



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

235340

(11) (B2)

(22) Přihlášeno 06 08 82
(21) (PV 6292-83)
(32) (31)(33) Právo přednosti od 07 08 81
(5104/81-5) Švýcarsko

(40) Zveřejněno 31 08 84

(45) Vydáno 15 01 87

(51) Int. Cl.³

C 12 P 1/06
C 12 N 1/14
C 12 N 1/38

(72) Autor vynálezu

KOBEL HANS dr., BASILEJ, SANGlier JEAN-JACQUES dr., OBERWIL, TSCHER-
TER HANS, ALLSCHWIL, BOLLIGER GEORG dr., BINNINGEN (Švýcarsko)

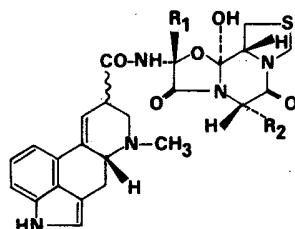
(73) Majitel patentu

SANDOZ A. G., BASILEJ (Švýcarsko)

(54) Způsob výroby derivátů ergopeptinu

Předložený vynález se týká způsobu výroby nových derivátů ergopeptinu, které mají cenné farmakologické vlastnosti a které se mohou používat jako účinné složky léčiv.

Předmětem předloženého vynálezu je způsob výroby derivátů ergopeptinu obecného vzorce I



(I)

v němž buď

R₁ znamená methylovou skupinu a

R₂ znamená isobutylovou skupinu nebo benzylovou skupinu, nebo

R₁ znamená ethylovou skupinu a

R₂ znamená benzylovou skupinu nebo

R₁ znamená isopropylovou skupinu a

R₂ znamená isopropylovou skupinu, sek.butylovou skupinu, isobutylovou skupinu nebo benzylovou skupinu, a jejich adičních solí s kyselinami kultivací kmene *Claviceps purpurea* produkujícího odpovídající 9'-methylenderivát nebo kmene získaného z *Claviceps purpurea*, který spočívá v tom, že se ke kapalné kultuře tohoto kmene přidá 1 až 5 g/l L-thiazolidin-4-kar-

235340

boxylové kyseliny nebo soli této kyseliny, kultivace se provádí při 22 až 26 °C a získané sloučeniny se popřípadě převedou na své adiční soli s kyselinami.

Vhodnými kyselinami pro tvorbu solí jsou například chlorovodíková kyselina, sírová kyselina, maleinová kyselina, fumarová kyselina a vinná kyselina.

Používat se mohou jak kmeny *Claviceps purpurea* tak i takové kmeny, které se mohou získat z výchozího kmene *Claviceps purpurea* mutací za účinku záření nebo působením mutagenních látek nebo selekcí. Takové kmeny jsou známy a jsou k dispozici veřejnosti.

K výrobě 9'-thiaergotaminu a 9'-thiaergotamininu se například používá jako výhodný kmen produkující ergotamin/ergotaminin mutant *Claviceps purpurea* NRRL 12043. Kultura tohoto kmene byla uložena 20. 9. 79 ve sbírce United States Department of Agriculture (Northern Regional Research Center), Peoria, Ill., Sp. st. a. pod číslem kultury NRRL 12043.

K výrobě 9'-thiaergokristinu a 9'-thiaergokristininu se používá jako výhodný kmen produkující ergokristin/ergokristin mutant *Claviceps purpurea* NRRL 12044. Jeho kultura byla uložena 29. 9. 79 ve shora uvedeném ukládacím místě pod označením kultury NRRL 12044.

Kmeny použitelné k výrobě ostatních sloučenin vzorce I jsou známy a jsou rovněž veřejnosti k dispozici.

