



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

①

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

① CH 664 758 A5

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>: C 07 D 457/02  
C 12 P 17/18

// (C 07 D 457/02, 209:04, 211:70)  
(C 12 P 17/18, C 12 R I:645)

② PATENTSCHRIFT A5

②① Gesuchsnummer: 3745/84

②② Anmeldungsdatum: 03.08.1984

③① Priorität(en): 10.08.1983 HU 2817/83

②④ Patent erteilt: 31.03.1988

④⑤ Patentschrift  
veröffentlicht: 31.03.1988

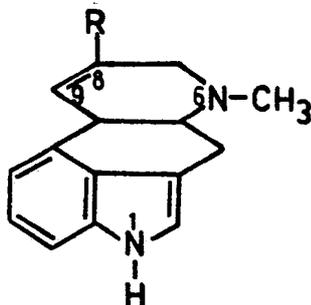
⑦③ Inhaber:  
Richter Gedeon Vegyészeti Gyar R.T., Budapest X  
(HU)

⑦② Erfinder:  
Trinn, Maria, Pécs (HU)  
Kordik, Gabriella, Budapest (HU)  
Udvardy Nagy, Eva (-Cserey Pechany), Dr.,  
Budapest (HU)  
Vida, Zsuzsanna, Budapest (HU)  
Zsoka, Erzsébet (-Somkúti), Budapest (HU)

⑦④ Vertreter:  
Patentanwälte Schaad, Balass, Sandmeier, Alder,  
Zürich

⑤④ Verfahren zur Herstellung von Clavin-Mutterkornalkaloiden.

⑤⑦ Clavin-Mutterkornalkaloide der allgemeinen Formel  
(I)



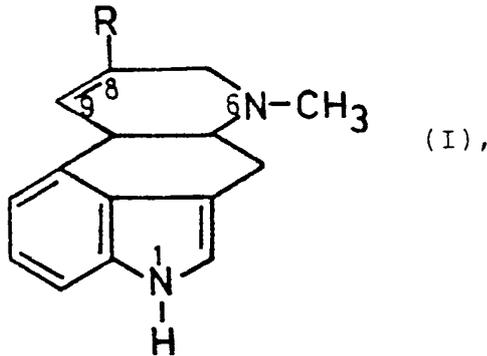
(I),

in boden, in submerser Kultur, unter aeroben Bedingungen  
fermentiert.

worin R für eine Methyl-Gruppe (Agroclavin) oder Hydroxymethyl-Gruppe (Elymoclavin) steht, werden unter Anwendung eines *Claviceps fusiformis* Stammes hergestellt. Als produzierender Stamm wird der bei der Nationalen Sammlung für landwirtschaftliche und industrielle Mikroorganismen, Ungarn, unter der Nummer 00211 deponierte *Claviceps fusiformis* Variantenstamm eingesetzt. Dabei wird dieser Stamm auf einem eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, Mineralsalze sowie gegebenenfalls andere Zusatzstoffe enthaltenden flüssigen Nähr-

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Clavin-Mutterkornalkaloiden der allgemeinen Formel I



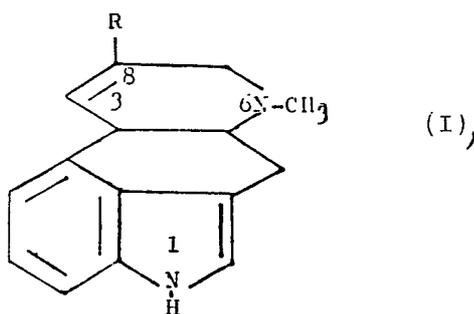
worin R für eine Methyl- oder Hydroxymethyl-Gruppe steht, unter Verwendung eines *Claviceps fusiformis* Stammes durch Fermentation auf einem eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und Mineralsalze enthaltenden flüssigen Nährboden, in submerser Kultur, unter aeroben Bedingungen, dadurch gekennzeichnet, dass als produzierender Stamm der bei der Nationalen Sammlung für landwirtschaftliche und industrielle Mikroorganismen, Ungarn, unter der Nummer 00211 deponierte *Claviceps fusiformis* Variantenstamm eingesetzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der flüssige Nährboden weitere Zusatzstoffe enthält.

