



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

208140

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 519/02

(22) Přihlášeno 12 12 79
(21) (PV 8721-79)

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 15 05 84

(72) Autor vynálezu LÖRINCZ CSABA, SZARVADY BÉLA, TERDY LÁSZLÓ, DANGSI LAJOS a
FÖLDESI ZSUZSANNA, BUDAPEŠŤ (MLR)
(73) Majitel patentu RICHTER GEDEON VEgyÉSZETI GyÁR R. T., BUDAPEŠŤ (MLR)

(54) Způsob výroby peptidových alkaloidů ergolenového typu

1

Vynález se týká nového způsobu výroby peptidových alkaloidů ergolenového typu. Nový způsob se hodí k výrobě peptidových alkaloidů ve formě pravotočivých epimerů nejen z námelových drog, ale také z saprofytických kultur paličkovice nachové (*Claviceps purpurea*).

Peptidové alkaloidy s ergolenovou strukturou jsou jednak potřebné účinné látky v terapii a jednak důležité výchozí látky pro výrobu ještě účinnějších dihydroergotalkaloidů.

Jako nejdůležitější zástupce peptidových alkaloidů s ergolenovou strukturou je třeba uvést ergotamin a tři alkaloidy ergotoxinové skupiny, ergokristin, ergokornin a ergokryptin.

Při dnešním moderním průmyslovém postupu výroby ergotalkaloidů se používá jak k parazitické sklerociové produkci, tak také k saprofytické fermentaci kmenů paličkovice, získaných selekcí.

Podle prvních patentů pro výrobu námelových alkaloidů se alkaloidové směsi vyráběly z divoce rostoucího námelu (srov. například maďarský patentový spis č. 141 063). Tímto obtížným, průmyslově ještě zdaleka nevyřešeným problémem vzájemného oddělení peptidových alkaloidů se badatelé povzbuzovali k získání vyšlechtěných kmenů paličkovice (maďarské patentové spisy č. 154 035 a 155 148). Při výrobě ergotalkaloidů za velkoprovozních podmínek produkují však také tyto vyšlechtěné kmeny více nebo méně "cizí", zvláště ve vodě rozpustné alkaloidy (například ergometrin), jak je zřejmé například z maďarského patentového spisu č. 155 158.

Podle maďarského patentového spisu č. 142 407 se musí tyto alkaloidy rozpustné ve vodě izolovat při zvláštním výrobním kroku. U postupu popsaného v maďarském patentovém spise č. 152 934 se alkaloidy rozpustné ve vodě nanejvýš zpracují jako vedlejší produkty.

208140

Pro postupy, které jsou až dosud známé k výrobě peptidových alkaloidů, je charakteristické, že se extrakcí získaný a potom vypreparovaný produkt získává v amorfním a tedy nikoliv v krystalickém stavu.

Při zpracovávání tohoto amorfního surového produktu se surový produkt nejčastěji obohacuje chromatografickým čištěním, aby se odstranily přítomné balastní látky, působící velmi rušivě při dalších výrobních krocích, zvláště při konverzi (srov. britský patentový spis č. 1 158 380, maďarský patentový spis č. 164 166, patentový spis NSR č. 2 113 281).

Jako nejbližší výrobní krok se směs pravotočivých a levotočivých isomerů epimeruje na levotočivou sloučeninu a potom se konečný produkt vypreparuje. Po několika postupech se bezprostředně získá touto nanejvýš šetrnou cestou, bez konverze, levotočivý konečný produkt (maďarský patentový spis č. 164 116); čištění produktu je však také v tomto případě žádoucí.

Takové způsoby se mohou použít pouze v těch případech, kdy výchozí látka neobsahuje pravotočivý isomer nebo kdy jeho obsah je jen velmi malý.

Souhrnně se může uvést, že všechny až dosud známé postupy pro výrobu peptidových alkaloidů ergolenového typu jsou velmi zdlouhavé a sestávají z mnoha výrobních kroků, přičemž tyto kroky slouží pouze jedinému účelu, zbavit peptidové alkaloidy, obsažené v droze nebo fermentační kapalině, nečistot.

Tyto kroky se skládají v podstatě z extrakčních operací, při kterých se ergolenové sloučeniny, jsou-li přítomné ve vodném prostředí, převádějí na soli ke zvýšení své rozpustnosti, a mají-li se převést do organické fáze, ze svých solí se uvolňují. Každý krok této vícenásobné změny fází však přináší s sebou ztráty, v důsledku určité rozpustnosti ergolenových alkaloidů v druhé fázi.

Cílem předloženého vynálezu je odstranit výše uvedené nevýhody a zjednodušit způsob výroby zpracováním novým způsobem, při kterém se výrobní kapacita zvýší zjednodušením způsobu, přestože dojde ke snížení počtu výměny fází a získá se produkt v krystalickém a nikoliv v amorfním stavu.

