



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262313

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 17/18

(22) Přihlášeno 27 11 85

(21) PV 8582-85

(40) Zveřejněno 16 08 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

BENEŠ KAREL RNDr., OPAVA

(54) Způsob izolace námelových alkaloidů z fermentační tekutiny

Námelové alkaloidy vyráběné fermentačním způsobem se z fermentační tekutiny naadsorbují na vhodný nepolární adsorbent, například na aktivní uhlí, a po odfiltrování objemné kapaliny se extrahuje organickým rozpouštědlem nebo vodným roztokem kyseliny. Až stonásobným zakoncentrováním alkaloidů na adsorbentu se uspoří značné množství rozpouštědel a tím se podstatně sníží náklady na izolaci námelových alkaloidů z fermentační tekutiny.

Vynález se týká izolace námellových alkaloidů z fermentační tekutiny při výrobě námellových alkaloidů fermentačním způsobem, a to zejména námellových alkaloidů klavinového typu (elymoklavinu, agrokjavinu, chanokjavinu aj.), námellových alkaloidů typu jednoduchých amidů kyseliny lysergové (erginu, ergometrinu, hydroxyetylamiidu kyseliny lysergové a jejich optických izomerů), námellových alkaloidů typu ergotoxinu, ergotaminu a dalších.

Fermentační tekutina obsahuje kromě žádané složky - námellového alkaloidu, který bývá obsažen obvykle v koncentraci 0,1 až 5 mg/ml, nejčastěji však 1 až 2 mg/ml, řadu dalších anorganických i organických sloučenin, které jsou v mnohonásobném přebytku. Tyto látky, které jsou buď součástí prostředí nebo živinami pro organismy produkující alkaloid, eventuálně jsou vedlejšími produkty organismů, znesnadňují izolaci žádaného alkaloidu. Je to způsobeno jednak vlivem těchto sloučenin na povrchovou aktivitu roztoku, takže vznikají pěny při manipulaci nebo emulze při vytřepávání do organické fáze a dále způsobují to, že ani po změně pH do extrémních hodnot se částice alkaloidů neonizují, jak je tomu obvykle ve vodných roztocích alkaloidů.

Doposud se izolace prováděla extrakcí vytřepáním do organického rozpouštědla, a to nejčastěji do etheru, toluenu, benzenu, etylacetátu, butylacetátu, chloroformu, dichlormetanu, dichlorethanu nebo do jejich směsi s etanolem, metanolem nebo butanolem. Před vlastní extrakcí je zařazena filtrace pro odstranění pevných částí fermentační tekutiny, dále je obvykle nutno odstranit takzvané glukany, a to nejčastěji srážením acetonelem nebo etanolem a odfiltrováním, a organický podíl odpařit na rotační vakuové odparce. Posledním úkonem před vlastní extrakcí je alkalizace fermentační tekutiny na pH 8 až 10 obvykle hydrogenuhlíčitanem sodným nebo vodným roztokem amoniaku nebo hydroxidu sodného. Po extrakci do organické fáze následuje extrakce do vodného roztoku organické nebo anorganické kyseliny, nejčastěji kyseliny citronové, kyseliny vinné, kyseliny chlorovodíkové, kyseliny trihydrogenfosforečné nebo kyseliny sírové o hmotnostním zlomku 0,5 až 1 %. Potom následuje buď srážení alkaloidů vodným roztokem amoniaku nebo hydrogenuhlíčitanu sodného a jejich odfiltrování, respektive odstředění nebo zahuštění na odparek na rotační vakuové odparce, eventuálně těmto operacím předchází rozdělení jednotlivých alkaloidů extrakčně nebo chromatograficky.

Podle německého patentového spisu DD 138 223 (čs. autorské osvědčení č. 217 423) se izolace námellových alkaloidů z kultivačních suspenzí provádí adsorpcí rozpuštěné části alkaloidů na oxid hlinitý a po oddělení filtrátu a usušení vlhkého mycelia nebo směsi vlhké mycelium - adsorbent ve fluidní vrstvě se extrahuje organickými rozpouštědly nemístitelnými s vodou. Tento způsob je však náročný vzhledem k sušení, navíc je použitelný pouze na kultivační suspenzi z povrchové fermentace a nedá se aplikovat u tekutin z fermentace hloubkové (submerzní).

