



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209196

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 02 09 76

(21) (PV 5717-76)

(40) Zveřejněno 27 02 81

(45) Vydáno 01 02 83

(51) Int. Cl.³

C 12 P 1/02

(75)

Autor vynálezu

BOROWSKI EVA, BRAUN KLAUS dipl. chem., BREUEL KLAUS dr.,
DAUTH CHRISTOPH dr. dipl. chem., ERGE DIETER dr.,
GRAWERT WERNER ing. chem.,
GRÖGER DETLEV prof. dr., HÖHNE LISELOTTE med. techn.,
KNOTHE EDDA ing. biol., MÜLLER MONIKA ing. chem.,
NORDMANN GISELA dipl. biol., SCHIRUTSCHKE RUDOLF dipl. chem. a
VOLZKE KLAUS-DIETER dipl. biol., DRÁŽDANY (NDR)

(54) Způsob fermentativní výroby derivátů ergolinu

Vynález se týká způsobu průmyslového získávání derivátů ergolinu, zejména alkaloidů a 9,10-dihydroalkaloidů skupiny ergotoxinu, jakož i ergometrinu, při němž se kultivuje nový kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. submersně v umělých prostředích a při tom vzniklé námelové alkaloidy se získávají z fermentační kapaliny a popřípadě hydrogenují v poloze 9,10. Vysoká terapeutická hodnota těchto alkaloidů a 9,10-dihydroalkaloidů je známa a tyto se používají v interním lékařství, neurologii a gynekologii.

Průmyslové získávání námelových alkaloidů se ještě dnes, jak je známo, provádí ve velkém rozsahu polní kultivací sklerocií mikroorganismu *Claviceps purpurea*, parazitujícího na žitu, obsahujících alkaloidy. Aby se obešly s tímto spojené nevýhody, konají se již delší dobu pokusy přimět *Claviceps purpurea* k tvorbě alkaloidů i za neparasitárních podmínek.

Podle všeobecných zkušeností se pro takovouto biosyntézu námelových alkaloidů, prováděnou při kultivaci na umělých prostředích, hodí jen velmi málo výslovně k tomuto účelu kultivovaných kmenů *Claviceps*.

Vzhledem k tomu, že složení spektra alkaloidů těchto kmenů je v souladu s místem výskytu různé, tvoří opět pouze část z nich alkaloidy skupiny ergotoxinu, které se terapeuticky liší od obzvláště cenných námelových alkaloidů typu peptidů.

Přes existenci několika takových, v podrobnostech blíže popsáných kmenů (srovnej maďarský patentový spis č. 150 380, DD patentový spis 41 967, brit. patentový spis 1 158 380, DE patentové spisy 1 806 984, 1 909 216) není však problémem saprofytického získávání alkaloidů skupiny ergotoxinů samotných nebo v kombinaci s jinými námelovými alkaloidy v průmyslovém měřítku v žádném případě vyřešen. Pro kontinuální výrobu je předpokladem, že je běžně k dispozici ve velkém množství, jakož i jednoduchým a bezpečným způsobem dosažitelný, produkce schopný výchozí materiál kmene jako inokulum pro fermentační proces. K tomuto v technické mikrobiologii obvyklá a nejpříznivější metoda spočívá v použití speciálních rozmnožovacích jednotek organismu (konidiospor), které dovolí nejen udržet stálé, požadované vlastnosti kmene po mnoho roků pomocí lyofilizovaných konserv spor, bez nejvyšší kompli-

209196

kovaného a nákladného vedení kmene, jak je to popsáno v DE patentovém spise č. 1 206 384, nýbrž především na základě jejich vysokého počtu na objemovou jednotku naočkovat malým množstvím inokula velká množství živného roztoku.

Použití této metody předpokládá určitou, rovněž v dědičném materiálu fixovanou vlastnost kmene, totiž za odpovídajících podmínek vytvořit velký počet spor s vysokou potencí k biosyntéze alkaloidů, takže se naočkování živného roztoku může provádět i při velkoprovozních podmínkách suspensí konidiospor. Ale právě tato vlastnost chybí úplně nebo téměř úplně, jak je to jasně zřejmé z maďarského patentového spisu č. 150 631, jakož i u AMICI aj. (Appl. Microbiology 18 (1969), str. 464–468), popsaným kmenům *Claviceps purpurea*, tvořícím v saprofytické kultuře alkaloidy skupiny ergotoxinu, takže v důsledku nutného mezistupně pomnožování očkovacího materiálu na pevných živných půdách a potřebné homogenizace takto získaného mycelia za sterilních podmínek pro zařízení předkultur dochází k nepříznivým předpokladům pro objem průmyslové výroby.

Ze známých pramenů rovněž vyplývá, že u těchto tvůrců ergotoxinu přechází až do ukončení fermentačního procesu pouze malá část ergotoxinu, vznikajícího v buňkách, buněčnou stěnou do okolního vodného kultivačního prostředí.

