CH 638 813 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 07 D 519/02

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

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11) 638 813

(21) Gesuchsnummer: 12957/78

(22) Anmeldungsdatum: 20.12.1978

(30) Priorität(en): 20.12.1977 DD 202798

(24) Patent erteilt: 14.10.1983

(45) Patentschrift veröffentlicht: 14.10.1983

(73) Inhaber:
VEB Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul (DD)

(72) Erfinder:
Werner Grawert, Radebeul (DD)
Brigitte Neumann, Dresden (DD)
Ludwig Schiedt, Radebeul (DD)
Dr. rer. nat. Karlheinz Heidenbluth, Radebeul (DD)
Dr. rer. nat. Christoph Dauth, Radebeul (DD)
Rudolf Schirutschke, Radebeul (DD)
Monika Müller, Radebeul (DD)

(74) Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

(54) Verfahren zur Isolierung von Mutterkornalkaloiden aus Kultursuspensionen.

(57) Von der Kultursuspension wird das Feuchtmycel, gegebenenfalls an einer quellfähigen Tonerde adsorbiert, abgetrennt und in der Wirbelschicht getrocknet, das erhaltene Trockenmycel wird dann mit organischen, aprotischen Lösungsmitteln extrahiert und der Extrakt zur Entfernung nichtbasischer Ballaststoffe mit einer verdünnten wässrigen Säure extrahiert, alsdann alkalisch gestellt und mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel nochmals extrahiert.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Isolierung von Mutterkornalkaloiden aus Kultursuspensionen, dadurch gekennzeichnet, dass man die geerntete Kultursuspension im natürlichen Zustand oder – bei Anwesenheit wasserlöslicher Alkaloidanteile – nach Verrühren mit einer quellfähigen Tonerde mechanisch trennt, das abgenommene Feuchtmycel bzw. Feuchtmycel-Adsorbens-Gemisch in der Wirbelschicht trocknet, mit organischen, aprotischen Lösungsmitteln extrahiert, den erhaltenen Extrakt mit verdünnten wässrigen Säuren extrahiert und den wässrigen Extrakt nach Alkalisierung mit organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln reextrahiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als quellfähige Tonerde 4 bis 5 Gewichtsprozent Bleicherde, Fullererde, Walkerde oder Bentonit verwendet werden und die Kultursuspension vor der mechanischen Trennung 30 min mit dem Adsorbens gerührt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirbelschichttrocknung des Feuchtmycels bzw. Feuchtmycels-Adsorbensgemisches bei 80 bis 90°C während 20 bis 40 min bis zu einer Ablufttemperatur von 50 bis 70°C und einer Restfeuchte von maximal 15% durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die fest-flüssige Extraktion mit niederen Alkylcarbonsäureestern, vorzugsweise Äthylacetat, Aceton oder halogenierten Kohlenwasserstoffen, vorzugsweise Chloroform oder Methylenchlorid vornimmt und das Trockenmycel bzw. Trockenmycel-Adsorbensgemisch vor der Extraktion mit 10 bis 20 Gew.% eines wässrigen Alkalis, vorzugsweise Ammoniakwasser, anquillt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man den erhaltenen Rohextrakt zur Entfernung nicht basischer Ballaststoffe im Verhältnis 2:1 bis 1:1 mit wässrigen Säuren, vorzugsweise 3 bis 5%iger Phosphorsäure oder Weinsäure, extrahiert.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die erhaltene wässrig-saure Phase nach Einstellen eines pH-Wertes von 8,0 bis 9,5 im Verhältnis 1:1 bis 3:1 mit einem niederen Alkylcarbonsäureester, vorzugsweise Äthylacetat oder einem halogenierten Kohlenwasserstoff, vorzugsweise Chloroform oder Methylenchlorid, reextrahiert.

Die Erfindung betrifft die industrielle Gewinnung von Mutterkornalkaloiden, insbesondere für therapeutische Zwecke, aus Submers- und Emerskulturen.