Britský patentový spis BP 1 181 836 (1967) uvádí přípravu ergolenových kyselin a následnou izolaci těchto látek zachycením na silně kyselém iontoměniči a vyeluování roztokem amoniaku. Podle francouzského patentového spisu FP 1 463 426 (1966) se provádí izolace ergolenových kyselin s různými substituenty v poloze 8, 9, respektive 10 adsorpcí na aktivním uhlí a následnou desorpcí směsí vody a alkoholu. Tyto dva patenty popisují izolaci kyselin, které strukturou patří do skupiny námellových alkaloidů, avšak neřeší izolaci alkaloidů klavinového typu, ani amidů nebo námellových alkaloidů peptidických.

Náklady na izolaci námellových alkaloidů z fermentační tekutiny jsou nepřímo úměrné koncentraci alkaloidů v tekutině. Praktické koncentrace jsou vždy několikanásobně nižší, než by vyžadoval optimální postup pro extrakci z jedné kapalně fáze do druhé.

Uvedené nevýhody, a to zejména vysoké materiálové náklady, řeší způsob izolace námellových alkaloidů z fermentační tekutiny podle vynálezu, který se vyznačuje tím, že se námellové alkaloidy obsažené ve fermentační tekutině naadsorbují na porézní nepolární materiál, zejména aktivní uhlí, silikagel modifikovaný pro chromatografii na obrácených fázích kovalentně vázanými uhlíkatými skupinami C-18 nebo C-8 nebo směs aktivního uhlí s mletou křemelinou v hmotnostním poměru 1:1 v množstvích 5 až 8 g na 1 g alkaloidů.

Výhoda způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že se dosáhne až stonásobného zakoncentrování alkaloidů. Po filtraci, promytí vodou a vysušení filtračního koláče se alkaloidy vyextrahují do organického rozpouštědla nebo přímo do vodného roztoku organické nebo anorganické kyseliny. Dále se roztok námellového alkaloidu zpracuje obvyklým způsobem. Před adsorpcí je nutno filtrací odstranit pevné součásti a zalkalizovat fermentační tekutinu na hodnotu pH 8 až 10, zejména při použití modifikovaného silikagelu jako adsorbentu. Pro extrakci z tuhého filtračního koláče je nejvýhodnější použít buď čtyřnásobného vytřepávání do organické fáze nemísitelné s vodou, a to 2 kg rozpouštědla na 1 kg filtračního koláče nebo postupné vymývání na koloně, respektive přímo na filtračním zařízení.

Navrhované řešení podstatně snižuje spotřebu organického rozpouštědla, a to o 50 % až 90 %, přičemž úspory jsou závislé na množství použitého adsorbentu, filtrační křemeliny, kvalitě filtrace, odsátí kapaliny z filtračního koláče a v neposlední řadě na obsahu námellového alkaloidu ve fermentační tekutině. Další výhodou způsobu podle vynálezu je mnohem menší pracnost, protože už v prvním kroku se odstraní velký objem kapaliny, a tím se dosáhne značných úspor na režijních i mzdových nákladech. Celkové dosažené úspory závisí na výběru optimálního postupu a činí minimálně 30 % až 50 % původních nákladů.

Způsob izolace námellových alkaloidů z fermentační tekutiny podle vynálezu byl ověřen na fermentační tekutině obsahující námellové alkaloidy klavinového typu, především elymoklavin a agroklavin ze submerzní a povrchové fermentace. Následující příklady provedení způsobu izolace podle vynálezu znázorňují, nikoliv omezují.