Podle toho je pro úplné získání vytvořeného alkaloidu nezbytné oddělené zpracování jak filtrátu kultury, tak i mycelia. Vysoký podíl pigmentu a balastních látek, který je zpravidla tvořen takovými kmeny, které se hodí pro biosyntézu námellových alkaloidů v submersní kultuře, je kromě toho příčinou komplikovaného způsobu zpracování, při neuspokojivých výtěžcích látek. Tak se podle GB patent. spisu č. 1 158 380 extrahuje získaný filtrát kultury chloroformem při pH 9, získaný extrakt se extrahuje vodnou kyselinou vinnou, takto získaný vodný extrakt se extrahuje znovu chloroformem při pH 9 a tento extrakt se spojí s čistěným extraktem mycelia, získaným podobně komplikovaným způsobem, odpaří se a surové báze alkaloidu se vysrážejí hexanem. Ze získané sraženiny se oddělí ledovou kyselinou octovou, methanolem a kyselinou sírovou síran ergotaminu, zbytek se odpaří, jeho vodný roztok se při pH 9 znovu extrahuje chloroformem, koncentrovaný chloroformový extrakt se chromatografuje na 100násobném množství silikagelu a konečně se takto vyčištěný ergokryptin izoluje jako báze z benzenu. Z další chromatografické frakce se po odpaření a rozpuštění zbytku ve vodném acetonu získá další ergotamin.

Ani další vývoj obecných způsobů, uvedených v GB patentovém spise č. 1 158 380 a US patentovém spise č. 3 485 722, pro izolaci peptidických námellových alkaloidů nevedl u kultur dole blíže popsaného nového kmene *Claviceps purpurea* k úspěchu. Rušivě se při tom projevil především silný sklon filtrátu kultury a extraktu mycelia k tvorbě emulze při extrakci chloroformem. Dále

se nepodařilo ani převést ergotoxin v krystalickou bázi ani dosáhnout v jiných patentových spisech uvedených výtěžků u nekrystalických koncentrátů čistého a surového alkaloidu.

Podle DD patentu č. 41 967 se extrakt získaný o sobě známým způsobem ze suspense kultury obsahující malé koncentrace alkaloidů, který obsahuje vedle sebe ergotoxin a erometrin, chromatografuje elučními činidly s rostoucí polaritou a jednotlivé alkaloidy se krystalují o sobě známým způsobem. Je však všeobecně známo, že eluce rozpouštědly obsahujícími methanol vede k ergometrinu s neuspokojivě vysokými podíly pigmentu.

Trpková hydrogenace ergotoxinu se provádí podle DE patentového spisu č. 883 153 a kanadského patentového spisu č. 470 573 vysoce aktivním paládiem, popřípadě paládiem fixovaným na nosiči. Takovýto způsob vede, zřejmě v důsledku neuspokojující selektivity, k nežádoucímu obsahu pigmentu v hydrogenačních produktech, v důsledku čehož jsou nezbytné další čistící kroky.

Účelem vynálezu je zlepšit průmyslovou výrobu derivátů ergolinu, zejména alkaloidu a 9,10-dihydroalkaloidů skupiny ergotoxinu, jakož i ergometrinu. Klade si za základní úlohu uvést odpovídající způsob.

Bylo nalezeno, že kmen *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul, který tvoří za přítomnosti umělých živných prostředí, obsahujících anorganické sloučeniny dusíku, cukr, organické kyseliny a obvyklé anorganické soli, v submersní kultuře alkaloidy skupiny ergotoxinu, ergometrinu, jakož i další deriváty ergolinu, vykazuje jak pro průmyslové využití velmi příznivou syntézu alkaloidů, tak také tvoří na pevných nebo kapalných médiích za určitých podmínek množství spór s vysokou potencí pro syntézu alkaloidů, nejvýš výhodné pro fermentačně technické zájmy.

Kromě toho je vytvořený ergotoxin ze značné části a ergometrin jako obvykle prakticky úplně obsažen ve fermentačním prostředí obklopujícím mycelium.

Dále bylo nalezeno, že se filtrát kultury, získaný filtrací suspense kultury nového kmene *Claviceps purpurea*, bez zředění, avšak lépe po zředění stejným objemem vody, nastavený amoniakem na hodnotu pH 8 až 9, dá extrahovat nízkými estery alkankarboxylových kyselin, jejichž složku kyseliny představuje kyselina octová a jejichž alkoholickou složku představuje alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, s výhodou ethylacetátem, u varianty zředění však i chlorovanými uhlovodíky, s výhodou methylenchloridem, prakticky úplně a bez rušivé tvorby emulze. Při tom dochází u varianty zředění vedle požadovaného snížení podílu balastních látek k překvapivě významnému zvýšení množství ergotoxinu obsaženého ve filtrátu kultury.

Biomasa odpadající po filtraci se může v závislosti na obsahu zbytků alkaloidů extrahovat acetonem, bezbarvý extrakt, získaný filtrací, se po

nastavení vodnými kyselinami, s výhodou kyselinou fosforečnou, na pH 2 až 3 čistí směsí uhlovodíků, jako petroletherem nebo směsí petroletheru a xylenu, vyloučená vodná fáze se po nastavení vodným roztokem amoniaku na pH 8 až 9 extrahuje nízkými estery alkankarboxylových kyselin, s výhodou ethylacetátem, a získaný extrakt se promývá vodou.