Charakteristika a fermentační získávání kmenů NRRL 12043 a 12044

a) Charakteristika kmene NRRL 12043

Kmen výchozí houby se izoluje ze sklerotia obsahujícího ergotamin, které bylo nalezeno na svěřpu (*Bromus*) v oblasti Wallis (Švýcarsko). Vícetupňovým mutagenním postupem za použití ultrafialového záření a chemikálií se dospěje ke kmeni NRRL 12043, který se používá podle vynálezu, a který lze charakterizovat následujícím způsobem:

Malý kousek mycelia kmene NRRL 12043 se naočkuje do středu agarové desky s prostředím dále uvedeného složení:

60 g sacharózy, 10 g asparaginu, 0,5 g casamino-kyseliny (Difco), 0,25 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,125 g KCl, 16 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 15 g agaru a destilovaná voda do 1 litru. Hodnota pH se 25% roztokem amoniaku upraví na 6,0. Prostředí se steriluje 20 minut při teplotě 120 °C. Při teplotě 24 °C se po 7 dnech vytvoří kolonie o průměru asi 3 cm, po 14 dnech se vytvoří kolonie o průměru asi 5 cm a po 20 dnech se vytvoří kolonie o průměru asi 8 cm. Tato kolonie je klenutá a má mírné záhyby. Okraj je difusní. Barva kolonie je uprostřed béžově fialová a na okraji béžově šedá. Kolonie stará 20 dnů obsahuje na 1 cm^2 asi $1 \cdot 10^8$ konidií. Tyto konidie jsou oválné a jejich rozměry činí 6 až 12 x 4 až 7 μm .

b) Charakteristika kmene 12044

Kmen výchozí plísně byl izolován ze sklerotia na žitě v Severní Americe a tento kmen obsahuje ergokristin. Vícetupňovým mutagenním postupem za použití ultrafialových paprsků a chemikálií se dospěje ke kmeni NRRL 12044, který se používá podle vynálezu, a který lze charakterizovat následujícím způsobem:

Malý kousek mycelia kmene NRRL 12044 se naočkuje do středu agarové desky s prostředím dále uvedeného složení:

70 g sladového extraktu (Wander), 30 g brambor (Stocki, Knorr), 15 g agaru a destilovaná voda do 1 litru. Hodnota pH činí 5,3 až 5,7. Živné prostředí se sterilizuje 20 minut při teplotě 120 °C. Po 7 dnech při teplotě 24 °C se vytvoří kolonie o průměru asi 2 cm, po 14 dnech kolonie o průměru asi 4 cm a po 20 dnech kolonie o průměru asi 5 cm.

Mycelium je plošně klenuté a je pokryto bílým, vatovitým pletivem hyf vyčnívajících do prostoru. Ve středu je vytvořen kráterovitý hrbol o průměru asi 1 cm. Od tohoto hrbolu vycházejí radiální záhyby. Mycelium pokrývající agar je fialově zbarveno. Vznikají koncentrické zóny se silnější pigmentací a koncentrické zóny se slabší pigmentací. Okraj je difusní. Mycelium o stáří 20 dnů obsahuje na 1 cm² asi $1 \cdot 10^8$ konidií. Tyto konidie se značně liší ve svých rozměrech (5 až 12 x 3 až 7 μm; většinou však 5 až 6 x 3 μm). Mycelium neobsahuje žádné alkaloidy.

Rozmnožování a výroba očkovací látky

a) Kmen NRRL 12043

Rozmnožování a výroba očkovací látky kmene NRRL 12043 se může provádět tím, že se konidie z některé ze shora popsanych kolonií suspendují ve sterilní vodě a touto suspenzí se naočkují zkumavky se šikmým agarem s agarovou živnou půdou, sestávající z: 70g sladového extraktu (Wander), 30g brambor (Stocki, Knorr), 15g agaru a destilované vody do 1 litru. Hodnota pH činí 5,3 až 5,7. Živná půda se sterilizuje 20 minut při teplotě 120 °C.