Es ist ein wesentliches Charakteristikum saprophytischer Mutterkornkulturen, dass sich die gebildeten Alkaloide (wasserlösliche Alkaloide vom Ergometrintyp, Clavine, z.T. auch Peptidalkaloide) mehr oder minder ausgeprägt auf Zellmasse und Flüssiganteile der Kultursuspension verteilen. Die bekannten technischen Lösungen zur Isolierung von Mutterkornalkaloiden tragen diesem Sachverhalt dadurch Rechnung, dass sie nach Trennung von Biomasse und Kulturfiltrat gesonderte Aufarbeitungsverfahren für beide oder eines der beiden Medien vorsehen (HU-PS 150 632, HU-PS 161 654, Zusatzp.z.HU-PS 150 631, DL-PS 41 967, OE-PS 259 770), die den speziellen Löslichkeitseigenschaften der jeweils gebildeten Alkaloide angepasst sind. So wird zur Isolierung des wasserlöslichen Ergometrins der Zusatz z.T. erheblicher Salzmengen empfohlen (Ung.Anm. R I-440); die in der HU-PS 142 407 vorgeschlagene Adsorption an Bentonit mit nachfolgender Extraktion des Adsorbats mittels wässrigen Alkohols erwies sich wegen der hohen Verluste durch Isomerisierung als ungünstig (siehe dazu HU-PS 142 406).

Es hat deshalb nicht an Versuchen gefehlt, den Isolierungsprozess durch eine Einstrang-Aufarbeitung der Kultursuspension technisch und ökonomisch günstiger zu getalten; so wird im DDR-Patent C 12d/165 516 die direkte Extraktion der Suspension beschrieben, doch mindern Emulsionsbildung und Isomerisierungsneigung in Abhängigkeit vom Verarbeitungsrhythmus den praktischen Wert dieses Verfahrens.

Ziel der Erfindung war die Entwicklung eines ökonomisch günstigen Aufarbeitungsverfahrens, das die Nachteile der bekannten Verfahren unter konsequenter Durchsetzung des Einstrangprinzips überwindet und universell auf alle Typen von Mutterkornalkaloiden in saprophytischer Kultur anwendbar ist.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass speziell die quellfähigen Tonerden wie Bentonit, Bleicherde, Fullererde oder Walkerde beim natürlichen pH-Wert der Kultursuspension ein ausserordentlich hohes Adsorptionsvermögen nicht nur für Ergometrin, sondern für alle untersuchten Mutterkornalkaloide der unterschiedlichsten Struktur aufweisen.

Es wurde weiter gefunden, dass so hergestellte Mycel-Adsorbens-Gemische durch Filtration oder andere Trennverfahren mechanisch gut abtrennbar sind.

Weiterhin wurde überraschend gefunden, dass sich die nach mechanischer Abtrennung erhaltenen alkaloidhaltigen Mycel-Adsorbensgemische ohne Isomerisierung oder Zersetzung der Alkaloide bei an sich unüblich hohen Temperaturen von 80–90°C durch Wirbelschichttrocknung unter Einhaltung bestimmter physikalischer Bedingungen in hervorragender Weise konservieren lassen. Die erhaltene, beliebig lagerfähige Trockenmycel-Adsorbens-Masse lässt sich nach Anquellen mit wenig schwachalkalischer wässriger Lösung mittels organischer, aprotischer Lösungsmittel schonend und vollständig extrahieren.