Dále bylo nalezeno, že je kromě toho překvapivě a elegantním způsobem možné extrahovat námelové alkaloidy přímo z kapaliny kultury nového kmene *Claviceps purpurea*, zalkalizované amoniakem, bez předchozího oddělení biomasy, za přídavku síranu amonného nízkými estery alkankarboxylových kyselin, s výhodou ethylacetátem, a extrakcí kapalina-kapalina zředěnými vodnými kyselinami, s výhodou kyselinou fosforečnou, jakož i následující extrakcí kapalina-kapalina získaného vodného extraktu při pH 8 až 9 nízkými estery alkankarboxylových kyselin, s výhodou ethylacetátem, je zbavit rušivých průvodních látek.

Extrakty alkaloidů čištěné vpředu uvedeným způsobem se mohou odpařit při teplotě 25 až 30 °C a získané koncentráty se mohou podrobit diferencovanému konečnému dočištění alkaloidů.

Dále bylo nalezeno, že ve srovnání s DD patentovým spisem č. 41 967 je pro získání čistých alkaloidů výhodné, když se surové koncentráty alkaloidů získané shora uvedeným způsobem rozpustí v 1 až 3 objemových dílech chloroformu, roztoky se uchovávají při teplotě 4 až 10 °C, s překvapením prakticky kvantitativně vykrystalovalší chloroformový adukt ergometrinu, obsahující jen malé množství pigmentu, se oddělí a převede v adiční soli s kyselinou, vysokého stupně čistoty, s výhodou v hydrogenmaleinan. Filtrát získaný po oddělení ergometrinu se může nyní nerušeně zkoncentrovat při teplotě 25 až 30 °C, výhodně adsorpcí a následující desorpcí přetržitým způsobem nebo sloupcovou chromatografií za použití kysličníku hlinitého ve vhodném poměru 1 : 20 nebo v poměru 1 : 5, počítáno na celkové množství alkaloidů v koncentrátu alkaloidů, za přídavku aktivního uhlí (poměr adsorpčního činidla kysličníku hlinitého : aktivnímu uhlí 5 : 1) a nízkých esterů alkankarboxylových kyselin, s výhodou ethylacetátu nebo chlorovaných uhlovodíků, s výhodou chloroformu, nebo dvousložkových směsí vpředu uvedených rozpouštědel, smíšených navzájem nebo s aromatickými uhlovodíky, s výhodou benzenem, načež se tyto po odpaření extraktů nebo eluátů při teplotě 25 až 30 °C ve směsi ergotoxin-ergotoxininu převedou krystalizací z aromatických uhlovodíků, jako benzenu, toluenu nebo xylenu, na vysoce čisté, krystalické adukty ergotoxinu a aromátů, prosté epimerů, a tyto adukty se popřípadě převedou v adiční soli ergotoxinu s kyselinami, s výhodou v ethansulfonát.

Dále bylo nalezeno, že se ergotoxin získaný shora uvedeným způsobem může hydrogenovat buď v přítomnosti méně aktivního Raney-ova niklu při 50 až 70 °C, s výhodou 60 °C, a při tlaku vodíku

3 až 7 MPa, s výhodou při 5 MPa, v dioxanu, nebo i při normálním tlaku a 20 až 30 °C, s výhodou 25 °C, v přítomnosti 5 až 10% paládiového katalyzátoru ve vodném dioxanu cirkulačním způsobem na 9,10-dihydroergotoxin, prostý pigmentu. Hydrogenované báze se převedou o sobě známým způsobem v galenicky využitelné adiční soli kyselin, s výhodou hydrogenmaleinan a ethansulfonát.

Nový kmen, získaný kultivací, s až dosud neznámými znaky, pro technicky a ekonomicky výhodnou průmyslovou výrobu námelových alkaloidů, zejména alkaloidů skupiny ergotoxinu a ergometrinu, byl uložen v Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena der Deutschen Akademie der Wissenschaften v Berlíně a nese číslo IMET PA 130.

Kmen byl selektivně oddělen z kultury, která pochází ze sklerocia z pokusné parcely, a byl mutagenně zpracován. Vykazuje v tabulce 1 shrnuté morfologické vlastnosti.

Vynález bude dále blíže vysvětlen na několika příkladech provedení.

Příklad 1

Pro kultivaci konidiospor se vyrobí z konzervy kmene, obsahující spory usušené lyofilizací v odstředěném mléce, suspense, která se přenesou na 3% agarové prostředí (pH 6,0) s 15 % pivovarské sladiny, 0,5 % kvasničného extraktu, 0,5 % hydrogenfosforečnanu amonného a 0,1 % citranu amonného a inkubuje se 14 dní při 19 °C jako kultura na šikmém agaru. Jako očkovací materiál pro submersní kultury se podle tohoto způsobu získá v 1000 ml jenských širokohrdlých lahvích $1 \cdot 10^{10}$ spor/nádobu kultury, jimiž se v případě potřeby může očkovat až 120 l živného roztoku.

Příklad 2

Výroba inokula se provádí suspendováním spor, kultivovaných podle příkladu 1, které se přenesou v koncentraci $1 \cdot 10^5$ spor/ml do kapalného prostředí, které obsahuje 15 % pivovarské sladiny a 2 % kvasničného extraktu. Kultivace se provádí při 22 °C v 500 ml kulatých baňkách se 120 ml kapalného prostředí na třepačce s kruhovým vibračním pohybem. Kultura obsahuje po 14 dnech $6 \cdot 10^9$ spor/baňku, které se používají jako očkovací materiál pro fermentaci alkaloidů.

