

268. Zur Rolle des Paliclavins in der Biosynthese der Ergot-Alkaloide

81. Mitteilung über Mutterkornalkaloide [1]

von **Werner Acklin, Theo Fehr und Paul Albert Stadler**

Sandoz AG., Pharma Departement, Chemische Forschung, Basel

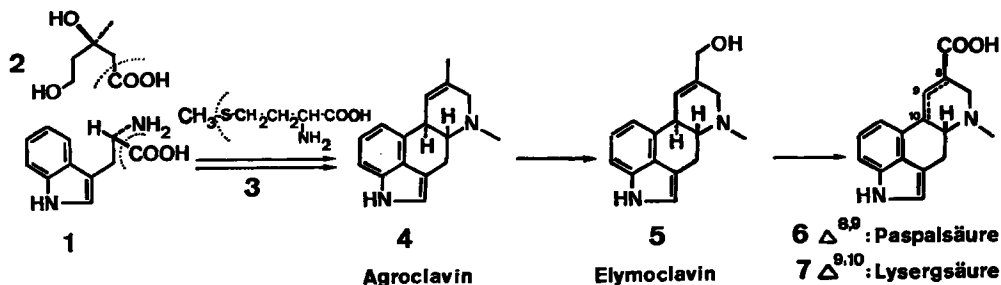
Herrn Dr. *A. Hofmann* zum 70. Geburtstag gewidmet

(8. X. 75)

The Rôle of Paliclavine in the Biosynthesis of Ergot Alkaloids. *Summary.* Feeding of $[N-^{14}CH_3]$ -paliclavine to submersed cultures of *Claviceps paspali* Stevens et Hall and to surface cultures of the ergot fungus from *Pennisetum typhoideum* Rich. has shown that paliclavine is not involved in the biosynthesis of either the ergolene carboxylic acids or the tri- and tetracyclic clavines.

Der biosynthetische Aufbau des tetracyclischen Ergolingerüsts der Ergot-Alkaloide aus L-Tryptophan (1), (3*R*)-Mevalonsäure (2) und der Methylgruppe von Methionin (3) ist in seinen Grundzügen bekannt [2] (vgl. *Schema 1*).

Schema 1

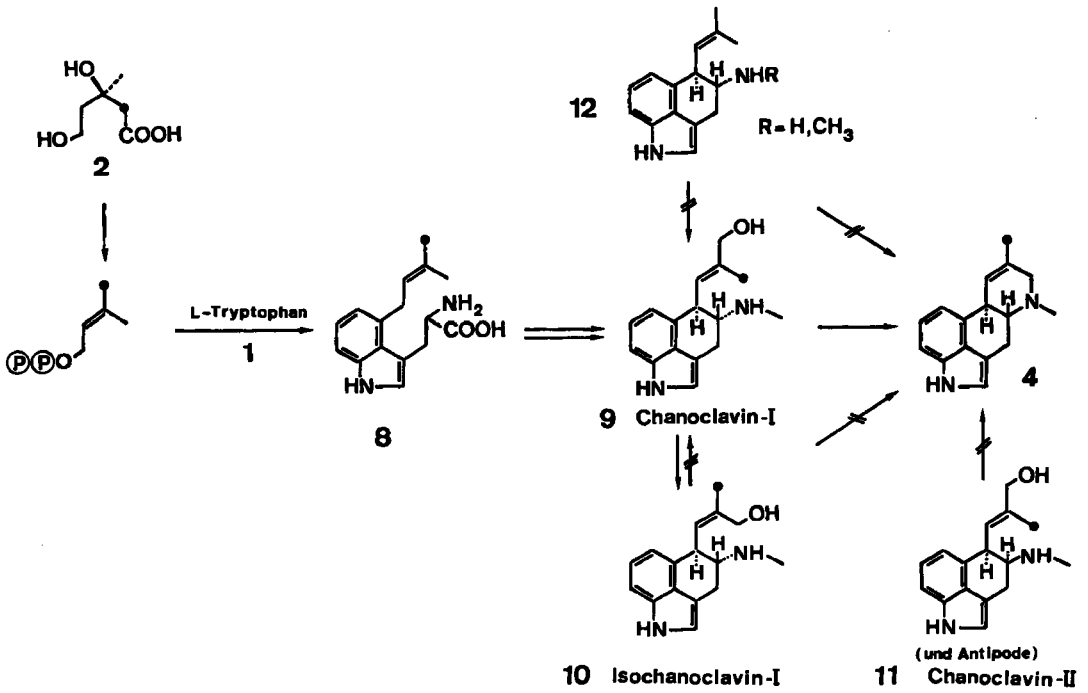


Die biosynthetische Sequenz verläuft über die Zwischenstufen des Dimethylallyl-tryptophans (8) [3] und des Chanoclavins-I (9) [4–6] und enthält überraschenderweise zwei *cis-trans*-Isomerisierungen der allylischen Doppelbindung [6] [7]. Die diesbezüglichen Befunde sind im *Schema 2* zusammengefasst (vgl. [2]).