3. Variantenstamm *Claviceps fusiformis*, hinterlegt am 15. Oktober 1981 unter der Nummer 00211 bei der Nationalen Sammlung für landwirtschaftliche und industrielle Mikroorganismen, Ungarn, als Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1.

## BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von Clavin-Mutterkornalkaloiden der allgemeinen Formel (I)



auf fermentativem Wege unter Anwendung eines neuen *Claviceps fusiformis* Stammes gemäss Anspruch 1. Die Erfindung betrifft weiterhin einen *Claviceps fusiformis* Stamm gemäss Anspruch 3.

In der allgemeinen Formel (I) steht R für eine Hydroxymethyl-Gruppe (Elymoclavin) oder eine Methylgruppe (Agroclavin).

Von den hergestellten Alkaloiden ist das Elymoclavin das wertvollere, es wirkt analeptisch und antiparkinsonisch und hemmt die Prolaktinsekretion (B. Berde und O. Schild: Ergot Alkaloids and Related Compounds; Handb. Exp. Pharm., 49, Springer-Verlag, Berlin [1978]). Das Elymoclavin ist weiterhin auch die Ausgangssubstanz bzw. das Inter-

mediär von Lysergol sowie dem daraus herstellbaren Nicerogolin.

Es ist bekannt, dass die Pflanzenparasiten *Claviceps*-Pilze in Symbiose mit ihren Wirtspflanzen zur Biosynthese von Mutterkornalkaloiden fähig sind. Von den die Clavinalkaloide produzierenden *Claviceps*-Stämmen war lange bekannt, dass sie die charakteristischen Alkaloide auch auf fermentativem Weg produzieren (M. Abe et al.: J. Agric. Chem. Soc. [Japan] 25, 458 [1952]). Obwohl das für die Industrie nicht von Bedeutung ist, bedeutet es für die Forschung der Biosynthese des Grundgerüsts lange eine entsprechende Basis (L. C. Vining et al.: Can. J. Microbiol. 12, 915 [1966]; H. G. Floss: Tetrahedron 32, 873 [1976]).

Das erste Industrieverfahren wurde von G. T. Banks et al. ausgearbeitet (J. Gen. Microbiol. 82, 345 [1974]). In ihrem Verfahren stellten sie Agroclavin mit einem aus dem Sklerocium von *Pennisetum typhoideum* isolierten, dann durch Selektion verbesserten *Claviceps fusiformis* Stamm her.

Dann stellte Z. Rehacek neue *Claviceps purpurea* Mutanten her. Die eine Mutante war ein vor allem Agroclavin produzierender Stamm. Zwei weitere Mutanten produzierten 300–600 µg/ml Elymoclavin (J. Nat. Prod. 44, 225 [1981]).

Die sowjetische Patentschrift Nr. 735 010 bzw. Prikl. Biok. Mikrobiol. 16, 569 [1980] beschreiben die Anwendung eines in der Natur vorkommenden *Claviceps fusiformis* Stammes. In der Fermentation produziert der Stamm kennzeichnend sechs verschiedene Clavin-Alkaloide. Das Gesamtalkaloid-Niveau beträgt 1220 µg/ml und davon beträgt die Menge von Elymoclavin bei Anwendung entsprechend ausgewählten Nährbodens 70–75%.

S. H. Ambike et al. (Phytochem. 9, 1953–58 [1970]) fanden, dass die Clavinalkaloide produzierenden *Claviceps purpurea* Stämme Cytochrom P-450 enthalten. Sie beobachteten weiterhin, dass mit dem Zusatzstoff Phenylbarbiturat die Menge von Cytochrom P-450 erhöht und dadurch gleichzeitig auch die Menge des produzierten Gesamtalkaloides gesteigert werden kann.

Bei unseren Versuchen waren wir bestrebt, einen ein hohes Gesamtalkaloid-Niveau sichernden, zur Produktion geeigneten Stamm zu züchten, der innerhalb der Gesamtalkaloidmenge möglichst vorwiegend Elymoclavin eventuell neben leicht davon trennbaren anderen Alkaloiden produziert.