In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass sich das genannte Trocknungsverfahren auch auf solche Kulturen übertragen lässt, die alle gebildeten Alkaloide in der Biomasse enthalten, den Zusatz von Adsorbentien also nicht erforderlich machen. Auch hier wird nach mechanischer Abtrennung und Trocknung in der Wirbelschicht ein lagerfähiges Trockenmycel erhalten, dessen Aufarbeitung unabhängig vom Erntetermin vorgenommen werden kann.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist im Anspruch 1 definiert.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass man die geerntete, ein beliebiges Spektrum an Mutterkornalkaloiden wie Ergokryptin/Ergotamin/Ergocristin/Ergocornin/Ergometrin/Lysergsäure/Agroclavin/Ergosin oder andere enthaltende Kultursuspensionen bei Anwesenheit wasserlöslicher Anteile im Spektrum zunächst mit 4 bis 5 Gew.-% (bezogen auf Erntevolumen) einer quellfähigen Tonerde ca 30 min verrührt, die festen und flüssigen Anteile mechanisch, z.B. durch Filtration trennt, das erhaltene Feuchtmycel bzw. Feuchtmycel-Adsorbens-Gemisch in der Wirbelschicht bei 80–90°C während 20 bis 40 min bis zu einer Ablufttemperatur von 50 bis 70°C und einer Restfeuchte von maximal 15% trockent, das Trockenmycel bzw. Trockenmycel-Adsorbens-Gemisch nach Ansteigen mit einer wässrigen, schwach alkalischen Lösung, z.B. 15%igem Ammoniakwasser, der Extraktion mit einem aprotischen organischen Lösungsmittel, z.B. einem niedern Alkylcarbonsäureester, Aceton oder einem halogenierten Kohlenwasserstoff unterzieht, den erhaltenen Extrakt zur Entfernung nichtbasischer Ballaststoffe der flüssig-flüssig-Extraktion mit einer wässrig-sauren Phase mit Volumenverhältnis 2:1 bis 1:1 extrahiert und die wässrige, die Gesamtalkaloide enthaltende Lösung nach Alkalisierung bis zu einem pH-Wert im Bereich 8 bis 9,5 mit einem organischen, mit Wasser nicht mischbaren

Lösungsmittel, vorzugsweise Äthylacetat, im Verhältnis 1:1 bis 3:1 reextrahiert.

Die weitere Verarbeitung des vorgereinigten Extraktes erfolgt in an sich bekannter Weise unter Berücksichtigung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der betreffenden Alkaloide.

Beispiel 1a

200 l Kultursuspension des Stammes Claviceps purpurea (Fr.) Tul. IMET PA 130 (hinterlegt am 29. Juni 1972 beim Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena) wird mit 8 kg Bentonit 30 min verrührt und anschliessend über ein Vakuumdrehzellenfilter mit 10 mm Schicht aus Calziumsulfat-Dihydrat filtriert. Das praktisch alkaloidfreie Filtrat wird verworfen; das abgenommene Feuchtmycel-Bentonit-Gemisch trocknet man in der Wirbelschicht bei einer Zulufttemperatur von 90°, bis eine Ablufttemperatur von 60° erreicht wird (Dauer ca 30 min). Man erhält 20 bis 24 kg Trockenmycel-Bentonit-Gemisch mit einer Restfeuchte von 3–5%, das 95–100% des in der Kultursuspension bestimmten Ergotoxins und 92–96% des Ergometrins enthält.

Die morphologischen und mikroskopischen Eigenschaften des oben erwähnten Stammes gehen aus der folgenden Übersicht hervor.

Tabelle 1

Morphologische Eigenschaften von Claviceps purpurea, Stamm IMET PA 130, auf verschiedenen Agarmedien nach 14-tägiger Bebrütung in Petrischalen bei 24°C

Medium 1

(3 % Sacharose, 0,3 % NaNO, 0,1 % K_2HPO_4, 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 % KCl, 0,001%$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1% Maisquellwasser, 3% Agar; pH 6,8–6,9)

Kolonieform:
Erhabene, kompakte, unregelmässig und stark gefaltete Kolonie; Unterseite glatt, nicht vom Boden der Platte abgehoben.

Koloniedurchmesser:
1,0–1,5 cm

Koloniefarbe:

Oberseite hellbraun bis violett, Rand weiss; Unterseite braun, Rand hellbraun.
Durchschnittliche Versporung:
$46{,}3 \times 10^6$ Konidien/Kolonie

Medium 2

(15 % Bierwürze, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % $(NH_4)_2PO_4$, 0,1% Ammoniumzitrat, 3% Agar; pH 5,0)

Kolonieform:
Mitte erhaben, mit kraterförmiger Einsenkung; Rand radial gefaltet; Agar durchwachsen, Kolonie vom Boden der Platte abgehoben.
Koloniedurchmesser:
2–3 cm
Koloniefarbe:
Ober- und Unterseite hellgrau.
Durchschnittliche Versporung:
$34{,}1 \times 10^6$ Konidien/Kolonie