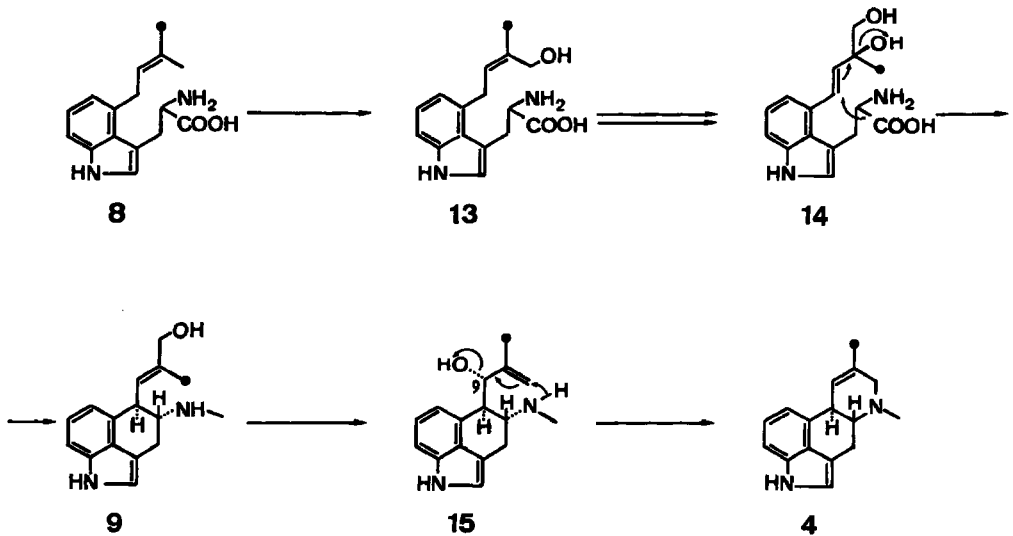
Wie erst kürzlich eindeutig nachgewiesen wurde [8], erfolgt der erste Isomerisierungsschritt beim Übergang 8 → 9. Zur mechanistischen Deutung dieses ungewöhnlichen Biosyntheseweges wurde seinerzeit [9] ein hypothetisches Schema (vgl. *Schema 3*) vorgeschlagen, in welchem beide Isomerisierungsschritte auf Allylumlagerungen zurückgeführt wurden.

Die im *Schema 3* postulierte Zwischenstufe 15 gewann unerwartet an Aktualität durch die kürzlich beschriebene [10] Isolierung und Konstitutionsaufklärung von Paliclavin (17), dem 9-Epimeren von 15. Die Tatsache, dass mit der Isolierung von Paliclavin (17) das Auftreten eines Allylumlagerungsproduktes von Chanoclavin-I

Schema 2



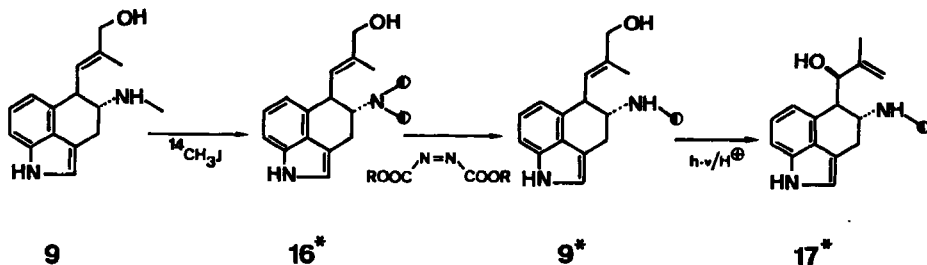
Schema 3



(9) in einer *Claviceps*-Kultur nachgewiesen worden ist, bewog uns, seine Rolle in der Biogenese der tetracyclischen Clavine zu überprüfen, obwohl einige neuere Befunde [2] nur schwer mit der in Schema 3 formulierten Einstufung von Paliclavin (17) oder 9-epi-Paliclavin (15) als unmittelbare Vorläufer von Agroclavin (4) in Einklang zu bringen sind.

Erleichtert wurde dieser Entschluss durch die leichte Zugänglichkeit eines radioaktiv markierten Paliclavins (**17***) (vgl. vorangehende Arbeit [1] und Schema 4).

Schema 4



Methylierung von Chanoclavin-I (**9**) mit $^{14}\text{CH}_3\text{J}$ ergab $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]\text{-N-Methylchanoclavin-I}$ (**16***). Dieses liess sich direkt, d.h. ohne Schutz der allylischen Hydroxylgruppe, mit Azodicarbonsäure-diäthylester in guter Ausbeute zu $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]\text{-Chanoclavin-I}$ (**9***) desmethylieren. Die radiochemische Ausbeute bezogen auf Methyljodid betrug ca. 25% unter Annahme eines nicht diskriminierenden Verlaufes der Desmethylierung. Säurekatalysierte Photoisomerisierung von $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]\text{-Chanoclavin-I}$ (**9***) lieferte neben 10% Edukt 56% $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]\text{-Paliclavin}$ (**17***).

Bei der Planung der Einbauversuche war zu berücksichtigen, dass die aus Gründen der synthetisch einfachen Realisierbarkeit gewählte Markierung der N-Methylgruppe in **17** biologisch nicht unbedingt stabil ist (Möglichkeit der biologischen Entmethylierung und Einbau über die nicht mehr markierte Desmethylverbindung). Es ist aber schon lange bekannt [9], dass weder N-Desmethyl-agroclavin noch N-Desmethyl-elymoclavin als Vorläufer verwertet werden. In jüngster Zeit wurde gezeigt [11], dass auch N-Desmethylchanoclavin-I nicht eingebaut wird.