Als Ausgangsstamm wurde ein *Claviceps fusiformis* Stamm gewählt, der auf einem Glycerin-Pepton-Nährboden hauptsächlich Agroclavin und als Nebenalkaloid Elymoclavin produziert (A. Tonolo und E. Udvardy-Nagy: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 15, 29 [1968]). Der Stamm wurde beim Ungarischen Landesinstitut für Gesundheitswesen (Országos Közegészségügyi Intézet Budapest W., Gyali ut 216 unter der Nummer 00164 am 2. Mai 1977 deponiert.

Der als Ausgangsstamm verwendete *Claviceps fusiformis* Stamm enthält – ähnlich wie der von Ambike eingesetzte *Claviceps purpurea* Stamm – ein alternierendes Oxydasenzym, nämlich das Cytochrom P-450, und die produzierte Gesamtalkaloidmenge kann durch Barbiturate erhöht werden.

Weiterhin haben wir gefunden, dass die Koloniemorphologie und Pigmentierung der in Gegenwart von Barbiturat gezüchteten Kultur wesentlich von der des Ausgangsstammes abweicht. Durch Wiederholung der Selektion wurden die neuen morphologischen Eigenschaften so stabil, dass sie auch für den selektierten Stamm ohne Gegenwart des Zusatzstoffes kennzeichnend waren. Der neue Stamm erzielte – auf einem zusatzfreien Nährboden – im Vergleich zur Ausgangskultur einen höheren Gehalt an Cytochrom P-450.

Das Wachstum des neuen Stammes ist zurückhaltender, seine Polysaccharidbildung geringer, seine Alkaloid- und

Pigmentproduktion jedoch verstärkter als die des Ausgangsstammes. Es ist vollkommen überraschend, dass der neue Stamm hauptsächlich Elymoclavin produziert, während der Mutterstamm (d. h. der Stamm Nr. 00164) hauptsächlich Agroclavin herstellt. Das Elymoclavin kann vom Agroclavin leicht abgetrennt werden (z. B. nach der ungarischen Patentschrift Nr. 171 659).

Der neue Stamm wurde bei der Nationalen Sammlung für landwirtschaftliche und industrielle Mikroorganismen, Somló ut 14–16, H-1118 Budapest, Ungarn am 15. Oktober 1981 unter der Nummer 00211 deponiert.

Dieser neue *Claviceps fusiformis* Variantenstamm wird aus dem Ausgangsstamm erhalten, indem der beim ULG, unter der Nummer 00164 deponierte *Claviceps fusiformis* Stamm auf einem eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthaltenden, agarhaltigen festen Nährboden in Gegenwart eines die alternierende Oxydaseenzymproduktion, hauptsächlich die Cytochrom P-450 Produktion fördernden Stoffes, vorteilhaft eines barbituratartigen Zusatzstoffes in einer Menge von 1–10 mMol auf 1 Liter Nährboden gerechnet bei einer Temperatur von 20–28 °C 7–21 Tage lang inkubiert wird und die erhaltenen, vom Ausgangsstamm durch ihre violette Farbe und flach ausge-dehnte Form gut unterscheidbaren Kolonien selektiert werden, die Selektion gegebenenfalls in Gegenwart von Barbiturat gegebenenfalls wiederholt und der erhaltene neue Variantenstamm, der mindestens zu 85% Elymoclavin produziert, abgetrennt wird.

Der als Ausgangsstamm verwendete Stamm, der unter der Nummer 00164 deponiert ist, wird auf einem agarhaltigen, festen Nährboden gezüchtet.

Die für diesen Zweck geeigneten Nährbodenzusammensetzungen sind u. a. wie folgt:

#### Nährboden «A»:

Saccharose	100,0	g
l-Asparagin	10,0	g
Calciumnitrat	1,0	g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,25	g
Magnesiumsulfat	0,25	g
Kaliumchlorid	0,125	g
Eisen(II)-sulfat	0,033	g
Zinksulfat	0,027	g
l-Zysteinhydrochlorid	0,010	g
Hefeextrakt (Difco)	0,100	g
Agar-Agar (Difco)	30,0	g
pH 5,2 (mit NaOH eingestellt).		

