



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239441

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 1/02

(22) Přihlášeno 12 07 84
(21) (PV 5406-84)

(40) Zveřejněno 13 06 85

(45) Vydáno 16 04 87

(75)

Autor vynálezu

STUHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ; ELIS TOMÁŠ ing.; CVAK LADISLAV ing.;
KRAJÍČEK ALOIS PhDr., OPAVA; FLIEGER MIROSLAV RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob izolace a dělení alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu

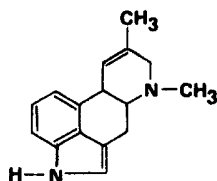
Způsob izolace a dělení alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu.

Postupem podle řešení se získávají klavinevé alkaloidy agroklavin a elymoklavin. Alkaloidy mají využití jako suroviny pro přípravu farmakologicky účinných polosyntetických derivátů námelevých alkaloidů jako je nicergolin, methylemetrin, lysurid, methergelin a další.

Vynález se týká způsobu izolace a dělení alkaloidů agreklavinu a elymeklavinu z fermentační tekutiny případně mycelia získaných submersní nebo povrchovou fermentací.

Agreklavin (M. Abe et. al. Jap. pat. 178 336)

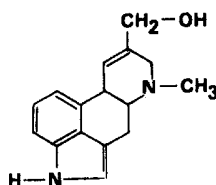
strukturního vzorce I



(I)

a elymeklavin (M. Abe et. al. US Pat. 2 835 675)

strukturního vzorce II



(II)

se vyskytují především ve sklerociích různých druhů huby parazitujících na divkých travách. Oba alkaloidy jsou rovněž obsaženy v saprofytních kulturách *Claviceps purpurea*, *Claviceps paspali* a *Aspergillus funigatus*. Elymeklavin byl izolován i ze semen rostlin čeledi *Convolvulaceae* (A. Hofmann, *Planta, Med.* 2, 354 (1961)). Alkaloidy slouží jako surovina pro parciální syntézu komerčně významných derivátů odvozených od ergolenového nebo ergolinového skeletu (Tung-Chung Cheong a H. R. Shough, *Tetrahedron Letters* 12, 1 627 (1977); E. Eich *Pharmazie* 30, H.8 (1975), M. Semonský a N. Kucharszyk, *Coll. Czech. Chem. Commun.* 33, 577 (1968), J. Křepelka et. al., *Coll. Czech. Chem. Commun.* 42, 1 412 (1977).

Způsob výroby uvedených alkaloidů včetně izolace popisuje čs. autorské osvědčení č. 199 986 (1980). Při izolaci alkaloidů uvedeným postupem dochází obvykle k tvorbě obtížně dělitelných emulzí. K dělení obou alkaloidů sloupcovou chromatografií je nutné použít vysokých násobků silikagelu a velkých objemů rozpouštědel. Postup není vhodný k použití v provozním měřítku.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob podle vynálezu, který řeší zpracování fermentační tekutiny nebo mycelia různých obsahů i alkaloidního spektra. Zpracování se s výhodou provede tak, že zalkalizovaná fermentační tekutina po případném odstranění glukánů, resp. ovlhčené a zalkalizované mycelium se extrahuje organickými rozpouštědly nebo směsí organických rozpouštědel. Použijí se s vodou nemísitelná rozpouštědla jako je chloroform, methylenchlorid dichlorethan, ethylacetát, butylacetát, ether nebo jejich směsi s pe-
lárnějšími rozpouštědly, jako jsou nižší alifatické alkoholy. S výhodou se použije směs ethylacetátu s jedním až deseti procenty ethanolu. Alkaloidy z takto získaného organického roztoku se extrakcí převedou do vodného roztoku anorganické kyseliny jako je kyselina fosforečná, chlorovodíková, sírová nebo organické kyseliny jako je kyselina vinná s výhodou do 0,5 a 1 % roztoku kyseliny citronové.