Eine sichere Kontrollmöglichkeit diesbezüglich ergab sich aus dem parallelen Einbau von $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]\text{-Paliclavin}$ (**17***) und $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]\text{-Chanoclavin-I}$ (**9***) genau gleicher spezifischer Aktivität unter identischen Bedingungen. Zur Verfügung standen Submers-Kulturen von *Claviceps paspali* M 50 [12], die als Hauptalkaloid ca. 3 g/l Paspalsäure (**6**) produzieren, sowie Oberflächen-Kulturen des *Pennisetum*-Stammes J 13 [13], welche als Hauptalkaloide je ca. 200–300 mg/l Agroclavin (**4**) und Elymoclavin (**5**) produzieren. Diese Unterschiede in der zu erwartenden endogenen Verdünnung wurden bei der Wahl der Menge Vorläufer berücksichtigt (vgl. exper. Teil). Die Resultate dieser Einbau-Versuche sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Die Einbauraten (ER.) sind auf den jeweils kolorimetrisch bestimmten Alkaloidgehalt der Kontrollkulturen normiert. Sie ergeben daher für den Chanoclavin-Einbau minimale, für den Paliclavin-Einbau aber maximale Werte im Falle des *Pennisetum*-Stammes (Tab. 2), da die effektiv isolierten Alkaloid-Mengen im Falle von Chanoclavin-I (**9***) über, im Falle von Paliclavin (**17***) aber deutlich unter dem Mittelwert der Kontrolle lagen. Am *Paspalum*-Stamm konnte kein Unterschied in der Alkaloidproduktion festgestellt werden.

Den Resultaten ist folgendes zu entnehmen: 1. $[\text{N-}^{14}\text{CH}_3]\text{-Chanoclavin-I}$ (**9***) wird sowohl in Paspalsäure als auch in Clavine mit Raten eingebaut, die z.T. deut-

Tabelle 1. *Einbauversuche am Paspalum-Stamm* (je 100 ml Kultur)

Vorläufer	ipm total appliziert	Säure ^{a)} ipm/mg	% spez. ER. ^{b)}	% ER. ^{b) c)}
9*	1,1 · 10 ⁷	2,4 · 10 ³	0,22	3,2
17*	1,1 · 10 ⁷	26	2 · 10 ⁻³	3 · 10 ⁻²
9*	2,2 · 10 ⁷	7,3 · 10 ³	0,68	7,2
17*	2,2 · 10 ⁷	36	4 · 10 ⁻³	4 · 10 ⁻²

a) Isoliert und gemessen als Lysergsäure (7).

b) ER. = Einbaurate, spez. ER. = spezifische Einbaurate.

c) Berechnet aus kolorimetrisch bestimmtem Gehalt der Kontrollkulturen.

Tabelle 2. *Einbauversuche am Pennisetum-Stamm* (je 4mal 100 ml Kultur)

Vorläufer	ipm total appliziert	Agroclavin (4)		Elymoclavin (5)		% ER. ^{a)}
		ipm/mg	% spez. ER.	ipm/mg	% spez. ER.	
9*	1,1 · 10 ⁷	3,2 · 10 ⁴	2,9	1,2 · 10 ⁴	1,1	20
17*	1,1 · 10 ⁷	14	6,3 · 10 ⁻⁴	7	3,2 · 10 ⁻⁴	10 ⁻²

a) Berechnet aus kolorimetrisch bestimmtem Durchschnittsgehalt von 5 Kontrollkulturen.

lich höher liegen als die unter vergleichbaren Bedingungen bisher gefundenen [6] [9]. Damit ist bestätigt, dass Chanoclavin-I (9) nicht über die N-Desmethylverbindung eingebaut wird [11]. 2. [N-¹⁴CH₃]-Paliclavin (17*) wird nicht verwertet.

Nachdem Paliclavin (17) als Vorläufer der tetracyclischen Clavine und der Paspalsäure ausscheidet, bleibt die Frage nach seiner biogenetischen Herkunft und seiner eventuellen Beziehung zu seinen Strukturisomeren, den stereoisomeren Chanoclavinen offen. Im speziellen untersuchten wir deshalb im folgenden, ob 1. Paliclavin (17) aus Chanoclavin-I (9), 2. Isochanoclavin-I (10) aus Paliclavin (17) und 3. Isochanoclavin-I (10) aus Chanoclavin-I (9) entsteht.

Zur Kontrolle der Methodik (vgl. exper. Teil) wurde auch der Übergang 17 → 9 geprüft, der aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse *a priori* auszuschliessen ist («Blindwert-Bestimmung»). Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. *Isolierung der Nebenalkaloide*

Vorläufer ^{a)}	Stamm	isolierte Ver- bindung	End- Aktivität ipm/mg	f ^{b)}	(max.) spez. Aktivität unverd. ipm/mg
17*	<i>Paspalum</i>	10	< 3	50	(< 150)
17*	<i>Paspalum</i>	9	39	6	(240)
17*	<i>Pennisetum</i>	10	< 10	20	(< 200)
9*	<i>Pennisetum</i>	10	58	200	1,2 · 10 ⁴
9*	<i>Paspalum</i>	17	17	10	(170)
9*	<i>Pennisetum</i>	17	25	ca. 10	(ca. 250)

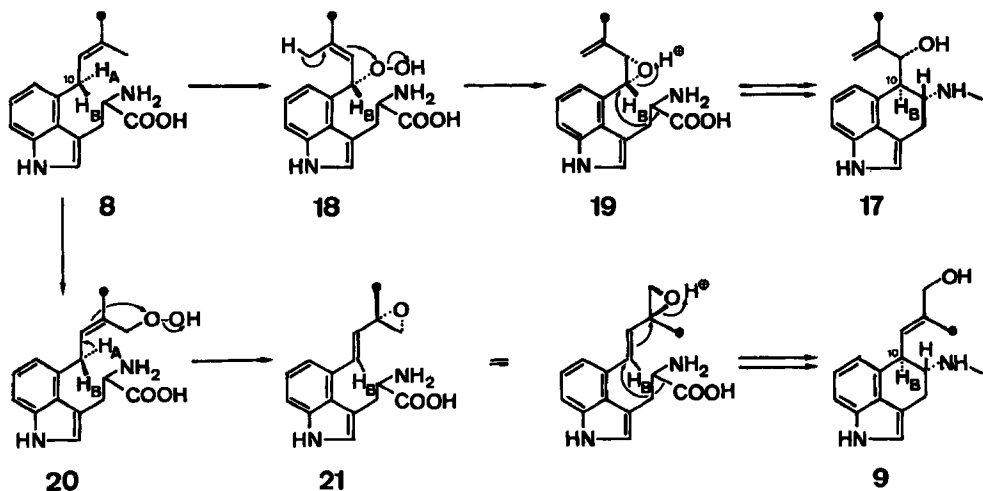
a) Spez. Aktivität = 1,1 · 10⁶ ipm/mg.

b) f = Verdünnungsfaktor bei der Reinigung.