Příklad 3

Výroba inokula pro kultivaci spor se provádí podle příkladu 1. Jako živná půda se použije 3% agarové médium (pH 6,8 až 6,9), které obsahuje 3 % sacharózy, 0,3 % dusičnanu sodného, 0,1 % hydrogenfosforečnanu draselného, 0,05 % síranu hořečnatého $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % chloridu draselného, 0,001 síranu železnatého $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1 % vody z kukuřičných klíčků.

V 500 ml úzkohrdlých lahvích z průmyslového skla se v kultuře na šikmém agaru získá po 14denní inkubaci při 24 °C $3 \cdot 10^9$ spor (nádobu), kultury

209196

které se mohou používat pro submersní kultury k syntéze alkaloidů.

Příklad 4

Spory kultury očkovacího materiálu, kultivované podle příkladu 1, se suspendují a část se z nich rozdělí jako inokulum ve stejných množstvích na kulaté baňky s plochým dnem (kapacita 500 ml) s prostředím předkultury po 120 ml 10 % sacharózy, 1,5 % citranu amonného, 0,1 % dusičnanu vápenatého, 0,025 % dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,01 % chloridu draselného, 0,03 % síranu hořečnatého, 0,0001 % síranu železnatého, 0,0004 % síranu zinečnatého; destilovaná voda; pH 5,5; sterilizace 30 minut při 0,05 MPa. Baňky se třepají při 24 °C na třepačce s kruhovým kmitavým pohybem (175 ot/min). Po sedmi dnech se obsah baněk přeočkuje vždy po 150 ml přestředí hlavní kultury (20 % sacharózy, 1 % citranu amonného, 0,1 % dusičnanu vápenatého, 0,025 % dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,01 % síranu železnatého, 0,0004 % síranu zinečnatého; destilovaná voda; pH 5,5; sterilizace 30 minut při 0,05 MPa) v poměru 1 : 10 na Erlenmayerovy baňky. Tyto baňky se třepají za stejných podmínek jako předtím.

Po 14 dnech se pomocí van Urkovy reakce prokáže 2470 mg alkaloidů (litr kapaliny kultury, počítáno jako ergotoxinmaleinan. Alkaloidy se extrahují metylenchloridem, analogicky jako při metodě HOHMANN a ROCHELMAYER) Arch. Pharmazie **297** (1964) s. 186/187 se dělí chromatografií na tenké vrstvě na křemelině, impregnované formamidinem, a určují UV spektrální fotometrií. Nalezne se 1280 mg ergotoxinu a 340 mg ergometrinu/litr, zbytek připadá na dva až dosud neznámé nativní peptidy alkaloidů a na jednoduché deriváty ergolinu, jako agroklaavin, chanoklaavin aj.

K tomu souběžně provedené stanovení mycelia a filtrátu oddělených filtrací s odsáváním dokazuje, že ergometrin je obsažen ve filtrátu úplně a kromě toho je ve filtrátu obsaženo 90 % veškerého vzniklého ergotoxinu.

Příklad 5

10 skleněných fermentorů (s kapacitou 2 litry) se očkuje submersní kulturou spor, vyrobených podle příkladu 2. Fermentory obsahují po 1,3 litru živného roztoku A s 10 % sacharózy, 1,5 % citrátu amonného, 0,05 % dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,03 % síranu hořečnatého, 0,01 % síranu železnatého a 0,0004 % síranu zinečnatého ve vodovodní vodě (pH 5,5; sterilizace 30 minut při 0,05 MPa). Fermentace se provádí při 24 °C a míchání při 400 ot/min, popřípadě za provzdušňování 0,3 litru vzduchu/min. Po sedmi dnech se obsah fermentoru převede do 18litrového fermentoru z ušlechtilé oceli s 10 litry živného roztoku B. Živný roztok B obsahuje 10 % sacharózy, 1,4 % kyseliny citrónové, 1,0 % hydroxidu amonného (25%), 0,05 % dusičnanu vápenatého, 0,025 %

dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,01 % chloridu draselného, 0,03 % síranu hořečnatého, 0,001 % síranu železnatého a 0,0004 % síranu zinečnatého ve vodovodní vodě; pH 5,5. Po kultivaci při 24 °C, míchání při 360 ot/min a provzdušňování 2,5 l vzduchu/min se pátý den použije polovina obsahu fermentoru jako inokulum pro 63litrový fermentor z ušlechtilé oceli se 40 l živného roztoku C. Živný roztok C obsahuje 20 % sacharózy, 1,75 % kyseliny citrónové, 0,075 % dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,02 % chloridu draselného, 0,03 % síranu hořečnatého, 0,003 % síranu železnatého, 0,0012 % síranu zinečnatého ve vodovodní vodě; přípravek hydroxidu amonného až do pH 5,3; sterilizace 60 minut při 110 °C. Kultura se míchá 7 dní při 24 °C 300 ot/min a provzdušňuje 27 l vzduchu/min, podle potřeby se přidává prostředek proti pění. Na konci kultivace obsahuje kapalina kultury 2640 mg veškerých alkaloidů/l. V souladu s příkladem 4 provedená analýza ukazuje, že z toho připadá 1300 mg na ergotoxin a 550 mg na ergometrin.