Po 14 dnech obsahuje takováto kultura šikmého agaru (12 ml živné půdy ve zkumavce o průměru 18 mm a o délce 20 cm, uložena šikmo (k vytvoření klínu) asi $1 \cdot 10^9$ konidií. Z takovéto kultury šikmého agaru se konidie suspendují ve sterilní vodě a přitom se dosáhne koncentrace 10^6 až 10^7 spór/ml. Pomocí vždy 0,5 ml této suspenze se rovnoměrně očkují zkumavky se šikmým agarem se stejnou živnou půdou. Tyto kultury se kultivují při teplotě 24 °C po dobu 14 dnů. Potom se skladují při teplotě -40 °C.

b) NRRL 12044

Rozmnožování a výroba očkovací látky kmene NRRL 12044 se může provádět tak, že se konidie z některé ze shora popsanych kolonií suspendují ve sterilní vodě a pomocí této suspenze se naočkuje šikmý agar ve zkumavkách se shora popsanou živnou půdou. Po 18 dnech obsahuje takováto kultura šikmého agaru (12 ml živné půdy ve zkumavce o průměru 18 mm a délce 20 cm, uložena šikmo (k vytvoření klínu) asi 1 až $2 \cdot 10^9$ konidií. Konidie z takovéto kultury šikmého agaru se suspendují ve sterilní vodě a přitom se dosáhne koncentrace 10^6 až 10^7 spór/ml. Pomocí vždy 0,5 ml této suspenze se rovnoměrně očkují zkumavky se šikmým agarem se stejnou živnou půdou. Tyto kultury se potom kultivují při teplotě 24 °C po dobu 14 dnů. Potom se skladují při teplotě -40 °C.

Předběžné kultury

Při provádění postupu podle vynálezu se ukázalo výhodným, vypěstovat spóry nejdříve přes předchozí stupeň popřípadě přes předchozí stupeň a to dříve než se naočkuje produkční živná půda. Zpočátku se má volit živná půda, ve které dochází k dobrému klíčení spór a k rychlému růstu mycelia. Pro takovou živnou půdu jsou vhodné: zdroj uhlíku v bohaté koncentraci ve formě monosacharidu nebo disacharidu, popřípadě v kombinaci s polyalkoholem, zdroj dusíku ve formě aminokyseliny nebo amonné soli, dále minerální soli, stopové prvky a komplexní přísady z rostlinných semen. Hodnota pH se výhodně upravuje na hodnotu mezi 5 a 7. Živná půda se v prvním stupni bohatě naočkuje konidiemi a potom se inkubuje na třepačce nebo ve fermentátoru různých velikostí při teplotě 22 až 26 °C po dobu 4 až 7 dnů. Vznikne hustá kultura z kyprých, vatovitých 2 až 3 mm měřících, nepigmentovaných vloček mycelia, které sestávají z dlouhých hyf o průměru 3 až 6 μm.

Hlavní kultury

Části kultury, která byla získána v jednom nebo popřípadě v několika předchozích stupních, se očkuje produkční živná půda, která má výhodně takové složení, aby se v krátké době dosáhlo vysoké hmotnosti mycelia. Jako nejlepší a nejlevnější zdroj uhlíku se ukázala sacharóza, jako zdroj dusíku amonné soli, jako oxalát, citrát, sukcinát a formiát. Dále se mají přidávat minerální soli a jako stopové prvky železo a zinek. Kultivace se provádí buď v Erlenmeyerových baňkách nebo ve fermentátorech různých velikostí. Důležité je dobré provzdušňování. Optimální teplota se pohybuje na 24 °C.