Přeextrahování alkaloidů z organické do vodné fáze podstatně snižuje přítomnost doprovodných balastních nealkaloidních látek a umožňuje dalšími extrakcemi oddělit elymoklavín od doprovodných alkaloidů, případně i chaneklavínu.

Extrakcí kyselého vodného roztoku alkaloidů organickými rozpouštědly jako je chlороформ nebo methylenchlorid s 0,5 až 1 % organické kyseliny jako kyselina mandlová, benzoová, nebo ftelevá s výhodem 0,5 % chlороформovým roztokem kyseliny salicylové se dosáhne oddělení agreklavínu. Získaný extrakt se zbaví kyseliny salicylové extrakcí roztokem uhličitanu sodného a vedeu, organický roztok báze agreklavínu se pak zahustí na odparek, případně dále zpracuje krystalizací.

Refinovaný kyselý vodný roztok elymoklavínu se zalkalizuje na pH 9 a extrahuje s vodou nemísitelnými organickými rozpouštědly, případně směsí organických rozpouštědel. Je možno použít stejných rozpouštědel jako při extrakci alkaloidů z fermentační tekutiny. Po odpaření extrakčního činidla se pevný odparek zpracovává na čistý elymoklavín krystalizací.

Ke kapalinovým extrakcím lze v provozním měřítku s výhodou použít kontinuálních způsobů extrakce, jako jsou rotační extraktory nebo vibrační kolony.

Výše uvedený základní postup, kterým lze zpracovat produkty fermentace s vysokým obsahem balastních látek i doprovodných nežádoucích alkaloidů lze výhodně modifikovat a zjednodušovat podle charakteru výchozí fermentační tekutiny nebo mycelia a požadavků na kvalitu vyizolovaných alkaloidů.

Izolaci alkaloidů z fermentačních tekutin obsahujících málo doprovodných balastních látek lze zjednodušit a postupovat tak, že po případném odstranění glukamů se k fermentační tekutině přidá kyselina s výhodou kyselina vinná na 0,5 až 1 % roztok a provede se přímo extrakce roztokem organické kyseliny. Z kyselé fermentační tekutiny zbavené agreklavínu se po alkalizaci extrahuje elymoklavín.

K izolaci elymoklavínu z půd nebo mycelií, které obsahují převahu elymoklavínu, není nutné používat složitý výše popisovaný dělicí extrakční postup, ale je možno využít schopnosti dělení obou alkaloidů krystalizací. Krystalizaci je možno provést u málo znečištěných extraktů půdy nebo mycelia z částečně zkoncentrovaného extraktu po přečištění přes aktivní uhlí.

Zvláště výhodného dělicího efektu je dosaženo při krystalizaci ze směsi ethylacetátu s 1 až 10 % etanolu. Výrazného čistícího a dělicího efektu je dosaženo i krystalizací z metanolického roztoku odbarveného aktivním uhlím. Krystalizaci je možno zařadit v kterékoliv fázi izolačního postupu, kdy je možno alkaloidy získat v pevné formě odpařením organického rozpouštědla, případně vysrážením z vodného roztoku.

Úpravou pH vodného roztoku alkaloidů na hodnotu 8 - 9 lze alkaloidy v dobrém výtěžku vysrážet. Čistota vysrážených alkaloidů je závislá na obsahu balastních látek ve výchozím vodném roztoku. Vysrážením alkaloidů přímo z fermentační tekutiny lze dosáhnout ve sraženině sumárního obsahu alkaloidů okolo 40 %, kdežto obsah alkaloidů ve sraženině získané úpravou pH kyselého vodného extraktu ze základního postupu převyšuje 80 %. Výtěžek sražení (i kvalita sraženiny) nepřímo závisí na obsahu organických rozpouštědel v kyselém vodném roztoku. Alkaloidy, které vlivem rozpustnosti zůstávají nevysrážené, je možno získat následující extrakcí do organického s vodou nemísitelného rozpouštědla, nebo směsí rozpouštědel nejlépe shodnou s použitou k první extrakci půdy nebo mycelia.

