spektrum aus einem Gemisch gleicher Teile Lysergsäure-methylester und 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-methylester.

Bei Versuchen, das Ester-Gemisch durch Chromatographie an Aluminiumoxid oder an Kieselgel und durch fraktionierte Kristallisation in die Komponenten zu zerlegen, wurde nur praktisch reiner Lysergsäure-methylester erhalten.

3.4.3. *Veresterung mit Methanol und Chlorwasserstoff*. Die Lösung von 305 mg 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-hydrochlorid (90-proz.) in 15 ml Methanol wird unter äusserer Eiskühlung mit Chlorwasserstoff gesättigt, 1 Std. bei 0° gehalten und hierauf im Vakuum bei 20° Badtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird mit eisgekühlter Natriumhydrogencarbonatlösung und Methylenchlorid aufgenommen, die organische Phase abgetrennt, mit Wasser gut gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum schonend abgedampft. Das Rohprodukt wird ohne Erwärmen in wenig Benzol gelöst und der Methylester nach der Kristallisation im Vakuum bei 20° getrocknet. 220 mg; UV.-spektroskopisch bestimmter Gehalt an 8,9-ungesättigter Verbindung ca. 80%. Im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel und mit wassergesättigtem Essigester als Fließmittel 2 Flecke: Hauptfleck:  $\Delta^{8,9}$ -Säure-methylester,  $R_f <$  Lysergsäure-methylester, fluoresziert schwach im UV.; Nebenfleck:  $R_f$  wie Lysergsäure-methylester, stark blaue Fluoreszenz im UV. Beide Flecke geben nach dem Besprühen mit VAN-URK-Reagens blaue Färbung. IR.-Spektrum:  $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$  = 3420 (NH), 1708 (C=C-COOCH<sub>3</sub>), 1662 ( $\Delta^{8,9}$ ).

Der auf diese Weise gewonnene, ca. 80-proz. Methylester von IV wird ohne weitere Reinigung zur Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid verwendet, vgl. 3.5.

3.4.4. *Veresterung mit Methanol und konz. Salzsäure*. — 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-methylester-hydrochlorid. Das Gemisch von 305 mg reinem 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-hydrochlorid, 30 ml Methanol und 3 ml konz. Salzsäure wird 5 Std. rückfliessend gekocht und die nur schwach gefärbte Lösung im Vakuum abgedampft. Zur Abtrennung unveresterter Anteile wird der Rückstand in Chloroform-5% Methanol-Lösung durch eine Säule von 10 g Kieselgel filtriert, der Durchlauf im Vakuum eingedampft und das Ester-hydrochlorid aus Methanol umkristallisiert; 200 mg; Smp. 218–220° (Zers.);  $[\alpha]_D = -166^\circ$  ( $c = 0,45$  in Wasser). UV.-Spektrum

wie das von IV-Hydrochlorid (in Methanol). IR.-Spektrum:  $\nu_{\max}^{\text{Nujol}} = 3400$  (NH), 2500 breit ( $\equiv \text{NH}$ ), 1708 (C=C-COOCH<sub>3</sub>), 1660 ( $\Delta^{8,9}$ ).

C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> Cl	Ber. C 64,1	H 6,0	O 10,1	N 8,8	Cl 11,0%
(318,80)	Gef. „ 63,6	„ 6,1	„ 10,3	„ 8,6	„ 11,1%