Na začátku tvoření alkaloidů, obvykle mezi 3. a 6. dnem kultivace hlavní kultury se k hlavní kultuře přidá 1 až 5 g/litr L-thiazolidin-4-karboxylové kyseliny, nebo některé soli této kyseliny, jako například soli draselné, sodné nebo amonné. Potom se kultury fermentují po dobu dalších 6 až 12 dnů. V průběhu 9 až 18 dnů vznikne hustá kultura, sestávající hlavně z 0,5 až 3 mm dlouhých a 0,1 až 1 mm silných válcovitých kompaktních částic mycelia vedle jemných vloček. Částice mycelia vykazují ve své struktuře obraz plectenchymatické tkáně z kulovitých nebo polyedrických až nízkých válcovitých, tlustostěnných a silně vakuolizovaných buněk o rozměrech 6 až 12 x 6 až 14 μm, zejména 8 x 9 μm, která je prostoupena dlouhými hyfami o délce až 100 μm. Tyto částice jsou pigmentovány nahnědlou barvou. Filtrát kultury je rovněž nahnědle zbarven.

Když se přírůstek hmotnosti a obsah alkaloidů v myceliu sníží, mohou se alkaloidy o sobě známými metodami extrahovat pomocí organických rozpouštědel z veškeré kašovitě kultury, nebo se mycelium oddělí filtrací nebo odstředováním od filtrátu a extrahují se obě části, každá zvlášť. Hlavní podíl peptidických alkaloidů je obohacován v myceliu.

Isolace sloučenin vzorce I

Tyto ergotpeptiny obsahující síru se dají izolovat ze suspenze kultury, z filtrátu kultury nebo z mycelia známými extrakčními postupy. Čištění se provádí za použití obvyklých čistících operací, jako například vysrážením z aktivních rozpouštědel pomocí inaktivních rozpouštědel nebo převedením na soli, které jsou obtížně rozpustné. Zvláště vhodné jsou známé čistící postupy jako například chromatografie na oxidech hliníku, silikagelech, Sephadexu LH-20 atd. a to vždy ve vhodných systémech rozpouštědel. Stejně jako známé ergotpeptiny jsou i tyto nové 9'-thiaergopeptiny citlivé vůči dennímu světlu. Ve volné formě a v polárních rozpouštědlech izomerují tyto sloučeniny až k dosažení určité rovnováhy vždy na druhou formu.

Ve formě soli, jaká se může vyrobit například působením methansulfonové kyseliny, je 9'-thiaergotamin a 9'-thiaergokristin stabilní po dlouhou dobu.

Sloučeniny získané podle vynálezu se mohou, pokud je to žádoucí předvádět o sobě známými metodami na další sloučeniny vzorce I.

Tak se mohou sloučeniny vzorce I alkylovat v poloze 1 nebo/a 2 nebo/a 6.

Dále se mohou sloučeniny vzorce I redukovat v poloze 9,10.

Kromě toho se mohou sloučeniny vzorce I halogenovat v poloze 2.

Sloučeniny vyráběné podle vynálezu nebyly v literatuře dosud popsány. Tyto sloučeniny mají při pokusu na zvířatech zajímavé farmakologické vlastnosti a mohou se tudíž používat jako léčiva.

Zejména vykazují tyto sloučeniny stimulační účinek na receptory dopaminu. Dopaminergní vlastnosti bylo možno zjišťovat na kryších, u kterých bylo vyvoláno injekcí 6-hydroxydopaminu do substantia nigra unilaterální poškození substantia nigra v nigro-neostriální dopaminové dráze, dávkami mezi asi 0,5 až 100 mg/kg [metoda podle U. Ungerstedta, *Acta physiol. scand. Suppl.* **367**, 69-93 (1971)]. Po aplikaci účinné látky byla zjištělná zřetelná aktivace tím, že krysy vykonávaly otáčivé pohyby ve směru nedenergované strany.

Uvedené nové látky se mohou používat na základě svých dopaminergních vlastností k léčení parkinsonismu.

Dále mají tyto nové sloučeniny účinek projevující se brzděním sekrece prolaktinu. Tak brzdí tyto látky u krysy implantace (zachycení oplozeného vajíčka v děložní sliznici) po subkutánní aplikaci dávek mezi 0,01 a 1 mg/kg a laktaci za použití dávek 1 až 10 mg/kg p. o. [srov. *Experientia* **34**, 1 330 (1978)].