Medium 3

(2 % Glukose,
50 % wässriger Kartoffelextrakt,
3 % Agar;

Kolonieform:
Mitte erhaben, mit kraterförmiger Einsenkung: Agar durchwachsen, Kolonie vom Boden der Platte abgehoben.
Koloniedurchmesser:
1,5–2,0 cm
Koloniefarbe:
Oberseite grauviolett; Unterseite graubraun.
Durchschnittliche Versporung:
$3{,}3 \times 10^6$ Konidien/Kolonie

Mikroskopische Charakteristik der Konidien und Hyphen
Die Konidien weisen in allen Fällen eine ellipsoide Form mit Abmessungen von 6–10 µm (grosse Achse) bzw. 4–8 µm (kleine Achse) auf. Die Substrathyphen haben eine Länge bis zu 200 µm und einen Durchmesser von 4–8 µm. Bei blasigen Auftreibungen beträgt der Durchmesser 8–16 µm. Es treten Lufthyphen auf, deren Länge über 200 µm und deren Durchmesser nur 2–4 µm betragen.

Beispiel 2a

100 l Kultursuspension des unter Beispiel 1a bezeichneten Claviceps-purpurea-Stammes wird mit 5 kg Bleicherde 1 Stunde verrührt, filtriert und das Feuchtmycel-Bleicherde-Gemisch in der Wirbelschicht während 15 min bei 80–90° bis zu einer Ablufttemperatur von 50° getrocknet. Man erhält 12 kg Trockenmycel-Bleicherde-Gemisch mit eienr Restfeuchte von 10–12% und einem Alkaloidgehalt von 92–100% bezogen auf Kultursuspension.

Beispiel 1b

10 kg eines gemäss Beispiel 1a oder 2a hergestellten Trokkenmycel-Adsorbens-Gemisches werden mit 1,5 l 1:2 verdünntem Ammoniakwasser angeteigt, nach einer Quellzeit von 5–10 min mit 40 l Äthylacetat in 2 Portionen jeweils 15 min mit dem Ultra-Turrax verrührt und abgesaugt; den Gesamtextrakt gibt man mit 20 l 3%iger wässriger Phosphorsäure durch den Separator. Die schwere Phase wird mit 8 l Äthylacetat überschichtet, unter Rühren durch Zugabe von konzentriertem Ammoniakwasser auf pH 8,5 bis 9,0 eingestellt und 10 min gerührt. Nach Phasentrennung wird die Extraktion mit 6 bis 8 l Äthylacetat noch zweimal wiederholt. Der Gesamtextrakt wird im Vakuum-Umlauf-Verdampfer, Fallstromverdampfer oder einem anderen schonenden Eindampfverfahren auf 0,3 bis 0,6 l konzentriert, mit dem doppelten Volumen Chloroform versetzt und das Ergometrin in Form des schwerlöslichen Chloroform-Adduktes abgetrennt. Aus dem Filtrat gewinnt man nach adsorptionschromatographischer Reinigung im Säulen- oder Batchverfahren das Ergotoxin als Benzol- oder Toluoladdukt.

Beide Addukte sind dünnschichtchromatographisch rein und haben einen Alkaloidgehalt von 96 bis 103% ber. als Bimaleinat. Die Ausbeute beträgt 58,6 g Ergotoxin-Toluoladdukt = 72% bezogen auf Kultursuspension und 40,5 g Ergometrin-Chloroformaddukt = 82% bezogen auf Kultursuspension.

Beispiel 2b

60 kg eines gemäss Beispiel 1a oder 2a gewonnenen Trokkenmycel-Adsorbens-Gemisches werden mit 7,5 l 1:1 verdünntem Ammoniakwasser verknetet, im Rührextraktor mit

150 l Chloroform oder Methylenchlorid über 45 min extrahiert, der Extrakt unter Druck filtriert und die Extraktion mit dem gleichen Volumen des Lösungsmittels über 30 min wiederholt.