Vynález je založen na těchto třech poznatech:

1. Když se extrakt získaný po první extrakci zahustí nebo popřípadě odpaří a koncentrát nebo odparek extrahuje ternární směsí formamidu, vody a kyseliny nebo frakcionovaně rozpustí, potom se získají peptidové alkaloidy ergolenového typu v důsledku mimořádně dobré rozpustnosti ve formamidu ve velmi malém objemu směsi rozpouštědel, přičemž formamid až dosud nebyl k získání těchto peptidových alkaloidů použit;

2. Extrahuje-li se roztok surových peptidových alkaloidů, získaný shora popsaným postupem, rozpouštědlem nemísitelným s vodou, extrakt odpaří a získaný odparek rozpustí v alkanolu s 1 až 6 atomy uhlíku a roztok nechá stát, tak se získají peptidové alkaloidy ergolenového typu v krystalickém stavu a ve formě méně rozpustných pravotočivých epimerů v takřka kvantitativním výtěžku, přičemž levotočivé epimery se mohou získat v krystalické formě pouze po dlouhotrvajících čistících operacích;

3. Když se získané krystalické pravotočivé epimery odtuční působením rozpouštědla tuků, s výhodou methylisobutylketonem nebo butylacetátem v heterogenní fázi, tak se získají pravotočivé epimery o tak vysoké čistotě, že se po epimeraci mohou bezprostředně použít k terapeutickým účelům.

Podstatou vynálezu je způsob výroby peptidových alkaloidů ergolenového typu z námelo-vých drog nebo ze submersních kultur kmene paličkovice (*Claviceps*) extrakcí a čištěním extraktu změnou fází, který se vyznačuje tím, že se surová směs epimerů peptidových alkaloidů ergo-

lenového typu rozpustí v protickém rozpouštědle, s výhodou v alkoholu s 1 až 6 atomy uhlíku, roztok se nechá stát a odloučený pravotočivý isomer se oddělí, odtuční působením rozpouštědla tuků, s výhodou methylisobutylketonu nebo butylacetátu v heterogenní fázi a získaný produkt izoluje.

Při provádění způsobu podle vynálezu se sklerocie nebo nefiltrovaná fermentační kapalina z fermentace provedené s paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*) extrahuje rozpouštědlem nemísitelným s vodou a sice ketonem, esterem karboxylové kyseliny nebo chlorovaným uhlovodíkem v přítomnosti báze.

Z extrakčních rozpouštědel se oddělí sklerocie nebo fermentační kapalina, potom se extrakce alespoň ještě jednou opakuje, avšak nyní již bez použití báze, s čistým rozpouštědlem.

Z rozpouštědel se k této extrakci může použít jako keton s výhodou methylisobutylketon, jako ester karboxylové kyseliny ethylacetát nebo diethylkarbonát, popřípadě jako chlorovaný uhlovodík chloroform a jako báze s výhodou hydroxid amonný.

Extrakt získaný tímto způsobem se potom zahustí nebo odpaří do sucha a peptidové alkaloidy ergolenového typu se z koncentráту nebo odparku alespoň jednou a s výhodou třikrát extrahují ternární směsí amidu karboxylové kyseliny, vody a kyseliny.

Jako amid karboxylové kyseliny se s výhodou může použít kyselina fosforečná nebo vinná.

Peptidové alkaloidy ergolenového typu přítomné ve spojených extraktech se potom extrahují z vodné směsi rozpouštědel ketonem, esterem karboxylové kyseliny nebo chlorovaným uhlovodíkem. K této extrakci se může použít jako keton s výhodou methylisobutylketon, jako ester karboxylové kyseliny s výhodou ethylacetát nebo jako chlorovaný uhlovodík s výhodou chloroform.

Získané extrakty se spojí, rozpouštědlo se odpaří, odparek rozpustí v jednomocném alifatickém alkoholu, s výhodou v alkoholu s 1 až 6 atomy uhlíku a roztok se nechá stát delší dobu, s výhodou asi 20 hodin. Během stání se vyloučí peptidové alkaloidy ergolenového typu ve formě pravotočivých epimerů skoro kvantitativně v krystalické formě z roztoku. Krystaly získané tímto způsobem se odfiltrují, promyjí a suší.

Krystaly, které ještě obsahují značné množství nečistot charakteru tuku, se potom suspendují v rozpouštědle tuku. Krystaly tímto způsobem zbavené tuku se poté odfiltrují, promyjí a suší. Jako rozpouštědlo tuků se mohou použít ketony, estery karboxylových kyselin nebo uhlovodíky. Jako příklad účelně použitelných ketonů se může uvést methylisobutylketon, esterů karboxylových kyselin n-butylacetát a z uhlovodíků benzin.

Pravotočivé peptidové alkaloidy ergolenového typu odtučněné tímto způsobem se tak mohou získat v krystalické formě ve výtěžku 95 až 99 %.

Při zpracování drog ergotaminového typu se drogy podle velmi výhodného způsobu provedení podle vynálezu pouze extrahují, extrakty se bez další změny fázi hned zbaví rozpouštědla, odparek se rozpustí v alkanolu s 1 až 6 atomy uhlíku, s výhodou v methanolu a methanolický roztok se nechá stát.