Tyto nové látky se mohou na základě svých vlastností projevujících se brzděním sekrece prolaktinu používat například ke zbrzdění laktace, galaktorrhózy, k léčení hyperprolaktinického hypogonadismu a akromegálie nebo k léčení prolaktinomů.

Dále způsobují nové látky v cyklu spaní-bdění u chronicky implantované krysy od asi 3 mg/kg i. p. nebo 10 mg/kg p. o. zkrácení doby paradoxálního spánku a prodloužení stavu bdění [srov. J. M. Vigouret a další, *Pharmacology* **16**, 1, 156-173 (1978)]. Kromě toho způsobují tyto sloučeniny při 0,3 mg/kg i. p. zvýšení látkové výměny glukózy v buněčných jádrech mozkových nervů senzorického zpracování informací. (Metoda podle L. Solokoffa, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1981, **1**, 7-36, H. E. Savaki a další, *Brain Research* 1982, **233**, 347 a J. McCulloch a další, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1981, **1**, 133-136).

Na základě těchto výsledků jsou nové látky vhodné k léčení senilní demence, zejména v raném stádiu a ke zvýšení vigilance.

Kromě toho mají sloučeniny podle vynálezu vazokonstrikční aktivitu, kterou lze prokázat in vitro na spirálovitých prouzcích Arteria carotis externa psa (E. Müller-Schweinitzer, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **292**, 113 až 118 (1976)) za použití dávek od 10 nM/litr.

Na základě svého vazokonstrikčního účinku se nové látky používají k léčení migrény.

Dále vyvolávají tyto látky na kryse s poškozeným mozkem a míchou [Brit. J. Pharmac. Chemother. **30** (1967), 78 až 87] za použití dávky od asi 5 až 50 μ g/kg i. v. dlouhotrvající presorický efekt spojený se zvýšením krevního tlaku. Na kočce (Mellander) [Angiologica **3** (1966), 77 až 99] způsobují tyto látky silné, v závislosti na dávce dlouhotrvající konstrikce cév v dávkách od asi 0,5 do asi 50 μ g/kg i. a.

Na základě této aktivity se mohou používat tyto látky jako prostředky k tonizaci žil.

Konečně mají sloučeniny podle vynálezu na základě výsledků v cyklu spaní-bdění serotoninergní účinek. S ohledem na tento účinek a na výsledky na Ungerstedtově modelu se mohou tyto látky používat jako antidepresiva, především u starších lidí.

V následujících příkladech, které vynález blíže objasňují, jsou údaje všech teplot ve stupních Celsia a tyto údaje nejsou korigovány.

P ř í k l a d 1

9'-thiaergotamin a 9'-thiaergotaminin

1. Kultivace kmene NRRL 12043

a) Předběžná kultura:

Konidie kultury *Claviceps purpurea* kmene NRRL 12043 (asi 10^9) na šikmém agaru se suspendují v 10 ml sterilní vody. Pomocí 1 ml této suspenze konidií se naočkuje 200 ml předběžného kultivačního prostředí následujícího složení:

	<u>g/litr</u>
sacharóza	100
Proflo	10
šřavelan amonný	3
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1
KH_2PO_4	0,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25
KCl	0,125
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,0166
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,0068
destilovaná voda	do 1 litru,

• které se nachází v Erlenmeyerově baňce o obsahu 500 ml. Hodnota pH se pomocí NH_4OH upraví na 6,5. Půda se sterilizuje 20 minut při teplotě 120°C . Tato předběžná kultura se při teplotě 24°C protřepává za otáčení (180 otáček za minutu, obvod 5 cm). Na konci růstu má kultura hodnotu pH 5,3 a hmotnost suchého mycelia činí 22 g/litr.

b) Hlavní kultura:

Pomocí 10 ml předběžné kultury se naočkuje 50 ml hlavní kultivační živné půdy následujícího složení:

	<u>g/litr</u>
sacharóza	240
šřavelan amonný	9,6
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,625
KH_2PO_4	0,625
KCl	0,312
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,0252
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,0102
destilovaná voda	do 1 litru,

která se nachází v Erlenmeyerově baňce o obsahu 500 ml; hodnota pH se pomocí 25% hydroxidu amonného upraví na 6,2. Živná půda se sterilizuje 20 minut při teplotě 110°C .