P ř í k l a d 1

1 litr přefiltrované fermentační tekutiny z povrchové fermentace obsahující 1,0 mg/ml námellových alkaloidů klavinového typu byl smíchán s 5,0 g aktivního uhlí a byl 30 minut míchán na elektromagnetickém míchadle. Pak byl zfiltrován přes vrstvu křemeliny a filtrační koláč o hmotnosti 60 g byl extrahován čtyřikrát šedesáti mililitry etylalkoholu denaturovaného chloroformem. Extrakce byla prováděna na mechanické třepačce vždy po dobu jedné hodiny. Po extrakci byl roztok zfiltrován přes skládaný filtr, filtrát byl analyzován a filtrační koláč byl znovu extrahován. Byly zjištěny tyto obsahy alkaloidů v extraktech:

1. extrakt 371 mg
2. extrakt 190 mg
3. extrakt 109 mg
4. extrakt 64,8 mg

Celkem bylo vyextrahováno 734,8 mg alkaloidů ve čtyřech extrakcích, což je 73,5 % původního množství. Z logaritmické analýzy je však možno vypočítat, že celkové vyextrahovatelné množství bylo pouze 806,1 mg, takže výtěžek extrakce je minimálně 91 %. Ztráty kolem 20 % látky připadají na manipulaci s filtračním koláčem.

P ř í k l a d 2

Dva litry přefiltrované fermentační tekutiny zalkalizované vodným roztokem amoniaku na pH 9,5 a obsahující 1,05 mg/ml elymoklavinu a 0,15 mg/ml agroklavinu byly smíchány s 15 g aktivního uhlí a po třiceti minutách míchání na elektromagnetickém míchadle bylo přidáno 15 g křemeliny. Směs byla zfiltrována a filtrační koláč byl promyt 100 ml vody a dobře odsát. Filtrační koláč o hmotnosti 65 g byl extrahován čtyřikrát 130 g etylacetátu. Extrakce byly prováděny vždy po dobu jedné hodiny na mechanické třepačce. Kapalina se s filtračním koláčem nesmíchala a dala se snadno slít. Analýzou jednotlivých frakcí byly zjištěny tyto obsahy elymoklavinu:

1. extrakt 1 100 mg
2. extrakt 550 mg

3. extrakt 250 mg
4. extrakt 95 mg.

Celkem bylo vyextrahováno 1 995 mg elymoklavinu, tj. 95 % a bylo spotřebováno pouze 25 % etylacetátu oproti starému postupu. Vyextrahovaná fermentační tekutina obsahovala méně než 0,01 mg/ml alkaloidů, takže účinnost adsorpce je lepší než 99 %.

P ř í k l a d 3

Zfiltrovaná fermentační tekutina s celkovou koncentrací alkaloidů 1,4 g/l byla zalkaliována roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l na pH 9. Jako sorbent byl použit modifikovaný silikagel pro chromatografii na obrácených fázích Separon SIX C 18 o zrnění 0,06 mm. Byly použity plastické kolony o objemu 1 ml, naplněné tímto sorbentem v množství 0,55 g. 5; 10, respektive 20 ml fermentační tekutiny bylo injekční stříkačkou protlačeno přes tyto kolony a pak byla analyzována kapalinovou chromatografií. Zbytkové množství alkaloidů v tekutině bylo vždy menší než 2 % původního obsahu. Nasorbované alkaloidy byly promyty 5 ml vody a přebytek kapaliny byl vytlačen vzduchem. Desorpce alkaloidů byla provedena 2 ml metylalkoholu. Po promytí vodou byly kolony připraveny k opětovnému použití.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob izolace námelových alkaloidů z fermentační tekutiny vyznačující se tím, že se námelové alkaloidy z fermentační tekutiny adsorbují při hodnotě pH v rozmezí 8 až 10 za normální teploty na porézní nepolární adsorbent, zejména aktivní uhlí, silikagel modifikovaný pro chromatografii na obrácených fázích nebo směs aktivního uhlí s mletou křemelinou ve vzájemném hmotnostním poměru 1:1, a po odfiltrování, promytí vodou a důkladném odsátí kapalně fáze nebo usušení se filtrační koláč vyextrahuje rozpouštědlem ze skupiny zahrnující benzen, butylacetát, chloroform, dichlormetan, dietyléther, etylacetát, toluen, aceton, nižší alkoholy, 0,5 až 1 % roztoky silné organické nebo anorganické kyseliny nebo směsí vodorozpustných rozpouštědel s roztokem kyseliny, načež se zpracuje obvyklým postupem.