Da bei Nebenprodukten einer biosynthetischen Kette die totalen Einbausraten keine Vergleichsbasis bilden, können nur die spezifischen Aktivitäten als Kriterium herangezogen werden. Danach wird Paliclavin (**17**) weder in **9** und/oder **10** umgewandelt, noch entsteht es aus **9**. Einzig der Einbau von Chanoclovin-I (**9**) in Isochanoclovin-I (**10**) steht fest.

Die vorliegenden Befunde schliessen eine zentrale Rolle von Paliclavin (**17**) in der Biosynthese der Ergot-Alkaloide aus. Auch als Vorläufer der Chanoclovin-Isomeren scheidet **17** aus. Da es weder aus Chanoclovin-I (**9**) noch aus Isochanoclovin-I (**10**) entstehen kann, dürfte im biologischen Aufbau der Ergot-Alkaloide die Abzweigung zum Paliclavin (**17**) vor der Bildung von Ring C stattfinden. Eine Hypothese zur Entstehung von **17** ist im *Schema 5* wiedergegeben.

Schema 5



Die Formulierung des Reaktionsweges über Hydroperoxide (vgl. **18** und **20**) erfolgt in Anlehnung an [8]. Das Epoxid **21** ist schon von *Thomas* [2a] als hypothetische Zwischenstufe für die Biogenese von **9** vorgeschlagen worden. Der Reaktionsfolge in *Schema 5* liegen zwei nicht bewiesene, aber nachprüfbar Annahmen zugrunde: 1. Das C(10)-Wasserstoffatom (H_B) in **17** stammt wie bei den übrigen Clavinen aus dem 5-pro-S-Wasserstoffatom der Mevalonsäure [14], 2. die C-Methylgruppe in **17** aus dem C(2) der Mevalonsäure. Unter diesen Voraussetzungen lässt sich der Weg zu Paliclavin (**17**) als frühe Sackgasse auf der an Abzweigungen reichen biosynthetischen Strasse zu den tetracyclischen Ergot-Alkaloiden verstehen.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Smp. in offenen Kapillaren auf Apparat nach *Tottoli*, korrigiert. Dünnschichtchromatographie (DC.) auf Kieselgel Fertigplatten oder Kieselgel Alufolien mit Fluoreszenzindikator 254/366 der Firma *Woelm*, Eschwege. DC.-Systeme: A = Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak (25proz. *Merck*) 80:18:2; B = Chloroform/Methanol 95:5, ges. mit NH_3 -Gas; C = Chloroform/Methanol 2:1 plus 2% 2N Ammoniak-Lösung. Entwicklung der Flecken mit UV-Fluoreszenz und/oder mit *van Urk*-Reagens und Nachbehandlung mit nitrosen Gasen oder UV-

Licht (254 nm). Präparative Schichtchromatographie (präp. SC.) auf präp. SC.-Fertigplatten Kieselgel 60F-254, 2 mm, der Firma *Merck*. Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (*Merck*), 0,063–0,2 mm.

Übliche Aufarbeitung bedeutet: Giessen auf 10–20 ml Wasser, extrahieren mit 3mal 50 ml Methylchlorid oder Chloroform/2-Propanol 7:3 aus Wasser, trocknen mit $MgSO_4$, eindampfen im Rotationsverdampfer (RV.) und trocknen im Hochvakuum (HV.).

Radioaktivitätsmessungen: Spezifische Aktivität in ipm/mg gemessen an Proben von ca. 1 mg (Einwaage mit *Cahn*-Elektrobalance) mit *Nuclear Chicago Scintillation Mark-I*-Apparat. Korrigiert für Löschung und Nulleffekt (interner Standard). Messausbeute ca. 75%. Fehler der Einzelmessung unter 5%. Zur Messmethodik vgl. [15].

% Einbaurate = $100 \times$ total isolierte Aktivität/total applizierte Aktivität, im Text als % ER. abgekürzt, entspricht einer radiochemischen Ausbeute im Einbauversuch.

% spezifische Einbaurate = $100 \times$ spez. Aktivität des Produktes/spez. Aktivität des Vorläufers, im Text als % spez. ER. abgekürzt, entspricht der inversen biologischen (endogenen) Verdünnung.