Tato kultura se inkubuje při teplotě 24 °C na otáčející se třepačce (180 otáček za minutu, obvod 5 cm). Po 4 dnech trvání kultivace se ke kultuře přidá 90 mg L-thiazolidin-4-karboxylové kyseliny. V inkubaci kultury se pokračuje ještě 10 dnů na otáčivé třepačce. Po ukončení fermentace se kultury odfiltrují. Mycelium se šetrně vysuší. Hmotnost suchého mycelia hlavní kultury činí 85 g/litr. Obsah alkaloidu činí 12 mg/g. Podíl 9'-thiaergotaminu a 9'-thiaergotamininu činí 10 % z celkového obsahu alkaloidů.

2. Izolace titulních sloučenin

500 g suchého mycelia se homogenizuje dvakrát vždy s 1 600 ml methanolu a 2 % koncentrovaného amoniaku, jakož i dvakrát vždy s 1 200 ml methanolu vždy po dobu 5 minut pomocí přístroje Ultra-Turrax a spojené filtráty se odpaří ve vakuu při maximální teplotě lázně 40 °C (asi 50 g vínově červeného zbytku). Tento zbytek se rozpustí v 500 ml methanolu a roztok se filtruje v chromatografické trubici o průměru 10 cm přes 500 g oxidu hlinitého aktivity II. stupně (Woelm), dále se provede promytí 2 000 ml methanolu a veškerý filtrát se ve vakuu odpaří k suchu (získá se 25 g žluté pěny). Tento zbytek se nyní rozdělí na 200-násobném množství silikagelu 60 (Merck) v methylenchloridu a 2 % methanolu chromatografickým postupem. Zbytky frakcí se zkoumají chromatografií na tenké vrstvě a ty frakce, které obsahovaly pouze skvrny látky odpovídající 9'-thiaergotaminu (srov. hodnoty R_f v tabulce 1) se spojí.

9'-thiaergotamin:

Ty frakce, které podle chromatografické analýzy na tenké vrstvě a v soulase s odpovídající hodnotou R_f obsahují 9'-thiaergotamin, se rozpustí v ethylacetátu, roztok se filtruje vrstvou mastku a po zahuštění filtrátu ve vakuu se přidá malé množství hexanu, přičemž vykristaluje alkaloid. Překrystalováním ze stejného rozpouštědla se získají čisté krystaly bílé až nažloutlé barvy. Teplota tání od 199 °C pomalý rozklad; $[\alpha]_D^{20} = -165^\circ$ ($c = 0,5$ v chloroformu).

9'-thiaergotamin-methansulfonát:

180 mg 9'-thiaergotaminu se rozpustí v malém množství ethanolu a k roztoku se přidá alkoholický roztok obsahující 29 mg methansulfonové kyseliny, přičemž vykristaluje alkaloid ve formě methansulfonátu. Překrystalováním z methanolu se získá čistá bílá sůl. Teplota tání od 211 °C rozklad; $[\alpha]_D^{20} = +76^\circ$ ($c = 0,51$ v methanolu).