Příklad 6

Množství spor kultury očkovacího materiálu, kultivovaných podle příkladu 3, se rozdělí jako inokulum rovnoměrně do dvou fermentorů z ušlechtilé oceli (kapacita 18 litrů) po 10 l živného roztoku A v soulase s příkladem 5. Fermentor se míchá 7 dní při 24 °C a 360 ot/min a provzdušňuje 2,5 l vzduchu/min. Potom se obsah 2 fermentorů převede do 250 litrového fermentoru z ušlechtilé oceli, který obsahuje 180 l živného roztoku B podle příkladu 5, a při 24 °C, míchání při 160 ot/min a provzdušňování 0,5 l vzduchu/litr živného roztoku x min se kultivuje. Po 5 dnech se kultura přenesse do 2000 litrového fermentoru z ušlechtilé oceli a 1400 l živného roztoku C podle příkladu 5, avšak živný roztok obsahuje dodatečně 0,0005 % síranu nikelnatého. Kultivace se provádí při 24 °C, míchání při 160 ot/min a provzdušňování 0,6 l vzduchu/litr živného roztoku x min. V případě potřeby se do všech fermentorů přidává prostředek proti pění. Sedmý den se získá kultura 2430 mg veškerých alkaloidů/l kapaliny kultury. Při analytickém stanovení podle příkladu 4 se nalezne 1150 mg ergotoxinu a 490 mg ergometrinu/l kapaliny kultury.

Příklad 7

200 l filtrátu kultury, získaných z odpovídajícího množství kapaliny kultury vyrobené podle příkladu 6, která byla před oddělením mycelia zředěna za míchání přídavkem vody v objemovém poměru 1 : 1, zalkalizuje se 25% amoniakální vodou na hodnotu pH 8,5 a extrahují se alkaloidy ergotoxinu a ergometrin 50 litry ethylacetátu za použití dvoustupňového protiproudého extrakčního zařízení. Ethylacetátový extrakt se koncentruje ve vakuu při teplotě 25 až 30 °C na 1/20 výchozího objemu, odparek se doplní 2 objemovými díly chloroformu, nechá se pro vykrystalování chloro-

formového aduktu ergometrinu stát 15 hodin při +4 °C, odsaje se a získá se 35,4 g nažloutlého chloroformového aduktu ergometrinu v 75 % výťažku.

35,4 g chloroformového aduktu ergometrinu se rozpustí za přítomnosti aktivního uhlí při zahřívání v 3,1 litru acetonu, k filtrátu se přidá vypočítané množství roztoku kyseliny maleinové v acetonu, získaný krystalický biomaleinát ergometrinu se odsaje a látka se usuší při +70 °C. Získá se sůl alkaloidu ve formě podle chromatografie na tenké vrstvě čistého, bílého až nažloutlého krystalického prášku v 90 % výťažku se stupněm čistoty 98 až 100 %. Specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20} = +50^\circ$ ($c = 1$ ve vodě).

Po dalším zkoncentrování získaného filtrátu, obsahujícího ergotoxin, na 0,297 l se buď:

a) chromatografuje za použití 20násobného množství, počítáno na celkové množství alkaloidu v koncentráte alkaloidu, kysličníku hlinitého akt. I. stupně, neutrální, přes sloupec s ethylacetátem a eluuje se 3,8 litry stejného rozpouštědla. Po odpaření eluátu ve vakuu při teplotě 30 °C do sucha se získaný odparek (74,2 g) převede vyjmutím do 0,212 litru benzenu a ponecháním roztoku stát po dobu 15 hodin při 4 °C na benzenový adukt ergotoxinu, vykrystalovavší produkt se odsaje, promyje benzenem a usuší ve vakuovém exikátoru. Získá se 55,2 g podle chromatografie na tenké vrstvě čistého, bílého, krystalického benzenového aduktu ergotoxinu se stupněm čistoty 95 %. Specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20} = -183^\circ$ ($c = 1,8$ ve chloroformu), nebo se

b) smíchá s 20násobným množstvím kysličníku hlinitého akt. stupně I, neutrálního, přepočteno na množství celkových alkaloidů, až je směs barevně homogenní. Po 15 minutách stání se extrahuje 3krát po 3,82 litru ethylacetátu, spojený extrakt se odpaří při 30 °C do sucha, v dalším zpracování se pokračuje analogickým způsobem jako sub a) a získá se 52,5 g chromatograficky na tenké vrstvě čistého, bílého, krystalického benzenového aduktu ergotoxinu se stupněm čistoty 95 %. Specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20} = -183^\circ$ ($c = 1,8$ v chloroformu); nebo se

c) chromatografuje za použití pětinasobného množství, přepočteno na množství celkového alkaloidu v koncentráte alkaloidu, kysličníku hlinitého akt. stupně I neutrálního za přidavku aktivního uhlí (poměr adsorpčních prostředků kysličníku hlinitého : aktivnímu uhlí 5 : 1) přes sloupec s ethylacetátem a eluuje se 4 litry stejného rozpouštědla, v dalším zpracování se pokračuje analogicky jako sub a) a získá se 55 g chromatograficky na tenké vrstvě čistého, bílého, krystalického benzenového aduktu ergotoxinu se stupněm čistoty 96 %; specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20} = -183^\circ$ ($c = 1,8$ ve chloroformu); nebo se

d) míchá za použití pětinasobného množství, přepočteno na množství veškerého alkaloidu v koncentráte alkaloidu, kysličníku hlinitého akt. stupně I neutrálního za přidavku aktivního uhlí