[$N-^{14}CH_3$]-*N*-Methyl-*chanoclavin-I* (16*). 105 mg (0,41 mmol) *Chanoclavin-I* (9) gelöst in 2 ml absolutem DMF, versetzt mit 160 mg K_2CO_3 und mit Magnetrührer bei RT. gerührt. Dazu 58 mg (0,408 mmol) $^{14}CH_3J$ (2 mCi, spez. Aktivität 4,9 mCi/mmol), mit 6mal 0,5 ml DMF direkt aus der gekühlten Ampulle ins Reaktionsgefäß pipettiert. Nach 4 Std. Rühren bei RT., Zugabe von 5,5 mg (0,04 mmol) inaktivem Methyljodid in 0,09 ml Dimethoxyäthan. Nach insgesamt $5\frac{1}{2}$ Std. gab übliche Aufarbeitung 123 mg Rohprodukt. DC.: ca. 95% *N*-Methyl-*chanoclavin* (16) und 5% *Chanoclavin* (9); Rohprodukt verdünnt mit 111 mg (0,41 mmol) inaktivem *N*-Methyl-*chanoclavin-I* (16) und unkristallisiert aus Aceton ergab farblose Kristalle ($7,5 \cdot 10^6$ ipm/mg; radiochemische Ausbeute ca. 50%). Man vereinigte Kristallisat und Mutterlauge und verwendete den gut getrockneten Schaum (219 mg 16*) direkt für die Desmethylierung.

[$N-^{14}CH_3$]-*Chanoclavin-I* (9*). 219 mg (0,82 mmol) [$N-^{14}CH_3$]-*N*-Methyl-*chanoclavin* (16*) gelöst in 8 ml abs. THF, versetzt mit 170 mg (0,98 mmol) Azodicarbonsäure-diäthylester in 2 ml THF und während 16 Std. bei 17° gerührt. Nach Zugabe von 10 ml 4*N* Weinsäure, kurzem Umrühren, Giessen auf 10 ml Wasser und üblicher Aufarbeitung isolierte man 221 mg (100%) Basen, laut DC. ca. 80proz. an *Chanoclavin-I* (9). Nach Entfärben mit Norit in Methanol und verdünnen mit 220 mg inaktivem Material, ergab mehrmalige Kristallisation aus Methanol 99 mg reinstes [$N-^{14}CH_3$]-*Chanoclavin-I* (9*) ($1,10 \pm 0,05 \cdot 10^6$ ipm/mg¹), ca. 0,67 $\mu Ci/mg$ entsprechend), das für die Einbauversuche verwendet wurde. Aus den Mutterlaugen konnten insgesamt 285 mg *Chanoclavin-I* (9*) der gleichen spez. Aktivität gewonnen werden. Radiochemische Ausbeute also 57%, unter Annahme eines nichtdiskriminierenden Verlaufs der Desmethylierung.

[$N-^{14}CH_3$]-*Paliclavin* (17*). 285 mg [$N-^{14}CH_3$]-*Chanoclavin-I* (9*) gelöst in Mischung von 35 ml Dioxan, 40 ml Wasser und 2 ml konz. H_2SO_4 , mit NK 6/20-Lampe 17 Std. unter Argon bestrahlt. Übliche Aufarbeitung gab 292 mg Basen, die an 110 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak chromatographiert wurden (Fr.² zu 5 ml): Fr. 1–157: 37 mg apolare Verbindungen ($8 \cdot 10^5$ ipm/mg); Fr. 158–179: 30 mg *Chanoclavin-I* (10%) ($1,1 \cdot 10^6$ ipm/mg); Fr. 180–190: leer; Fr. 191–234: 160 mg *Paliclavin* (56%) ($1,1 \cdot 10^6$ ipm/mg); Fr. 235–400: 6 mg *Paliclavin* und polares Material ($1,2 \cdot 10^6$ ipm/mg). Mehrfache Kristallisation aus Aceton und Aceton/Isopropyläther gab insgesamt 114 mg reinstes *Paliclavin* (17*) ($1,10 \pm 0,02 \cdot 10^6$ ipm/mg¹), das für die Einbauversuche verwendet wurde.

Einbauversuche am *Paspalum*-Stamm. – *Allgemeines.* 10 frisch geimpfte 100 ml-Erlenmeyer-Kulturen des Stammes M 50 bei 24° und 200 rpm in «*Gallenkamp Orbital Incubator*» geschüttelt. Am 4. Tag Substanzzugabe. Am 6. Tag Aufarbeitung einer Kontroll-Kultur (Kolorimetrisch: 55 mg Alkaloide pro 100 ml; isoliert: 57 mg rohe Paspalsäure). Am 10. Tag Aufarbeitung der zweiten Kontroll-Kultur (Kolorimetrisch: 108 mg Alkaloide; isoliert: 129 mg rohe Säure). Kolorimetrischer Gehalt nach 12 Tagen: 150 mg, nach 17 Tagen: 216 mg.

Einbau von [$N-^{14}CH_3$]-Chanoclavin-I (9*). 10 bzw. 20 mg *Chanoclavin-I* (9*) ($1,1 \cdot 10^7$ bzw. $2,2 \cdot 10^7$ ipm total) gelöst in 1,0 bzw. 2,0 ml 0,1*N* Bernsteinsäure, durch Millipore-Filter («*Swinnex*»

1) Mittel aus 10 Einzelmessungen an sublimierten Proben verschiedener Kristallisate.

2) Fr. = Abkürzung für Fraktion(en).

