



PATENTSCHRIFT 138 223

Wirtschaftspatent

Teilweise aufgehoben gemäß § 6 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

Int. Cl.³

(11) 138 223 (45) 24.12.80 3(51) C 12 P 17/18
C 07 D 519/02
(21) WP C 12 D / 202 793 (22) 20.12.77
(44)¹ 17.10.79

-
- (71) siehe (72)
- (72) Grawert, Werner; Neumann, Brigitte, Dipl.-Chem.; Schiedt, Ludwig, Dipl.-Chem.; Heidenbluth, Karlheinz, Dr.rer.nat. Dipl.-Chem.; Dauth, Christoph, Dr.rer.nat. Dipl.-Chem.; Schirutschke, Rudolf, Dipl.-Chem.; Müller, Monika, DD
- (73) siehe (72)
- (74) VEB Arzneimittelwerk Dresden, Stammbetrieb des VEB Pharm. Kombinat GERMED Dresden, Büro für Neuererbewegung und Schutzrechte, Patentgruppe, 8122 Radebeul 1, Wilhelm-Pieck-Straße 35 PSF 89-90
-
- (54) Verfahren zur Isolierung von Mutterkornalkaloiden aus Kultursuspensionen
-

¹ Ausg. statt der Patentschrift für das ge. 2 5 5 Absatz 1 AnzG zum PatG erteilte Patent

Titel der Erfindung

Verfahren zur Isolierung von Mutterkornalkaloiden aus Kultursuspensionen

Anwendungsgebiet der Erfindung

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

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

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 gestalten; 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

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.

Darlegung des Wesens der Erfindung

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 Wesen der Erfindung besteht somit 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 % trocknet, das Trockenmycel bzw. Trockenmycel-Adsorbens-Gemisch bei Bedarf nach Anteigen 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 gegebenenfalls zur Entfernung nichtbasischer Ballaststoffe der flüssig-flüssig-Extraktion mit einer wäßrig-sauren Phase im Volumverhältnis 2 : 1 bis 1 : 1 zuführt 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 Athylacetat, 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.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

200 l Kultursuspension des Stammes *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IMET PA 130 (hinterlegt 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 Calciumsulfat-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.

Beispiel 2

100 l Kultursuspension des unter Beispiel 1 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 einer Restfeuchte von 10 - 12 % und einem Alkaloidgehalt von 92 - 100 % bezogen auf Kultursuspension.

Beispiel 3

10 kg eines gemäß Beispiel 1 oder 2 hergestellten Trockenmycel-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 4

60 kg eines gemäß Beispiel 1 oder 2 gewonnenen Trockenmycel-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 3 genannten Ausbeute und Qualität.

Beispiel 5

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 Calciumsulfat-Dihydrat abgesaugt und das Filtrat verworfen. Die Trocknung des Feuchtmycel-Bentonit-Gemisches gemäß Beispiel 1 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 12-fachen Menge Äthylacetat beträgt i. D. 90 % bezogen auf den Gehalt des Trockenmycel-Bentonit-Gemisches.

Beispiel 6

20 l Kultursuspension des im Beispiel 5 genannten Stammes werden ohne Zusatz eines Adsorptionsmittels über eine 20 mm Schicht aus Calciumsulfat-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 Trockenmycel, 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.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Isolierung von Mutterkornalkaloiden aus Kultursuspensionen, dadurch gekennzeichnet, daß man die geerntete Kultursuspension im natürlichen Zustand nach Verrühren mit quellfähigen Tonerden mechanisch, z. B. durch Filtration trennt, das Feuchtmycel-Adsorbensgemisch in der Wirbelschicht trocknet, mit Ammoniakwasser anquillt, mit organischen, aprotischen Lösungsmitteln extrahiert und den Extrakt in bekannter Weise aufarbeitet.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als quellfähige Tonerde 4 - 5 Gewichtsprozent Bentonit verwendet und die Kultursuspension vor der mechanischen Trennung 30 Minuten mit dem Adsorbens gerührt wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirbelschichttrocknung des Feuchtmycel-Adsorbensgemisches bei 80 - 90 °C während 20 - 40 Minuten bis zu einer Ablufttemperatur von 50 - 70 °C und einer Restfeuchte von maximal 15 % durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als aprotische Lösungsmittel für die fest-flüssig-Extraktion niedere Alkylcarbonsäureester, vorzugsweise Äthylacetat, Aceton oder halogenierte Kohlenwasserstoffe, vorzugsweise Chloroform oder Methylenchlorid verwendet und das Trockenmycel-Adsorbensgemisch vor der Extraktion mit 10 - 20 Gewichtsprozent Ammoniakwasser anquillt und den Rohextrakt in bekannter Weise aufarbeitet.