(poměr adsorpčních prostředků kysličníku hlinitého : aktivnímu uhlí 5 : 1) v míchacím filtračním zařízení se 3 litry ethylacetátu, extrahuje se ještě dvakrát po 2,5 litru ethylacetátu, spojené extrakty se odpaří při +30 °C do sucha, v dalším zpracování se postupuje analogicky jako sub a) a získá se 55 g chromatograficky na tenké vrstvě čistého, bílého, krystalického benzenového aduktu ergotoxinu se stupněm čistoty 96 %. Specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20} = -183^\circ$ ($c = 1,8$ v CHCl_3).

55,2 g benzenového aduktu ergotoxinu se rozpustí za mírného zahřívání v 830 ml absolutního ethanolu, přidá se vypočítané množství 0,5 molární ethanolsulfonové kyseliny a poté 4,2 l bezvodého etheru, získaný krystalizát se odsaje, látka se usuší při +70 °C a v 95 % výťažku se získá chromatograficky na čisté vrstvě čistý, bílý, krystalický ethansulfonan ergotoxinu se stupněm čistoty 98 až 100 %.

Příklad 8

Extrahuje se 12,0 kg mycelia, získaného filtrací odpovídajícího množství kapaliny kultury, po dobu 3 hodin při 20 °C 18 l acetonu, filtrační oddělený vodně acetonický extrakt se nastaví pomocí kyseliny fosforečné na pH 2 až 3 a odmastí, čistí se dvojnásobnou extrakcí 17 litry petroletheru a 11 litry petroletheru ve směsi s xylemem (obj. pom. 1 : 1). Získaná těžká fáze, obsahující alkaloidy, se extrahuje při pH 8 až 9 (amoniaková voda) dokonale celkem 7 litry ethylacetátu, horní fáze, promytá vodou v objemovém poměru 1 : 1, se při 30 °C zahustí na 0,70 l, doplní se 1,40 litru chloroformu a po stání přes noc při +4 °C se oddělí vyloučená kašovitá sraženina.

Filtrát se koncentruje za shora uvedených podmínek na 0,180 litru, chromatografuje se na 1,100 kg kysličníku hlinitého (akt. stupeň I) pomocí 2 litrů ethylacetátu, získaný eluát se odpaří ve vakuu do sucha, odparek se rozpustí ve 100 ml toluenu (benzenu nebo xylenu). Po stání přes noc při +4 °C se oddělí vyloučená látka, usuší ve vakuovém exikátoru a získá se 14,0 bílého, krystalického toluenového aduktu ergotoxinu se stupněm čistoty 98 až 100 %.

Příklad 9

Za míchání a přidavku 10 % hmotnostních síranu amonného při pH 8 až 9 a 20 °C se extrahuje 10,0 litrů suspence kultury, vyrobené podle příkladu 5, 25,0 litry ethylacetátu, těžká biofáze se zahodí, organická fáze se extrahuje dvakrát po 5,0 litrech 2 % kyseliny fosforečné, shromážděné vodné fáze, nastavené amoniakovou vodou na pH 8 až 9, se extrahují dvakrát po 5,0 litrech ethylacetátu, nashromážděné organické fáze se odpaří při teplotě 25 až 30 °C na 200 ml, odparek se doplní 400 ml chloroformu, po stání přes noc za chladu při 4 °C vykrystalovavší látka se odsaje a usuší ve vakuovém exikátoru a získá se 4,20 g (71,2 % teor.) chloroformového aduktu ergometrinu se stupněm čistoty 90,7 %. Filtrát, obsahující ergoto-

209196

xin, zkoncentrovaný za shora uvedených podmínek na 120 ml, se chromatografuje na 300 g kysličníku hlinitého (akt. stupeň I) ethylacetátem, eluát se odpaří ve vakuu do sucha, odparek se rozpustí ve 30 ml benzenu, nechá se stát přes noc za chladu při teplotě 4 až 10 °C, vyloučená látka se odsaje, usuší ve vakuovém exikátoru a získá se 7,95 g (= 73,6 % teor.) bílého, krystalického benzenového aduktu ergotoxinu se stupněm čistoty 91,6 %.

Příklad 10

50,0 g benzenového aduktu ergotoxinu, vyrobeného podle příkladu 7, se hydrogenuje v 0,7 litru dioxanu při 60 °C při tlaku vodíku 5 MPa ve vytápěném třepacím nebo mísícím autoklávu v přítomnosti Raneyova niklu po dobu 2 hodin na 9,10-dihydroergotoxin, katalyzátor se odfiltruje a čirý filtrát se odpaří ve vakuu do sucha, hydrogenovaná báze se nechá vykristalovat při 4 °C v ethylacetátu, krystalizát se odsaje a usuší při 60 °C. Získá se 47,5 g (= 90 % teor.) chromatograficky na tenké vrstvě čistého, bílého, krystalického produktu báze dihydroergotoxinu se stupněm čistoty 90 %. Specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20} = 45,6^\circ$ ($c = 2$ v pyridinu).