Aufsatz*) steril filtriert und direkt mit Injektionsnadel zu je einer Kultur gegeben. Nachspülen mit 1 ml 0,1 N Bernsteinsäure und 2 ml Wasser.

a) Am 11. Tag die Kultur der 10-mg-Zugabe von Mycel befreit, Filtrat und Waschwasser (total 200 ml) auf Säule von 50 ml Dowex-50 X-8 (100–200 mesh, H⁺-Form) gegeben und mit insgesamt 500 ml Wasser gewaschen. Eluieren der Alkaloide mit 2,5proz. wässrigem Ammoniak lieferte 154 mg rohe Paspalsäure (6) (1800 ipm/mg); 6 gelöst in 2 ml 1 N NaOH, kurz erwärmt und mit 2 N Essigsäure auf pH 4,5–4,7 eingestellt, Niederschlag in ammoniakalischem Methanol aufgenommen und kristallisiert gab 32 mg Lysergsäure (7) ($2,5 \cdot 10^3$ ipm/mg); zweite Kristallisation: 19 mg ($2,4 \cdot 10^3$ ipm/mg). Weiteres Eluieren der Säule mit 12,5–25proz. wässrigem Ammoniak lieferte noch 4 mg Clavine: ($2,2 \cdot 10^4$ ipm/mg).

b) Am 17. Tag wurde die 20-mg-Kultur genau gleich aufgearbeitet. Von Ionenaustauscher-Säule eluiert 350 mg rohe Paspalsäure (6) ($3,8 \cdot 10^3$ ipm/mg). Nach NaOH-Behandlung und Kristallisation der Lysergsäure (7): $5,1 \cdot 10^3$ ipm/mg. Nach 1. Kristallisation aus Methanol/Ammoniak: $7,5 \cdot 10^3$ ipm/mg, nach 2. Kristallisation: $7,3 \cdot 10^3$ ipm/mg. Weiteres Eluieren der Säule lieferte noch 17 mg Clavine ($3,3 \cdot 10^5$ ipm/mg).

Einbau von [N-¹⁴CH₃]-Paliclavin (17).* Parallel zum Chanoclavin-I-Einbau durchgeführt und genau wie dort beschrieben, mit folgenden Resultaten:

a) 10-mg-Ansatz (11 Tage) ergab 190 mg rohe Paspalsäure (6) (90 ipm/mg); aus 6 Lysergsäure (7) hergestellt (35 ipm/mg), aus Methanol/Ammoniak umkristallisiert: 26 ipm/mg; Clavine: 4 mg ($1,7 \cdot 10^5$ ipm/mg), Chanoclavin-I (9) und Paliclavin (17) enthaltend; 13 mg ($7,6 \cdot 10^5$ ipm/mg), u. a. Paliclavin (17) enthaltend.

b) 20-mg-Ansatz (17 Tage) ergab 318 mg rohe Paspalsäure (6) (180 ipm/mg); aus 6 Lysergsäure (7) hergestellt (93 ipm/mg); 1mal umkristallisiert: 38 ipm/mg; 2mal umkristallisiert: 36 ipm/mg; Clavine: 16 mg ($5,4 \cdot 10^5$ ipm/mg) Paliclavin (17); 17 mg ($3,7 \cdot 10^5$ ipm/mg), u. a. Paliclavin (17) und Chanoclavin-I (9) enthaltend.

Einbauversuche am Pennisetum-Stamm. – *Allgemeines.* 14 frisch geimpfte 100-ml-Fernbach-Kulturen des Stammes J 13 bei 24° in Standkultur angezüchtet. Am 9. Tag Substanzzugabe zu 4 + 4 Kolben. Alle Kulturen waren gleichmässig weiss überwachsen, Lösung rosa. Von nun an alle Kulturen täglich gleichzeitig während 30 Min. mit Magnetrührer umgewälzt. Am 28. Tag kolorimetrisch bestimmter Alkaloidgehalt: 49,2 mg/Kolben (Mittel aus 5 Kontrollkulturen). Am 31. Tag eine Kontrollkultur aufgearbeitet, ergab nach Filtration durch 10 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak 80:19:1 total 31 mg Clavine.

Einbau von [N-¹⁴CH₃]-Chanoclavin-I (9).* 20 mg Chanoclavin-I (9*) ($2,2 \cdot 10^7$ ipm total) gelöst in 10 ml 0,1 N Bernsteinsäure und mit Swinmex-Spritze verteilt auf 4 Fernbach-Kolben: Nr. 1: 1 ml bzw. 2 mg ($2,2 \cdot 10^8$ ipm); Nr. 2: 2 ml bzw. 4 mg ($4,4 \cdot 10^8$ ipm); Nr. 3: 3 ml bzw. 6 mg ($6,6 \cdot 10^8$ ipm); Nr. 4: 4 ml bzw. 8 mg ($8,8 \cdot 10^8$ ipm).

Nach total 32 Tagen Wachstum (davon 23 Tage mit Vorläufer) zeigte DC.-Kontrolle der Kulturen, dass alle qualitativ und semi-quantitativ dieselbe Alkaloid-Verteilung aufwiesen wie die Kontrolle. Die 4 aktiven Kulturen (alle pH = 6,3) zusammen durch viel Hyflo Super Cel klar filtriert (Kulturen stark durchwachsen, schleimig, Mycel bordeauxrot, Kulturfiltrat dunkelbraun). Mycelschwämme mit 200 ml 0,5 N Weinsäure ausgerührt und abgenutscht. Gesamtfiltrat (1 l) auf Säule von 50 ml Lewatit S-100 (H⁺-Form) aufgetragen, nachwaschen der Säule mit 1 l Wasser und mit 200 ml Methanol.

Erschöpfendes Eluieren der Alkaloide mit total 400 ml Methanol/konz. Ammoniak 1:1, Einengen und Extrahieren mit Methylenchlorid/2-Propanol 8:2 lieferte 263 mg Rohalkaloide ($4,4 \cdot 10^4$ ipm/mg).

263 mg Rohalkaloide chromatographiert an 105 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak 94:7:1 lieferte in dieser Reihenfolge: 94 mg Agroclavin (4) (davon 74 mg Spitzenfraktion), 89 mg Elymoclavin (5) (davon 46 mg Spitzenfraktion), 14 mg Chanoclavin-I (9) und 11 mg diverse Clavine.