9'-thiaergotaminin:

Chromatografované frakce s jednotnou skvrnou podle chromatogramu na tenké vrstvě a s jednotnou hodnotou R_f (viz tabulku 1) se rozpustí v ethylacetátu, spojí se a filtrují se přes vrstvu mastku ze vzniku čirého filtrátu. Ke koncentrovanému roztoku se přidá malé množství hexanu, přičemž se alkaloid vysráží ve formě bílých krystalů. Překrystalováním ze stejného rozpouštědla se získá čistá sloučenina. Teplota tání od 199 °C rozklad; $[\alpha]_D^{20} = +343^\circ$ ($c = 0,55$ v chloroformu).

T a b u l k a 1

Hodnoty R_f zjištěné chromatografováním na tenké vrstvě ve srovnání s hodnotami ergotaminu (Et) a ergotamininu (Et-in)

Vrstva a rozpouštědlový systém	Thia-Et	Et	Thia-Et-in	Et-in
Alox ¹⁾				
směs ethylacetátu a sek. butanolu (9:1)	0,44	0,34	0,68	0,59
směs toluenu a isopropanolu (9:1)	0,58	0,50	0,69	0,63
směs toluenu a isopropanolu (19:1)	0,30	0,24	0,58	0,46
silikagel ²⁾				
směs toluenu a isopropanolu (85:15)	0,15	0,11	0,43	0,31
směs methylenchloridu a methanolu (93:7)	0,25	0,22	0,65	0,52

1) hotevé destičky oxidu hlinitého Merck F 254 (typ E)

2) hotevé silikagelové destičky Merck F 254.

Na destičkách pro chromatografii na tenké vrstvě se jeví skvrny látky při ultrafialovém světle vlnové délky 254 nm jako modrofialové skvrny a při ultrafialovém světle vlnové délky 366 nm jako světle modré skvrny. Mohou se zjistit také pomocí jedových par jako hnědé skvrny.

Urkové činidlo typické pro ergotpeptiny se výtečně hodí k detekci skvrn látek. Po postříkání se projevují tyto sloučeniny modrofialovou barvou, která se projevuje intenzivněji v důsledku působení denního světla nebo proudu vodní páry (Hauch-König).

Příklad 2

9'-thiaergokristin a 9'-thiaergokristinin

1. Kultivace kmene NRRL 12044

Kmen 12044 se kultivuje analogickým způsobem jako je popsán v příkladu 3. Hmotnost suchého mycelia hlavní kultury činí 80 g/litr. Obsah alkaloidů činí 10 mg/g. Podíl titulních sloučenin činí 8 % z celkového obsahu alkaloidů.

2. Izolace titulních sloučenin:

500 g suchého mycelia se dvakrát homogenizuje vždy s 1 500 ml methanolu a 2 % koncentrovaného amoniaku a dvakrát se homogenizuje vždy s 1 500 ml methanolu po dobu 5 minut pomocí přístroje ultraturrax. Spojené filtráty se odpaří ve vakuu při maximální teplotě lázně 40 °C (190 g vínevé červeného zbytku). Po rozpouštění v 900 ml methanolu se získaný roztok filtruje 10 cm vysokou vrstvou 600 g oxidu hlinitého (bazický, aktivity II. stupně), dále se vrstva promyje 2 000 ml methanolu a filtrát se odpaří ve vakuu k suchu (108 g).

Tento zbytek se nyní rozdělí v methanolu na 3 000 g Sephadexu LH-20, přičemž se jímají frakce po 200 ml, které se odpaří. Zbytky frakcí, které podle chromatografie na tenké vrstvě obsahují nové thia-ergotpeptidy, se spojí (526 mg) a znovu se chromatografují na 120 g Sephadexu LH-20 v methanolu, přičemž se získá 156 mg čisté směsi 9'-thiaergokristinu a 9'-thiaergokristininu. Rozdělení těchto dvou sloučenin se provádí známými chromatografickými metodami na silikagelu 60 (Merck) za použití methylenchloridu a 2 % methanolu.