Získaná krystalická báze dihydroergotoxinu se vnese za míchání do 200 ml methanolu a vypočítaného množství 1 molárního methanolického roztoku kyseliny ethansulfonové, přičemž se po krátké době vyloučí sůl alkaloidu ve formě krystalů.

Po odsátí a usušení produktu se získá 48,5 g (95 % teor.) chromatograficky na tenké vrstvě čistého, bílého, krystalického dihydroergotoxinethansulfonanu se stupněm čistoty 98 až 100 %.

Příklad 11

7,20 g benzenového aduktu ergotoxinu, získaného podle příkladu 9, se hydrogenuje ve 200 ml 90% vodného dioxanu při 20 až 25 °C za vyloučení světla na 2,9 g 5% paládia na uhlí, ve speciální cirkulační aparatuře, skládající se z hydrogenační nádoby s napájecím vedením a cirkulačním vedením, teploměru, ejektoru, zásobní nádrže plynu a laboratorního hadicového čerpadla, při počtu otáček $138,5 \text{ h}^{-1}$, podtlaku ejektoru 120 mm sloupce kyseliny sírové a průměru trysek ejektoru 2 mm po dobu 4 hodin na 9,10-dihydroergotoxin, katalyzátor se odfiltruje, čirý filtrát se odpaří ve vakuovém rotačním odpařováku při teplotě 25 až 30 °C do sucha, odparek se rozpustí ve 35 ml chloroformu, doplní se 35 ml diethyletheru a za intenzivního míchání se dokonale vysráží 70 ml nasyceného etherického roztoku kyseliny maleinové dihydroergotoxinmaleinát. Odsaje se, promyje 30 ml diethyletheru a ihned se usuší nad kysličníkem fosforečným ve vakuovém exikátoru. Získá se 6,55 g (93,5 % teor.) chromatograficky na tenké vrstvě čistého, bílého, krystalického dihydroergotoxinmaleinátu se stupněm čistoty 97,9 %.

Tabulka 1: Morfologické vlastnosti *Claviceps purpurea*, kmen IMET PA 130, na různých agarových

prostředích po 14denní inkubaci na Petriho miskách při 24 °C.

Médium 1

(3 % sacharózy, 0,001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,3 % NaNO_3 , 1 % kukuřičné vody
0,1 % K_2HPO_4 , 3 % agaru;
0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH 6,8–6,9)

Tvar kolonií: Vypouklé, kompaktní, nepravidelné a silně svrašťelé kolonie; spodní strana hladká, neodděluující se ode dna desky.

Průměr kolonií: 1,0–1,5 cm,

Barva kolonií: Vrchní strana světlehnědá až fialová, bílý okraj; spodní strana hnědá, okraj světle hnědý.

Průměrná tvorba spor: $46,3 \times 10^6$ konidií/kolonií.

Médium 2

(15% pivovarské sladiny 0,1% citranu amonného
0,5 % kvasničného 3% agaru;
extraktu, pH 6,0)
0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,

Tvar kolonií: Střed vypouklý, s vyhloubeninou ve tvaru kráteru; okraj radiálně zvlněn: agar prorostlý, kolonie odděluující se ode dna desky.

Průměr kolonií: 2–3 cm.

Barva kolonií: Vrchní a spodní strana světle šedá.

Průměrná tvorba spor: $34,1 \times 10^6$ konidií/kolonií.

Médium 3

(2 % glukózy,
50 % vodného extraktu brambor,
3 % agaru;
pH 6,0)

Tvar kolonií: Střed vypouklý s vyhloubeninou tvaru kráteru; agar prorostlý, kolonie oddělitelné ode dna baňky.

Průměr kolonií: 1,5 až 2,0 cm.

Barva kolonií: Vrchní strana šedofialová; spodní strana šedohnědá.

Průměrná tvorba spor: $3,3 \times 10^6$ konidií/kolonií

Mikroskopická charakteristika konidií a hyfů:

Konidie vykazují ve všech případech elipsovitou formu s rozměry 6 až 10 μm (velká osa) popřípadě 4 až 8 μm (malá osa). Hyfy substrátu jsou dlouhé až 200 μm a mají průměr 8 až 16 μm . Objevují se vzdušné hyfy, jejichž délka činí přes 200 μm průměr pouze 2 až 4 μm .

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob fermentativní výroby derivátů ergoliinu, zejména alkaloidů a 9,10-dihydroalkaloidů skupiny ergotoxinu, jakož i skupiny ergometrinu, vyznačující se tím, že se jako očkovací materiál pro submersní kultury k syntéze alkaloidů použijí za saprofytických podmínek vytvořené konidiospory kmene *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. IMET PA