Den Gesamtextrakt gibt man mit 5%iger wässriger Weinsäure im Verhältnis 1:1 durch den Separator, stellt die Wasserphase kontinuierlich auf pH 9 ein und separiert ein zweites Mal mit dem gleichen Lösungsmittel oder mit Äthylacetat im Verhältnis 2:1. Nach Eindampfung, Ergometrin-Abtrennung und Ergotoxin-Fällung erhält man die Addukte in der im Beispiel 1b genannten Ausbeute und Qualität.

Beispiel 3

30 l Kulturlösung des ergosinbildenden Stammes Claviceps purpurea IMET PA 134 werden beim natürlichen pH-Wert (5–6) 30 min mit 1,2 kg Bentonit verrührt, über eine Schicht aus Calziumsulfat-Dihydrat abgesaugt und das Filtrat verworfen. Die Trocknung des Feuchtmycel-Bentonit-Gemisches gemäss Beispiel 1a liefert 2,8 kg lagerfähiges Trockenmycel-Bentonit-Gemisch, das die in der Kultursuspension analytisch bestimmten Alkaloide (Ergosin/Ergosinin/Spuren Chanoclavin) zu praktisch 100% enthält.

Der Extraktionseffekt bei der Rührextraktion mit der 10- bis 12fachen Menge Äthylacetat beträgt i.D. 90% bezogen auf den Gehalt des Trockenmycel-Bentonit-Gemisches.

Der Stamm Clariceps purpurea IMET PA 134 ist am 28.Januar 1977 beim Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena hinterlegt worden. Er besitzt die folgenden makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften:

Mikroskopisches Aussehen

Auf den in der Tabelle 2 genannten Agarmedien bestehen die Kolonien aus mehr oder weniger stark verzweigtem Mycel, das eine Dicke von durchschnittlich 4–5 µ besitzt. An den Verzweigungen wurden 7–8 µ gemessen. Konidien wurden nicht beobachtet, auf üblichen Sporulationsmedien (z.B. M10) zerfiel dagegen das Mycel in z.T. sehr kleine Bruchstücke (auch in flüssiger M10-Kultur). Fett-Tröpfchen in relativ geringer Anzahl konnten nur auf Medium 846 und 829 beobachtet werden.

Das Mycel der submersen Kulturen (ca. 14 Tage alt, Produktionsmedium) besteht aus langen, verzweigten Hyphen mit einer Dicke von ca. 5 µ. Die Hyphen haben z.T. kugelförmig abgerundete Anschwellungen und enthalten viele Fett-Tröpfchen, Konidien wurden nicht beobachtet.

Makroskopisches Aussehen

Das makroskopische Aussehen wurde bei Kulturen festgestellt, die bei 24 ± 1°C auf Agarschalen (∅ 10 cm) während 14–16 Tagen gewachsen waren. Die Zusammensetzung der Medien ist Tab. 1 zu entnehmen.

Medium M10
sehr gutes Wachstum mit gefalteter, sich teilweise abhebender Oberfläche, braune Pigmentierung Rückseite teilweise mit dunklen Flecken, keine Konidien

Medium 846
gutes Wachstum, Kolonien mit gefalteter, gekröseartiger Oberfläche, braun, Rückseite hellbraun, keine Konidien

Medium 829
gutes Wachstum. Die hellbraunen bis braunen Kolonien besitzen eine gefaltete, krause Oberfläche und einen unregelmässigen Rand. Die Rückseite ist hellbraun

Medium 784
gutes Wachstum. Die Kolonien haben eine braune Oberseite und eine farblose Unterseite. Sie sind gefaltet, kraus und besitzen einen unregelmässigen Rand. Keine Konidien.