74 mg Agroclavin (4) ($3,8 \cdot 10^4$ ipm/mg) aus Aceton zur konstanten Aktivität kristallisiert: $3,20 \pm 0,02 \cdot 10^4$ ipm/mg; Einbaurate: 13,7%, spez. Einbaurate: 2,9%.

46 mg Elymoclavin (5) ($1,2 \cdot 10^4$ ipm/mg) aus Methanol zur konstanten Aktivität kristallisiert: $1,20 \pm 0,01 \cdot 10^4$ ipm/mg; Einbaurate: 4,9%, spez. Einbaurate: 1,1%.

Einbau von $[N-^{14}CH_3]$ -Paliclavin (17).* Parallel zum Chanoclavin-Einbau durchgeführt und genau wie dort beschrieben mit folgenden Resultaten: 100 mg Rohalkaloid ($6,4 \cdot 10^4$ ipm/mg) isoliert. Chromatographie an 40 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak. 92:7:1 lieferte in dieser Reihenfolge: 28 mg Agroclavin (4), 26 mg Elymoclavin (5), 5 mg Chanoclavine, 12 mg Paliclavin (17) und 12 mg Paliclavin und polare Produkte.

25 mg Agroclavin (4) ($4 \cdot 10^3$ ipm/mg) verdünnt mit 23 mg inaktivem Material, 3mal umkristallisiert aus Aceton ergab 8 mg (6,9 ipm/mg). Einbaurate: $1,6 \cdot 10^{-3}\%$, spez. Einbaurate: $6,3 \cdot 10^{-4}\%$.

23 mg Elymoclavin (5) ($2,7 \cdot 10^3$ ipm/mg) verdünnt mit 23 mg inaktivem Material, 3mal umkristallisiert aus Methanol gab 14 mg (3,5 ipm/mg). Einbaurate: $0,8 \cdot 10^{-3}\%$, spez. Einbaurate: $3,2 \cdot 10^{-4}\%$.

Isolierung der Nebenalkaloide. – *Allgemeines.* Zunächst wurden die insgesamt 12 aus den 4 Einbauversuchen mit Chanoclavin-I und Paliclavin stammenden Fraktionen, welche die Nebenalkaloide enthielten, in den 3 DC.-Systemen A, B und C analysiert und mit Hilfe eines *Berchtold*-Radio-DC.-Scanners die Aktivitätsverteilung untersucht. Auffälligstes Ergebnis bezüglich Paliclavin war die schon bei der Säulenchromatographie der Rohalkaloide festgestellte Verschmierung der Radioaktivität als Folge der Zersetzung, wobei eine deutliche Konzentration am Start und an der Front der Chromatogramme festgestellt wurde. Keine von Paliclavin ausgehende Umwandlung war nachweisbar. Bezüglich Chanoclavin-I konnte eindeutig der Einbau in Elymoclavin sichtbar gemacht und Hinweise auf einen Übergang in Isochanoclavin-I und N-Desmethylchanoclavin-I gewonnen werden. Diese Voruntersuchungen bestimmten die Wahl der Fraktionen, welche als Ausgangsmaterial für die Isolierung der interessierenden Verbindungen dienten.

Isochanoclavin-I (10) und Chanoclavin-I (9) aus Fütterung von $[N-^{14}CH_3]$ -Paliclavin (17) am Paspalum-Stamm.* Die Clavinfraktionen aus dem entsprechenden Einbau (17 mg, $3,7 \cdot 10^5$ ipm/mg), bestehend aus ca. 60% Paliclavin (17), 35% Elymoclavin (5), 3–4% Chanoclavin-I (9), und 1–2% Isochanoclavin-I (10), auf einer DC.-Fertigplatte ohne UV.-Indikator im System C aufgetrennt. Nach Entwickeln der Randstreifen mit *van Urk*-Reagens ergab Eluieren der ausgekratzen Chanoclavin-I- bzw. Isochanoclavin-I-Zone 2 mg Chanoclavin-I (9) bzw. 1 mg Isochanoclavin-I (10). Letzteres verdünnt mit 10 mg inaktivem Material, 3mal umkristallisiert und nochmals 5fach verdünnt ergab nach einer weiteren Kristallisation praktisch inaktives Isochanoclavin-I (10) (< 3 ipm/mg). Zur Kontrolle 2 mg Chanoclavin-I (9) ebenfalls verdünnt (6fach) und 2mal umkristallisiert: 39 ipm/mg.

Isochanoclavin-I (10) aus Einbau von $[N-^{14}CH_3]$ -Paliclavin (17) am Pennisetum-Stamm.* 5 mg entsprechende Clavinfraktion ($4 \cdot 10^4$ ipm/mg), bestehend aus ca. 80% Chanoclavin-I (9), 5–10% Elymoclavin (5) und je ca. 1–2% Isochanoclavin-I (10), Chanoclavin-I (10) und zwei weiteren unbekanntem Produkten, auf einer DC.-Alufolie im System C getrennt, nach UV.-Lokalisierung Isochanoclavin-I-Zone mit Schere herausgeschnitten und im Durchlaufverfahren durch absteigende Chromatographie in einer normalen DC.-Trennkammer mit Chloroform/Methanol 9:1, ges. mit NH_3 -Gas aus 50 ml Messzylinder, eluiert, ergab ca. 500 γ Isochanoclavin-I (10). Verdünnt mit 10 mg inaktivem Material gab nach 3 Kristallisationen praktisch inaktives Material (< 10 ipm/mg).