Die aufgezählten Komponenten werden in Leitungswasser bei einer Temperatur von 50–60 °C auf 1 Liter gelöst, dann wird die Lösung bei 110 °C 30 Minuten lang sterilisiert. Der erhaltene Nährboden wird nach Abkühlen fest.

#### Nährboden «B»

Aus 39 g Kartoffelglycoseagar (Difco) wird ähnlich wie beim Nährboden «A» 1 Liter Nährboden gekocht.

#### Nährboden «C»

Saccharose	100,0	g
Bernsteinsäure	10,0	g
Calciumnitrat	1,0	g
Ammoniumnitrat	1,0	g
Kaliumhydrogenphosphat	0,25	g
Magnesiumsulfat	0,25	g
Kaliumchlorid	0,125	g
Eisen(II)-sulfat	0,009	g
Zinksulfat	0,003	g
Agar-Agar (Difco)	30,0	g
pH 5,5–5,6 (mit NH <sub>4</sub> OH eingestellt).		

Aus den obigen Komponenten wird ähnlich wie bei Nährboden «A» 1 Liter Nährboden gekocht.

#### Nährboden «D»

Glycerin	100,0	g
Pepton (Difco)	20,0	g
Agar-Agar (Difco)	30,0	g

Die Komponenten werden bei einer Temperatur von 50–60 °C in einem Liter Leitungswasser gelöst, der pH-Wert der Lösung wird auf 6,5–6,8 eingestellt, und die Lösung wird bei 110 °C 30 Minuten lang sterilisiert.

Auf einem der obigen Nährböden erfolgt das Kultivieren unter sterilen, aeroben Bedingungen bei einer Temperatur zwischen 20 und 28 °C in Gegenwart eines die Cytochrom P-450 Bildung fördernden Zusatzes, vorteilhaft eines barbituratartigen Zusatzstoffes, der auf 1 Liter Nährboden gerechnet in einer Menge von 0–10 mMol zugesetzt wird. Als barbituratartiger Zusatzstoff kommen in erster Linie N-Phenylbarbiturate, wie Phenobarbital oder Methylphenobarbital in Frage. Das Kultivieren erfolgt im allgemeinen 7–21 Tage lang, dann werden die Kolonien des neuen Stammes abgetrennt.

In der folgenden Tabelle werden die Ausgangskultur und die den neuen Stamm unterscheidenden wichtigsten morphologischen und biochemischen Merkmale angegeben:

Morphologischer Charakter Kolonienmorphologie	MNG 00164	MNG 00211
Auf mit Agar verfestigtem Nährboden «C» am 21. Tag (Figuren 2 und 3)	10–15 mm reichgefältelte, scharfkantige, beigefarbene Kolonie (Fig. 2)	15–20 mm flache, scharfkantige, violette Luftmycelium-Kolonie (Fig. 3)
In submerser Kultur auf Nährboden «C» am 12. Tag		
a) makroskopische Erscheinung	beigefarbene Kultur mit watteartiger Viskosität	braun-violette, lockere, flaumige Kultur
b) mikroskopisches Bild	3–6 µ dicke, lange, oft Geflechte bildende Hyphen	
Biochemischer Charakter		
Phenobarbitaltoleranz:		
a) auf Agarnährboden	1 mMol/Liter	10 mMol/Liter
b) auf flüssigem Nährboden	0,6 mMol/Liter	5 mMol/Liter
Cytochrom P-450 Gehalt auf Nährboden «C» am 4.–7. Tag nMol/g trockne Zellmasse	1,0–1,5	2,5–3,0

Morphologischer Charakter Kolonienmorphologie	MNG 00164	MNG 00211
Polysaccharidbildung auf Nährboden «C» am 7. Tag auf Grund der Bildung von äthanolhaltigem Niederschlag	20,8 mg/ml	3,8 mg/ml
Geschwindigkeit der Gesamtalkaloidproduktion auf ohne Zusatz von Agar hergestelltem Nährboden «C» am 4.–7. Tag µg/ml/Tag	50–80	200–250
Alkaloidzusammensetzung auf ohne Zusatz von Agar hergestelltem Nährboden «C»		
Agroclavin %	75–80	5–15
Elymoclavin %	20–25	85–90
Auf ohne Zusatz von Agar hergestelltem Nährboden «D»		
Agroclavin %	90–95	5–10
Elymoclavin %	5–10	90–95