Uvedené postupy blíže vysvětlí následující příklady, které však neomezují rozsah vynálezu. Uváděná % jsou hmotnostní.

Příklady provedení

1. 850 ml fermentační tekutiny s obsahem 3 600 µg/ml obou alkaloidů s poměrem elymoklavinu : agroklavinu 1 : 1,6 se naředí 850 ml acetonu, vysrážené glukany se odfiltrují a naředěná půda se zbaví acetonu odpařením na rotační vakuové odparce za vakua vodní pumpy při teplotě 40 °C. Takto upravená půda se zalkalizuje 10% amoniakem na pH 9 a extrahuje směsí ether : methanol 8 : 2 (obj/obj). Alkaloidy se přeextrahují do 1% roztoku kyseliny citronové a ze spojených extraktů se odstraní agroklavin opakovanou extrakcí 0,5% roztokem kyseliny salicylové v chloroformu. Spojené extrakty se vytřepou 3 x 100 ml 10% roztoku sody a 3 x 100 ml vody. Chloroformový extrakt se po vysušení síranem sodným zahustí na odparek. Získá se 1,2 g agroklavinu s celkovým obsahem 90,6 % (bezvodá titrace), obsahující 97,5 % agroklavinu a 2,5 % elymoklavinu (HPLC). Elymoklavin se získá opakovanou extrakcí zalkalizovaného roztoku kyseliny citronové směsí ether : methanol 8 : 2. Spojené organické extrakty se po vysušení zahustí na pěnovitý odparek. (0,95 g, celkový obsah alkaloidů 80 % (bezvodá titrace), 95 % elymoklavín, 1,6 % agroklavin, 3,4 % ostatní (HPLC)).

2. 100 g mycelia se ovlhčí 20 ml vody obsahující 3,3 ml koncentrovaného amoniaku a nechá 4 hodiny stát, poté se perkoluje 300 ml směsí ethylacetátu : ethanolu 0,5 : 0,5. Takto získaný extrakt se vytřepe 3 x 50 ml 1% kyseliny vinné. Spojené extrakty se extrahují chloroformem s 0,5% kys. salicylové. Rafinovaný kyselý extrakt se na vakuové odparce zbaví organických rozpustidel a zalkalizuje na pH 9. Suspenze vysrážených alkaloidů se vychladí na teplotu 5 °C a alkaloidy se odfiltrují. Sraženina po vysušení a překrystalování z methanolu poskytne 0,6 g elymoklavinu 99% čistoty.

3. 500 ml fermentační tekutiny s obsahem 1 500 µg/ml elymoklavinu a 500 µg/ml agroklavinu se upraví na 1% roztok kys. vinné a extrahuje 0,5 % roztokem kys. benzoové ve směsi ether : methanol 9 : 1. Rafinovaná půda s obsahem kyseliny vinné s 10% amoniakem zalkalizuje na pH 9 a opakovaně extrahuje methylenchloridem, spojené organické výtřepky se po vysušení zahustí na odparek. Získá se 0,7 g elymoklavinu s celkovým obsahem 92 %. (97 % elymoklavinu, 1,5 % agroklavinu a 1,5 % ostatních alkaloidů (HPLC)). Spojené extrakty - ether-methanol s 0,5% kys. benzoové, obsahující agroklavin, se vytřepou 2 x 100 ml 10% roztoku sody a 150 ml vody. Organická fáze se vysuší síranem sodným a zahustí na odparek. Získá se 0,2 g agroklavinu celkový obsah 91 %, 96 % agroklavinu a 4 % elymoklavinu (HPLC).