130, tyto konidiospory se kultivují submersně v prostředí obsahujícím sacharózu, kyselinu citrónovou, hydroxid amonný, jakož i minerální soli, při hodnotě pH 5,5 a teplotě 24 °C, vytvořené alkaloidy se na konci kultivační doby získají z filtrátu, mycelia nebo přímo ze suspense kultury, přičemž se suspenze kultury po přidavku 10 % síranu amonného extrahuje při pH 8 až 9 estery alkankarboxylové kyseliny, jejichž složku kyseliny představuje kyselina octová a jejichž alkoholickou složku představuje alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, načež se vodný okyselený extrakt alkaloidů extrahuje znovu při pH 8 až 9 týmiž estery alkankarboxylové kyseliny, nebo se uvedenými estery alkankarboxylové kyseliny extrahuje filtrát kultury, získaný po oddělení mycelia, nebo se suspense kultury před oddělením mycelia zředí vodou, filtrát kultury se extrahuje uvedenými estery alkankarboxylové kyseliny nebo methylenchloridem při pH 8 až 9, načež se mycelium, oddělené ze suspense kultury, extrahuje acetone, extrakt se nastaví vodným roztokem kyseliny na pH 2 až 3, vyčistí směsí uhlovodíků, vodná fáze se extrahuje při pH 8 až 9 uvedenými estery alkankarboxylové kyseliny a ze získaných extraktů se po koncentraci a přidavku chloroformu izoluje krystalický adukt ergometrinu s chloroformem, zkoncentrované filtráty surového alkaloidu, získané po oddělení ergometrinu, se podrobí chromatografickému čištění, ergotoxin získaný z eluátů se převede v adukty aromatů s ergotoxinem, ergotoxinové báze se hydrogenují v přítomnosti katalyzátoru Raneyova niklu při 50 až 70 °C a tlaku vodíku 3 až 7 MPa v dioxanu nebo při normálním tlaku a 20 až 30 °C v přítomnosti paládiového katalyzátoru ve vodném dioxanu cirkulačním způsobem na 9,10-dihydroergotoxinové báze prosté pigmentu a o sobě známým způsobem se převedou v terapeuticky vhodné adiční soli s kyselinami.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kultivace konidiospor provádí na pevných médiích nebo v kapalných médiích a při teplotě 15 až 25 °C, s výhodou 18 až 24 °C.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se pro vyčištění fermentativně vytvořených alkaloidů ergotoxinu a ergometrinu suspense kultury, doplněná síranem amonným, prakticky úplně extrahuje při pH 8 až 9 pomocí výše uvedených esterů alkankarboxylové kyseliny, jako ethylacetátem, nebo se extrahuje mycelium, získané filtrací suspense kultury, zředěné vodou v objemovém poměru 1 : 1 nebo původní suspense kultury, acetone, a odpovídající filtrát kultury varianty zředění se

souběžně k tomu extrahuje chlorovanými uhlovodíky, jako methylenchloridem, nebo se extrahuje odpovídající filtrát kultury podle obou variant esterů alkankarboxylové kyseliny, jako ethylacetátem, při pH 8 až 9, organická fáze, získaná přímou extrakcí suspense kultury, se extrahuje vodnou kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou fosforečnou, extrakt mycelia se za přidavku vodných kyselin, s výhodou kyseliny fosforečné, čistí při pH 2 až 3 směsí uhlovodíků, jako petroletherem nebo směsí petroletheru a xylenu, v předchozích případech získané vodné fáze, obsahující alkaloidy, se extrahují při pH 8 až 9 uvedenými estery alkankarboxylové kyseliny, s výhodou ethylacetátem, organické extrakty všech variant zpracování se všeobecně odpaří při teplotě 25 až 30 °C, odparky se vyjmou do 1 až 3 objemových dílů chloroformu a po uložení za chladu při 4 až 10 °C se prakticky kvantitativně oddělí vykrystalovavší chloroformový adukt ergometrinu, o sobě známým způsobem se převede v adiční soli ergometrinu s kyselinami, s výhodou v hydrogenmaleinát, zkoncentrované filtráty surového alkaloidu, zbavené ergometrinu, se adsorpčním nebo adsorpčně chromatografickým čištěním na kysličníku hlinitém v poměru 1 : 20 nebo v poměru 1 : 5, počítáno na množství celkových alkaloidů v koncentráto alkaloidů, za přidavku aktivního uhlí, při poměru adsorpčních prostředků kysličníku hlinitého : aktivnímu uhlí 5 : 1 za použití esterů alkankarboxylové kyseliny, s výhodou ethylacetátu nebo chlorovaných uhlovodíků, s výhodou chloroformu nebo dvousložkových směsí vpředu uvedených rozpouštědel spolu nebo s aromatickými uhlovodíky, jako benzenem, převedou ve směsi ergotoxinu a ergotoxininu, krystalizací z aromatických uhlovodíků, jako benzenu, toluenu nebo xylenu, se převedou ve vysoce čisté, krystalické aromatické adukty ergotoxinu, prosté epimerů, a tyto popřípadě v terapeuticky vhodné adiční soli s kyselinami.

4. Způsob podle bodů 1 a 3, vyznačující se tím, že se ergotoxinové báze hydrogenují v přítomnosti Raneyova niklu při 50 až 70 °C, s výhodou při 60 °C, a tlaku vodíku 3 až 7 MPa, s výhodou 5 MPa, v dioxanu, nebo i při normálním tlaku a 20 až 30 °C, s výhodou 25 °C, v přítomnosti 5 až 10% paládia na uhlí jako katalyzátoru, ve vodném dioxanu při cirkulačním způsobu na 9,10-dihydroergotoxinové báze prosté pigmentu a získané hydrogenované báze se převedou v terapeuticky vhodné adiční soli s kyselinami, s výhodou hydrogenmaleinát a ethansulfonát.