9'-thiaergokristin:

Zbytky frakcí, které podle chromatografické analýzy na tenké vrstvě a v soulase s jeho hodnotou R_F (srov. tabulku 2) obsahují pouze 9'-thiaergokristin, se spojí a krystalují se z benzenu (28 mg). Teplota tání 146 °C (jihnutí za pomalého rozkladu); $[\alpha]_D^{20} = -176^\circ$ ($c = 0,5$ v chloroformu).

9'-thiaergokristinin:

Chromatografické frakce, které se podle chromatografie na tenké vrstvě jeví jako jednotné a které mají skvrnu látky ve shodě s příslušnými hodnotami R_F (viz tabulku 2), se spojí a krystalují se ze směsi ethanolu a ethylacetátu. Teplota tání 209 až 210 °C za rozkladu; $[\alpha]_D^{20} = +344^\circ$ ($c = 0,51$ v CHCl_3).

T a b u l k a 2

Hodnoty R_F zjištěné chromatografií na tenké vrstvě ve srovnání s hodnotami ergokristinu (Ec) a ergokristininu (Ec-in)

Vrstva a rozpouštěd- lový systém	Thia-Ec	Ec	Thia-Ec-in	Ec-in
Alox ¹⁾				
směs ethylacetátu a sek. butanolu (9:1)	0,68	0,63	0,78	0,70
směs toluenu a iso- propanolu (9:1)	0,68	0,62	0,69	0,66
směs toluenu a iso- propanolu (19:1)	0,50	0,42	0,58	0,47
silikagel ²⁾				
směs toluenu a iso- propanolu (85:15)	0,37	0,28	0,56	0,48
směs methylenchloridu a methanolu (93:7)	0,47	0,41	0,70	0,60

vysvětlivky k tabulce 2:

- 1) hotové destičky oxidu hlinitého Merck F 254 (typ e)
- 2) hotové silikagelové destičky Merck F 254

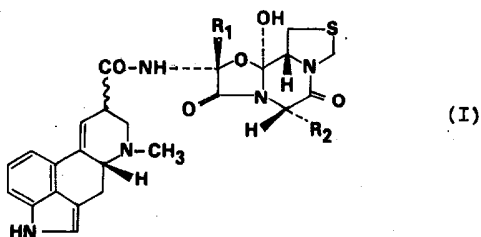
Pokud jde o detekci skvrn látek pak platí totéž co je uvedeno v příkladu 1.

P ř í k l a d 3

Analogickým postupem jako je popsán v příkladu 1 nebo 2 se může vyrobit také 9'-thia- α -ergokryptin [teplota tání 203 až 205 °C (rozklad); $[\alpha]_D^{20} = +46^\circ$ ($c = 0,7$ v dimethylformamidu)] a 9'-thia- α -ergokryptinin [teplota tání 228 až 230 °C (rozklad); $[\alpha]_D^{20} = +281^\circ$ ($c = 0,8$ v dimethylformamidu)] tím, že se použije kmene produkujícího směs ergokryptinu a ergokryptininu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby derivátů ergopeptinu obecného vzorce I



v němž buď

R₁ znamená methylovou skupinu aR₂ znamená isobutylovou skupinu nebo benzylovou skupinu, neboR₁ znamená ethylovou skupinu aR₂ znamená benzylovou skupinu neboR₁ znamená isopropylovou skupinu a

R₂ znamená isopropylovou skupinu, sek. butylovou skupinu, isobutylovou skupinu nebo benzylovou skupinu, ve formě volné báze nebo adiční soli s kyselinou, kultivací kmene *Claviceps purpurea* produkujícího odpovídající 9'-methylenderivát nebo kmene získaného z *Claviceps purpurea*, vyznačující se tím, že se ke kapalně kultuře tohoto kmene přidá 1 až 5 g/l L-thiazolidin-4-karboxylové kyseliny nebo soli této kyseliny, kultivace se provádí při teplotě 22 až 26 °C a získané sloučeniny se popřípadě převedou na své adiční soli s kyselinami.