Tabelle 2

Zur Kultivation auf Agar verwendete Medien

Komponenten	Medien			
	M10	NL846	NL 829	NL 784
Bierwürze (ungehopfte Vorderwürze, 15%)	330 ml			
Hefeextrakt	3 g		0,5 g	3,0 g
Saccharose		100,0 g	100,0 g	
Glucose				50,0 g
Ammoniumcitrat		15,0 g		
L-Asparagin			10,0 g	
Neo-Pepton				3,0 g
$Ca(NO_3)_2$		1,0 g	1,0 g	
KH_2PO_4		0,25 g	0,25 g	0,5 g
$FeSO_4.7H_2O$		10,0 mg	20 mg	20 mg
$ZnSO_4.7H_2O$		4,4 mg	20 mg	17,6 mg
$MgSO_4.7H_2O$		0,3 g	0,25 g	0,3 g
KCl		0,2 g		
Agar-Agar	25-30 g	30 g	25-30 g	25-30 g
Wasser	ad 1000.0	ad 1000.0	ad 1000.0	ad 1000.0
pH	5.5	5.6-5.8	5.4-5.6	5.5
Sterilisation	30 Min., 110°C	30 Min., 110°C	30 Min., 110°C	30 Min., 110°C

Beispiel 4

20 l Kultursuspension des im Beispiel 3 genannten Stammes werden ohne Zusatz eines Adsorptionsmittels über eine 20 mm Schicht aus Calziumsulfat-Dihydrat filtriert; das Filtrat, das nur Spuren Ergosin und einen Teil der Begleitalkaloide enthält, wird verworfen. Das isolierte Feuchtmycel

wird sofort in der Wirbelschicht bei 90° bis zur Ablufttemperatur von 60° getrocknet (Dauer ca. 40 min). Man erhält 0,8 bis 1,0 kg eines lagerfähigen Trockenmycels, das 96–100% des in der Kultursuspension bestimmten Ergosins sowie Spuren der Begleitalkaloide enthält.

Zur Gewinnung des Alkaloids wird das Trockenmycel nach Anteigen mit 150 ml 10%igem Ammoniakwasser unter Rühren mit 8 l Chloroform in 2 Portionen extrahiert und nach Überführung in die wässrig-saure Phase, Reextraktion und Eindampfung aus dem erhaltenen Konzentrat mit Weinsäure als Rohtartrat gefällt.

Beispiel 6

20 l Kultursuspension des im Beispiel 5 genannten Stammes werden ohne Zusatz eines Adsorptionsmittels über eine 20 mm Schicht von Calziumsulfat-Dihydrat filtriert; das Filtrat das nur Spuren Ergotamin und einen Teil der Begleitalkaloide enthält, wird verworfen. Das isolierte Feuchtmycel wird sofort in der Wirbelschicht bei 90°C bis zur Ablufttemperatur von 60°C getrocknet (Dauer ca. 40 Minuten). Man erhält 0,8 bis 1,0 kg eines lagerfähigen Trockenmycels das 96–100% des in der Kultursuspension bestimmten Ergotamins sowie Spuren der Begleitalkaloide enthält.

Zur Gewinnung des Ergotamins wird das Trockenmycel nach Anteigen mit 150 ml 10%igem Ammoniakwasser unter Rühren mit 8 l Chloroform in 2 Portionen extrahiert und nach Überführung in die wässrig-saure Phase, Reextraktion und Eindampfung aus dem erhaltenen Konzentrat mit Weinsäure als Rohtartrat gefällt.

Beispiel 5

20 l Kultursuspension des beim Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie in Jena/DDR unter der Nr. IMET PA 135 hinterlegten ergotaminbildenden Stammes Claviceps purpurea (Fr.) Tul. werden mit 1 kg Bentonit versetzt, 30 Minuten gerührt und abgesaugt. Das Filtrat (18 l) ist praktisch alkaloidfrei und wird verworfen. Die Trocknung des Filterkuchens in der Wirbelschicht liefert 1,8 kg Trockenmycel-Bentonit-Gemisch, das sowohl das Hauptalkaloid Ergotamin als auch die Nebenalkaloide Ergokryptin, Ergometrin und Ergosin in 100%iger Ausbeute in der ursprünglichen Relation von 28:4:3:1 enthält.

Die Extraktion mit Äthylacetat, Überführung in die saure wässrige Phase und Reextraktion erfolgen in Analogie zu Beispiel 1b oder 2b. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhält man chemische Ausbeuten zwischen 60 und 70% bezogen auf die Kultursuspension.