Der mit dem Verfahren hergestellte neue Stamm Nr. 00211 wird zur Herstellung von Clavinalkaloiden wie folgt eingesetzt:

Für das Fermentationsverfahren wird ein geeigneter flüssiger Nährboden verwendet, der eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, Mineralstoffe und gegebenenfalls einen anderen Zusatzstoff enthält.

Die bei der alkaloidproduzierenden Fermentation anwendbaren Nährbodenzusammensetzungen sind u. a. wie folgt:

Nährboden «E»:

Mannit	40,0 g/l
Bernsteinsäure	10,0 g/l
Maisbrei	2,0 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	1,0 g/l
Magnesiumsulfat	0,3 g/l
pH 5,2 – 5,3 (mit NH <sub>4</sub> OH eingestellt)	

Nährboden «F»:

Saccharose	50,0 g/l
geriebene Kartoffeln	10,0 g/l
Ammoniumnitrat	1,0 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	0,25 g/l
Magnesiumsulfat	0,25 g/l
pH 5,4 – 5,5 (mit NH <sub>4</sub> OH eingestellt)	

Nährboden «G»:

Sorbit	60,0 g/l
Bernsteinsäure	36,0 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	0,25 g/l
Magnesiumsulfat	0,30 g/l
Eisen(II)-sulfat	0,009 g/l
Zinksulfat	0,003 g/l
pH 5,4 – 5,5 (mit NH <sub>4</sub> OH eingestellt).	

Alle obigen Zusammensetzungen werden bei einer Temperatur von 50–60 °C in Leitungswasser gelöst und dann bei 110 °C 30 Minuten lang sterilisiert.

Auf einem der obigen Nährböden oder auf Nährboden «C» erfolgt die Fermentation ohne das Zusetzen von Agar-Agar unter sterilen aeroben Bedingungen in einer submersen Kultur, bei einer Temperatur von 20–28 °C, in einem pH-Bereich von 4,2–6,0 und 10–15 Tage lang.

Die Anwendung des neuen Stammes wird durch folgende Beispiele veranschaulicht, ohne das Schutzbegehren auf die Beispiele zu beschränken.

Beispiel 1

Die 14tägige, auf dem Nährboden «A» gewachsene schiefe Agarkultur des unter der Nummer 00211 deponierten *Claviceps fusiformis* Variantenstammes wird mit 5 ml physiologischer Salzlösung gewaschen. 1 ml der erhaltenen Suspension wird auf 100 ml in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben vorbereiteten flüssigen Nährboden «C» geimpft, und die Kultur wird bei einer Temperatur von 24 °C auf einem Schütteltisch (Frequenz: 240/Min., Hublänge: 2 cm) 7 Tage lang inkubiert.

Mit 4 ml der so hergestellten Impfkultur wird die produzierende Fermentation begonnen. Für die Alkaloidproduktion werden in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben 100 ml Nährboden «C» sterilisiert. Während unter gleichen Bedingungen erfolglicher 12tägiger Kultivationszeit wird der Kultur jeweils 1,0 ml der 10%igen, sterilen, wässrigen Lösung des Hefeextraktes Dicfo am 3. und 5. Tag zugesetzt.