Isochanoclavin-I (10) aus Einbau von $[N-^{14}CH_3]$ -Chanoclavin-I (9), am Pennisetum-Stamm.* 40 mg entsprechende Fraktion (10^5 ipm/mg), bestehend aus ca. 50% Elymoclavin (5) 40% Chanoclavin-I (9) und je 1–5% Isochanoclavin-I (10), Chanoclavin-II (11) und zwei weiteren unbekanntem, auf einer präp. SC.-Platte im System C getrennt. Isochanoclavin-I-Zone (3 mg, bestehend aus je ca. 1 mg Chanoclavin-I (9), Isochanoclavin-I (10) und sog. «Isochanoclavin-II» nochmals getrennt auf DC.-Alufolie ergab ca. 500 γ Isochanoclavin-I (10). Verdünnt mit 10 mg inaktivem Material, 3mal kristallisiert, HV.-sublimiert, nochmals 5fach verdünnt und wieder 2mal umkristallisiert gab 6,4 mg (125 ipm/mg, entsprechen unverdünnt $1,25 \cdot 10^4$ ipm/mg). Daraus Fumarat hergestellt durch Zugabe von 1,28 ml Lösung von 11,6 mg Fumarsäure in 10 ml Aceton zur Aceton/Methanol-Lösung des Alkaloids. Spontan kristallisierendes Fumarat (Smp. 199–200° (Zers.)) 3mal aus Methanol umkristallisiert, 1:1 verdünnt mit inaktivem Fumarat und noch 4mal umkristallisiert (Methanol, Methanol/Aceton und Äthanol) gab konstante Endaktivität von 58 ± 2 ipm/mg für Isochanoclavin-I (10) (entsprechen unverdünnt $1,2 \pm 0,1 \cdot 10^4$ ipm/mg).

Paliclavin (17) aus Einbau von $[N-^{14}CH_3]$ -Chanoclavin-I (9) am Paspalum-Stamm.* 4 mg entsprechende Fraktion ($6,5 \cdot 10^8$ ipm/mg), bestehend zu über 80% aus Paliclavin (17) neben Zeretzungsprodukten, in Methanol mit Norit entfärbt, eingedampft, in Aceton aufgenommen und klar filtriert gab 2,0 mg; verdünnt mit 18 mg inaktivem Paliclavin (17) 3mal umkristallisiert und HV.-sublimiert gab praktisch inaktives Material (17 ipm/mg).

Paliclavin (17) aus Einbau von $[N-^{14}CH_3]$ -Chanoclavin-I (9) am Pennisetum-Stamm.* 7 mg der polarsten Fraktionen, in denen die Anwesenheit von Paliclavin wahrscheinlich war (DC.), wie oben gereinigt, verdünnt und kristallisiert gab ebenfalls praktisch inaktives Paliclavin (17) (25 ipm/mg).

Die Radioaktivitätsanalysen wurden im Radiochemischen Laboratorium der ETHZ (Leitung PD. Dr. P. Jordan) ausgeführt. Herrn Dr. Kobel und seinen Mitarbeitern danken wir für die Anzucht der Pilzkulturen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 80. Mitt.: T. Fehr & P. A. Stadler, *Helv.* 58, 2484 (1975).
 - [2] Übersichtsartikel: a) R. Thomas & R. A. Bassett, in 'Progress in Phytochemistry', Vol. 3, Ed. L. Reinhold & Y. Liwischitz, Wiley-Interscience, New York & London 1972; b) P. A. Stadler & P. Stütz, in 'The Alkaloids', Vol. XV, Ed. R. H. F. Manske, Academic Press, New York & London 1975; c) H. G. Floss, *Tetrahedron*, im Druck. (Wir danken Herrn Prof. Floss für die Überlassung des Manuskripts.)
 - [3] P. F. Heinlein, S.-L. Lee & H. G. Floss, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 44, 1244 (1971) und weitere dort zitierte Literatur.
 - [4] D. Staufacher & H. Tschertler, *Helv.* 47, 2186 (1964).
 - [5] D. Gröger, D. Erge & H. G. Floss, *Z. Naturforsch.* 21b, 827 (1966).
 - [6] T. Fehr, W. Achlin & D. Arigoni, *Chem. Commun.* 1966, 801.
 - [7] H. G. Floss, U. Hornemann, N. Schilling, K. Kelley, D. Gröger & D. Erge, *J. Amer. chem. Soc.* 90, 6500 (1968).
 - [8] P. Pachlatko, C. Tabacik, W. Achlin & D. Arigoni, *Chimia* 29, 526 (1975); P. Pachlatko, *Diss. ETH Nr. 5481*, 1975.
 - [9] T. Fehr, *Diss. ETH Nr. 3967*, Zürich 1967, zit. in [2].
 - [10] H. Tschertler & H. Hauth, *Helv.* 57, 113 (1974).
 - [11] J. M. Cassidy, C. I. Abou-Chaar & H. G. Floss, *Lloydia* 36, 390 (1973).
 - [12] H. Kobel, E. Schreier & J. Rutschmann, *Helv.* 47, 1052 (1964).
 - [13] A. Stoll, A. Brack, H. Kobel, A. Hofmann & R. Brunner, *Helv.* 37, 1815 (1954).
 - [14] M. P. Seiler, W. Achlin & D. Arigoni, *Chem. Commun.* 1970, 1394; *Chimia* 24, 449 (1970); M. P. Seiler, *Diss. ETH Nr. 4574*, Zürich 1970; C. I. Abou-Chaar, H. F. Guenther, M. F. Manuel, J. E. Robbers & H. G. Floss, *Lloydia* 35, 272 (1972).
 - [15] P. Jordan, E. Büchler & K. May, *J. radioanalyt. Chemistry* 14, 71 (1973).
-