4. 2 000 ml fermentační tekutiny s obsahem 1 700 µg/ml elymoklavinu a 300 µg/ml agroklavinu se naředí 2 000 ml ethanolu a nechá stát při teplotě 0 až 10 °C do druhého dne. Vysrážené glukany se odfiltrují přes vrstvu křemeliny a filtrát se na rotační vakuové odparce zbaví ethanolu. Odglukanovaná půda se zalkalizuje 10% roztokem sody na pH 9 a extrahuje 4 x 800 ml ethylacetátu s 1 % ethanolu. Spojené extrakty se zahustí na desetinu původního objemu a při teplotě -5 °C se nechají 4 hodiny krystalovat, krystal se odfiltruje a promyje ethylacetátem. Po vysušení se získá 2,8 g krystalu s celkovým obsahem alkaloidů 92 %, 96 % elymoklavinu a 4 % agroklavinu.

5. 1 000 l fermentační tekutiny zbavené glukany podle příkladu 1 se zalkalizuje 10% amoniakem na pH 9 a extrahuje se 3 000 l směsí ether : ethanol 8 : 2 na vibračním extraktoru s 30 teflonovými patry. Nátoky fází do extraktoru se nastaví v poměru 1 objem. díl fermentované půdy na 3 obj. díly směsi rozpouštědel. Celkové prosazení se volí 15 m³/m² h. Disperguje se těžší fáze, frekvence kmitů je 100 až 150/min. Získaný extrakt se extrahuje opět na vibračním extraktoru 1% roztokem kyseliny citronové. Na 3 obj. díly organické fáze se použije 1 obj. díl vodné fáze. Celkové prosazení je 20 m³/m² h, frekvence kmitů 150 až 200/min, disperguje se těžší fáze. Kyselý vodný extrakt se dále extrahuje chloroformem s 1 % kyseliny salicylové. Extrahuje se na odstředivém extraktoru typu Luwesta nebo Podbielniak.

Volí se poměr 2 díly vodné fáze na 1 díl chloroformu. Vodná fáze, zbevená předchozí extrakcí agroklavinu, se extrahuje chloroformem, opět na odstředivém extraktoru s poměrem fází 1 : 1. Získaný chloroformový extrakt se zahustí, převede do metanolu a krystaluje na čistý produkt.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolace a dělení alkaloidů agroklavinu a elymoklavinu vyznačený tím, že se fermentační tekutina zalkalizované na pH 8,5 až 9,5 po případném odstranění glukenu, nebo ovlhčené a zalkalizované mycelium, vyextrahuje s vodou nemísitelným rozpouštědlem jako je chloroform, methylenchlorid, ether, ethylacetát nebo směsí těchto rozpouštědel, s jedním až deseti objemovými procenty ethanolu nebo methanolu, s výhodou ethylacetátem s 5 objemovými procenty ethanolu, alkaloidy se extrakcí převedou do vodného 0,5 až 18% hmot. roztoku kyseliny vinné nebo citronové a provede se separace alkaloidů tím, že agroklavin se extrakcí převede do 0,5 až 1 % hmot. roztoku kyseliny salicylové v chloroformu a po zalkalizování na pH 9 se vyextrahuje elymoklavin s vodou nemísitelným rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel jako při první extrakci, z nichž se izoluje odpařením rozpouštědla nebo krystalizací.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se fermentační tekutina po okyselení kyselinou vinnou nebo citronovou na 0,5 až 1 % hmot. roztok přímo extrahuje roztokem kyseliny salicylové v chloroformu o koncentraci 0,5 až 1 % hmot.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se extrakt alkaloidů s převahou minimálně 80 % hmot. elymoklavinu v organickém rozpouštědle, jako je chloroform, ether methylenchlorid nebo směsí těchto rozpouštědel s jedním až deseti objemovými procenty ethanolu nebo methanolu, odpaří na desetinu původního objemu a krystalizací se získá elymoklavin.

4. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se získaný kyselý vodný výluh alkaloidů zalkalizuje na pH 8,5 až 9 a vyloučené alkaloidy se izolují filtrací.

5. Způsob podle bodů 1, 2, 3, 4 vyznačující se tím, že se kapalinová extrakce provádí kontinuálně.