Am Ende der Fermentation beträgt der trockne Myceliumgehalt der beige-lila Kultur 18 g/l, in seinem Filtrat auf Grund der Reaktion nach van Urk der Gesamtalkaloidgehalt auf den Elymoclavinstandard berechnet 1300 µg/ml. Die Alkaloidkomponenten der Kultur werden mit folgender Methode bestimmt: 20 ml Kultur werden mit 40 ml eines 4:1 Gemisches von Chloroform und Isopropanol bei einem pH-Wert von 9 extrahiert und aus der organischen Phase werden 10 ml im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Eindampfrückstand wird in 0,5 ml eines 1:1 Gemisches von Chloroform und Methanol gelöst und 20 µl der Lösung durch Dünnschichtchromatographie analysiert. (Adsorbent: DC Alufolien Kieselgel 60F<sub>254</sub> (Art 5554); Eluiermittel: 4:1 Gemisch von Chloroform und Äthanol; Entwicklung: mit 254 nm UV-Licht; Elymoclavin: R<sub>f</sub> = 0,20; Agroclavin: R<sub>f</sub> = 0,30). Das Alkaloid wird vom Adsorbent durch ein Gemisch von jeweils 10 ml Bernsteinsäure und Methanol abgelöst und die Absorption der Lösung bei 283 nm gegenüber einer Blindlösung gemessen. Der so bestimmte Elymoclavin-Gehalt der 12tägigen Kultur beträgt 1150 µg/ml, der Agroclavin-Gehalt 55 µg/ml.

Beispiel 2

Die lyophilisierte Kultur des unter den Nummer 00211 deponierten *Claviceps fusiformis* Variantenstammes wird in 2 ml physiologischer Salzlösung suspendiert und die Suspension auf 100 ml in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben sterilisierten Nährboden «E» geimpft. Das Inoculum wird unter den in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen 7 Tage lang

kultiviert, dann werden je 2 ml davon auf  $2 \times 100$  ml in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben vorbereiteten Nährboden «G» geimpft. Nach 3tägigem Schütteln bei  $24^\circ\text{C}$  werden mit den Pfropfkulturen je 5 l sterilisierter Nährboden «G», der sich in einem 10 l Glasfermentor befindet, geimpft. Das Kultivieren wird bei  $24^\circ\text{C}$ , mit dem Durchströmen von 0,5 Liter Luft pro Liter je Minute und unter Rühren mit einer Geschwindigkeit von 430 Umdrehungen/Minute 12 Tage lang fortgesetzt. Zum Hemmen des Schäumens wird notwendigerweise Schaumverhütungsmittel Struktol SB 2020 in einer Menge von etwa 0,5 ml/l zugesetzt.

Der trockne Myceliumgehalt der Kultur beträgt 16 g/l und ihr Alkaloidgehalt – durch die in Beispiel 1 beschriebenen Methoden bestimmt –  $1550\ \mu\text{g/ml}$  Gesamtalkaloid, von 1435  $\mu\text{g/ml}$  Elymoclavin und 90  $\mu\text{g/ml}$  Agroclavin sind.

### Beispiel 3

Die lyophilisierte Kultur des unter den Nummer 00211 deponierten *Claviceps fusiformis* Variantenstammes wird in 2 ml physiologischer Salzlösung suspendiert, dann die Suspension auf Nährboden «B» geimpft. Die Kultur wird in einem dunklen Raum bei  $24^\circ\text{C}$  14 Tage lang inkubiert. Die auf der Oberfläche gewachsene Kultur wird in 5 ml physiologischer Salzlösung homogenisiert und je 2 ml davon werden auf je 100 ml in zwei 500 ml-Erlenmeyer-Kolben vorbereiteten Nährboden «F» geimpft. Die Kultur wird bei  $24^\circ\text{C}$  5 Tage lang geschüttelt und dann auf 5 Liter sich in einem 10 Liter-Glasfermentor befindenden sterilisierten Nährboden «C» geimpft.

Die Impfkultivierung erfolgt bei  $24^\circ\text{C}$  mit dem Durchströmen von 0,5 Liter Luft pro Liter und Minute und unter