3.5. *Reduktion des 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-methylesters mit Lithiumaluminiumhydrid. – Elymoclavin (V) und Lysergol (VI).* Zur vorgelegten, auf 0° gekühlten Lösung von 400 mg Lithiumaluminiumhydrid in 20 ml absolutem Tetrahydrofuran wird unter Rühren eine Lösung von 400 mg 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure-methylester (ca. 80-proz., vgl. 3.4.3) in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran getropft. Nach der Zugabe wird das Gemisch 5 Std. bei 0° bis 5° gehalten, hierauf das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid mit 1 ml Wasser zersetzt, 5 g Kaliumcarbonat zugefügt und nach 30 Min. abfiltriert. Der Niederschlag wird mit Tetrahydrofuran gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingedampft. Der Rückstand kristallisiert aus Methanol: 255 mg; Smp. 233–235° (Zers.); nach Dünnschichtchromatogramm auf Aluminiumoxid mit Chloroform-Benzol-Eisessig (45:45:10) als Fließmittel Gemisch von Elymoclavin (Hauptfleck; Rf = 0,4; keine Fluoreszenz im UV.) und Lysergol (Nebenfleck; Rf = 0,3; stark blaue Fluoreszenz im UV.); nach dem Besprühen mit VAN-URK-Reagens geben beide Flecke blaue Färbung. Durch fraktionierte Kristallisation aus Methanol, Aceton-Methanol und Alkohol-Wasser wird dünn-schichtchromatographisch einheitliches Elymoclavin erhalten; 165 mg; Smp. 245–247° (Zers.); Misch-Smp. mit authentischem Elymoclavin [16] nicht, mit Lysergol stark erniedrigt.  $[\alpha]_D = -150^\circ$  (in Pyridin). UV.-Spektrum:  $\lambda_{\max}^{\text{Methanol}} / \log \epsilon = 223/4,48; 281/3,89$  und  $292/3,81$ ; Minima bei 248 und 289 m $\mu$  [5]. IR.-Spektrum (Nujol) deckungsgleich mit demjenigen von authentischem Elymoclavin [17].

#### ZUSAMMENFASSUNG

Aus *Paspalum*-Mutterkorn, das von zahlreichen, über die ganze Erde verteilten Fundorten beschafft worden war, konnten mehrere Hundert Stämme isoliert und unter geeigneten Standardbedingungen in Submerskultur gezüchtet werden. Auf Grund der Zusammensetzung des von den untersuchten Stämmen produzierten Alkaloidgemisches, liessen sich drei «chemische Rassen» definieren. Zur ersten, weitverbreiteten Rasse gehören 98% aller untersuchten Stämme. Ihr sind auch die bereits bekannten *Claviceps-paspali*-Stämme von CHAIN, TONOLO *et al.* [7] [8] und von GRÖGER *et al.* [9] zuzuordnen. Als Hauptalkaloide finden sich hier das Amid und das Methylcarbinolamid der Lysergsäure (IIa, b) und der Isolysergsäure (IIIa, b). Bei der zweiten, in Argentinien gefundenen, neuen Rasse bestehen 75 bis 80% aller Alkaloide aus Ergobasin IIc und Ergobasinin IIIc. Die dritte, ebenfalls neue chemische Rasse, die bisher nur in Portugal gefunden wurde, bildet ein Gemisch fast ausschliesslich amphoterer Produkte, das neben Lysergsäure (I) zu über 70% aus der bisher unbekanntem 6-Methyl- $\Delta^{8,9}$ -ergolen-8-carbonsäure (IV) besteht.

Die sauren Alkaloidanteile der dritten Rasse liessen sich aus dem Kulturfiltrat durch Verwendung stark saurer Ionenaustauscher isolieren. Die präparative Reindarstellung der neuen Aminosäure IV gelang, nach der photochemischen Überführung der im Rohkristalliat vorhandenen Lysergsäure in Lumilysergsäure, durch fraktionierte Kristallisation des Hydrochlorids. Die Strukturermittlung von IV beruht neben spektralanalytischen Untersuchungen auf der Umlagerung in Lysergsäure (I) durch milde Alkalieinwirkung und auf der Bildung von Elymoclavin (V) bei der Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion des IV-Methylesters.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien  
SANDOZ A.G., Basel