Rühren mit einer Geschwindigkeit von 430 Umdrehungen/Minute 2 Tage lang. Die so gewonnene Kultur wird auf 110 Liter sterilisierten Nährboden «C» geimpft, der sich in einem säurebeständigen Stahlfermentor mit einem Fassungsvermögen von 160 Litern befindet und 20 g/l Natriumchlorid enthält. Das Kultivieren wird mit dem Durchströmen von 0,4 Liter Luft pro Liter und Minute und unter Rühren mit einer Geschwindigkeit von 220 Umdrehungen pro Minute bei  $24^\circ\text{C}$  12 Tage lang fortgesetzt. Zum Hemmen des Schäumens wird der Kultur das sterilisierte Schaumverhütungsmittel Struktol SB 2020 zugesetzt. Die Menge der Kultur beträgt während der ganzen Fermentation etwa 200 ml. Der zum Ende des Kultivierens erreichte trockne Myceliumgehalt beträgt 15 g/l und der Gesamtalkaloidgehalt  $1815\ \mu\text{g/ml}$ ; davon beträgt das Elymoclavinniveau  $1630\ \mu\text{g/ml}$  und das Agroclavinniveau  $240\ \mu\text{g/ml}$ . Diese Werte wurden durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie wie folgt bestimmt:

Aus der gefilterten Fermentbrühe wird ein Teil mit destilliertem Wasser auf das Zehnfache verdünnt und 20  $\mu\text{l}$  davon werden auf die mit dem Absorbenten Nucleosil 10 C 18 gefüllte Säule (Abmessungen:  $4,6 \times 250$  mm) des Hochdruck-Flüssigkeitschromatographs Labor MIM injiziert. Die Elution erfolgt mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1,0 ml/Minute und einem 3:2 Gemisch von Acetonitril und 0,01 M Ammoniumcarbonat. Das Detektieren geschieht mit einem UV-Detektor bei 280 nm. Auf dem Chromatogramm erscheint das Elymoclavin mit einer Retentionszeit von 8,7 und das Agroclavin mit einer Retentionszeit von 32,0 Minuten.

35

40

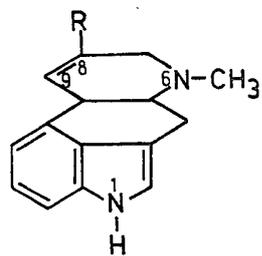
45

50

55

60

65



(I)

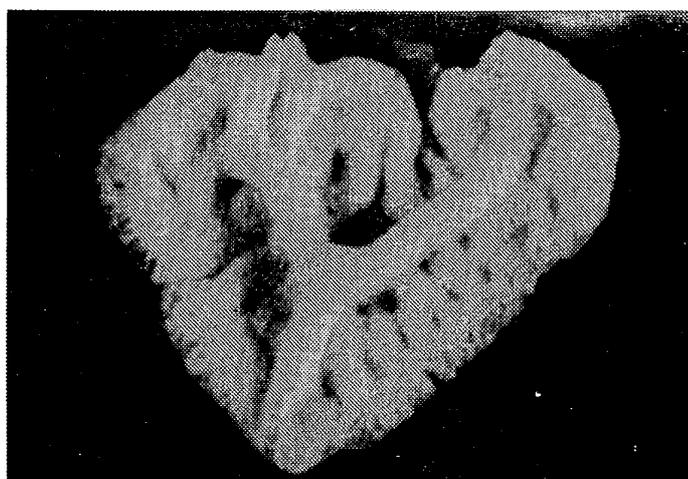


Fig. II.

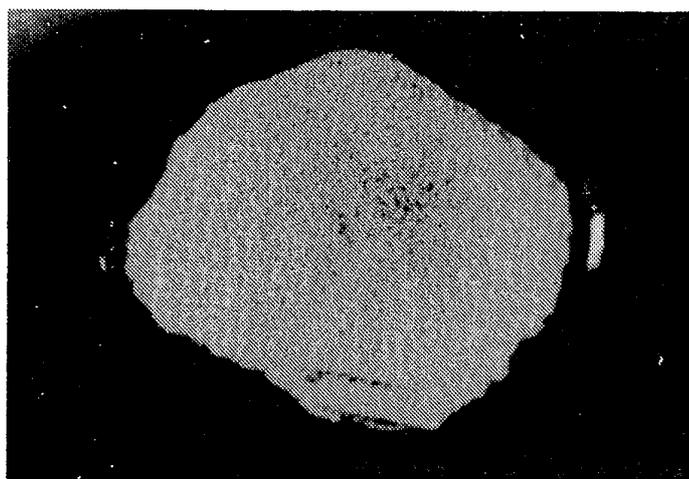


Fig. III.