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 59. Mitteilung: P. A. STADLER, A. J. FREY, F. TROXLER & A. HOFMANN, *Helv.* **47**, 756 (1964).  
[2] H. KOBEL, R. BRUNNER & A. BRACK, *Experientia* **18**, 140 (1962).  
[3] M. ABE, *Ann. Rep. Takeda Res. Lab.* **10**, 73 (1951).  
[4] Vgl. z.B. F. WEYGAND & H. G. FLOSS, *Angew. Chem.* **75**, 783 (1963).  
[5] A. STOLL, A. BRACK, H. KOBEL, A. HOFMANN & R. BRUNNER, *Helv.* **37**, 1815 (1954).  
[6] A. HOFMANN, R. BRUNNER, H. KOBEL & A. BRACK, *Helv.* **40**, 1358 (1957).  
[7] F. ARCAMONE, C. BONINO, E. B. CHAIN, A. FERRETTI, P. PENNELLA, A. TONOLO & L. VERO, *Nature* **187**, 238 (1960).  
[8] F. ARCAMONE, E. B. CHAIN, A. FERRETTI, A. MINGHETTI, P. PENNELLA, A. TONOLO & L. VERO, *Proc. Roy. Soc. Ser. B* **155**, 26 (1961).  
[9] D. GRÖGER & V. E. TYLER, jr., *Lloydia* **26**, 174 (1963).  
[10] A. STOLL & W. SCHLIENTZ, *Helv.* **38**, 585 (1955).  
[11] A. STOLL, T. PETRZILKA, J. RUTSCHMANN, A. HOFMANN & H. H. GÜNTHARD, *Helv.* **37**, 2039 (1954); H. G. LEEMANN & S. FABBRI, *ibid.* **42**, 2696 (1959); P. A. STADLER & A. HOFMANN, *ibid.* **45**, 2005 (1962).  
[12] S. YAMATODANI & M. ABE, *Bull. agric. chem. Soc. Japan* **20**, 95 (1956); **21**, 200 (1957); E. SCHREIER, *Helv.* **41**, 1984 (1958).  
[13] A. TONOLO, T. SCOTTI & L. VERO, *Sci. Repts. Ist. Super. Sanità* **7**, 404 (1961).  
[14] L. R. PACIFICI, W. J. KELLEHER & A. E. SCHWARTING, *Lloydia* **26**, 161 (1963).  
[15] A. TREIBS & E. HERRMANN, *Z. physiol. Chem.* **299**, 168 (1955); H. VON DOBENECK & H. PRIETZEL, *ibid.* **299**, 214 (1955).  
[16] M. ABE, T. YAMANO, Y. KOZU & M. KUSUMOTO, *J. agr. chem. Soc. Japan* **25**, 458 (1952); M. ABE & S. YAMATODANI, *ibid.* **28**, 501 (1954); **29**, 364 (1955); S. YAMATODANI & M. ABE, *Bull. agr. chem. Soc. Japan* **19**, 94 (1955).  
[17] A. HOFMANN, *Planta med.* **9**, 354 (1961).

---

## 116. Über die isomeren Dikobaltoctacarbonyle [1]<sup>1)</sup>

### II. Die Enthalpie und Entropiedifferenz der beiden isomeren Dikobaltoctacarbonyle

von K. Noack

(6. IV. 64)

**Einleitung.** - Kürzlich konnte auf zwei Wegen gezeigt werden, dass Dikobaltoctacarbonyl in Lösung aus einem Gemisch zweier Isomeren besteht [1] [2]. Aus den Infrarotspektren konnte geschlossen werden, dass das eine der Isomeren (I) die aus der Kristallstrukturanalyse bekannte Molekelstruktur besitzt [3], d. h. die beiden Kobaltatome sind durch zwei Carbonylbrücken, welche nicht in einer Ebene liegen, verbunden. Diese Form ist die energieärmere und daher bei tiefer Temperatur bevorzugte. Die andere Form (II) besitzt keine Carbonylbrücken, sondern die beiden Kobaltatome sind durch eine direkte Metall-Metall-Bindung verbunden. Jedes Kobaltatom trägt vier endständige Carbonylgruppen.

---

<sup>1)</sup> Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1067.