Ergotamin vyloučený v krystalické formě se odfiltruje, promyje a suší a nakonec odtuční suspendováním v methylisobutylketonu.

Způsob podle vynálezu je blíže osvětlen následujícími příklady. Je třeba však upozornit, že vynález žádným způsobem není omezen na obsah těchto konkrétních příkladů.

Ke stanovení sloučenin ergolenového typu, které jsou popsány v příkladech, se používají tyto analytické metody:

Extrakce drogy:

2 g rozemletého námelu o velikosti částic nejvýše 0,5 mm se smíchá s 25 ml ethylacetátu a 1,5 ml 10% roztoku hydroxidu amonného. Směs se 30 minut třepe, filtruje a námel zbylý na filtru ještě dvakrát extrahuje, vždy 25 ml ethylacetátu. Extrakty se spojí a dále zpracují tak, jak je popsáno pod extrakcí fermentační kapaliny.

Extrakce fermentační kapaliny:

25 ml fermentační kapaliny se upraví koncentrovaným roztokem hydroxidu amonného na pH 8 až 8,5, přidá se 75 ml ethylacetátu a 2 minuty prudce míchá. Fáze se oddělí na sedimentační odstředivce a vodná fáze se ještě dvakrát extrahuje vždy 25 ml ethylacetátu.

Organické fáze se spojí a odpaří ve vakuu na objem 50 ml. Koncentrát získaný tímto způsobem, nebo extrát získaný při extrakci drogy se čtyřikrát protřepe vždy s 25 ml 5% roztoku kyseliny fosforečné ve vodě. Vodné extrakty s obsahem kyseliny fosforečné se spojí, upraví 10% roztokem hydroxidu amonného na pH 8 až 8,5 a takto zalkalizovaný roztok třikrát vytřepe vždy s 25 ml chloroformu. Chloroformové fáze se spojí, suší bezvodým síranem sodným a odpaří do sucha. Odparek se rozpustí ve 2 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 1:1.

Z tohoto roztoku se k stanovení ergotaminu a ergokristinu nanese 0,1 ml množství roztoku na vrstvu o rozměru 5 x 20 cm ze silikagelu G nebo pro stanovení ergokorninu a ergokryptinu se nanese 0,2 ml na vrstvu z kysličníku hlinitého (aluminiumoxid 60 E).

Chromatogram se v případě ergotaminu a ergokristinu vyvolává směsí chloroformu a ethanolu v poměru 90:10, v případě ergokorninu a ergokryptinu se vyvolává směsí diethyletheru, n-butylacetátu a isobutylalkoholu v poměru 4,5:4,5:0,625. Skvrny se stanoví v rozptýleném ultrafialovém osvětlení a eluují 10 ml bezvodého ethanolu.

Měření:

Spektroskopicky při 314 nm v 1 cm křemenné kyvetě.

Výpočet:

Vztaženo na standard.

Při analýze se rozpustí 25 mg produktu v 5 ml směsi chloroformu a methanolu v poměru 1:1. Stanovení v případě ergotamininu nebo ergokristinu se provádí s 0,1 ml a v případě ergokorninu nebo ergokryptinu s 0,2 ml tohoto roztoku, podle shora popsaných chromatografických metod na tenké vrstvě.

Příklad 1

1 kg drogy ergokristinového typu (vyrobené podle způsobu popsaného v maďarském patentovém spisu č. 154 035; obsah ergotalkaloidů: 2,1 % ergokristinu, 0,8 % erhokritininu, 0,2 % ergotaminu, 0,1 % ergotamininu a 1 % ostatních alkaloidů typu lysergové kyseliny) se rozelele na částice velikosti nejvýše 2 mm, přidají se 4 litry ethylacetátu a 250 ml 10% vodného roztoku hydroxidu amonného.

Směs se míchá 3 hodiny a potom filtruje. Extrakce drogy se dvakrát opakuje vždy se 2 litry ethylacetátu. Odfiltrované ethylacetátové fáze se spojí, odpaří ve vakuu při teplotě 40 °C na objem 0,5 litru a koncentrát získaný tímto způsobem se třikrát extrahuje vždy 100 ml směsí formamidu, vody a koncentrovaného roztoku kyseliny fosforečné v poměru 6:10:1.

Vodné fáze se spojí a přidá se 200 ml vody a 100 ml ethylacetátu. Směs se nejprve míchá a potom alkalizuje koncentrovaným vodným roztokem hydroxidu amonného, až na pH 8 až 10.

Míchání se přeručí a fáze se od sebe oddělí. Vodná fáze se ještě dvakrát extrahuje vždy 100 ml ethylacetátu. Ethylacetátové fáze se spojí a odpaří ve vakuu při teplotě 40 °C do sucha. Získaná surová směs peptidových alkaloidů ergolenového typu se rozpustí v 10 ml methanolu při teplotě 15 až 25 °C a roztok pro krystalizaci nechá stát 20 hodin za teploty místnosti.

Získané krystaly se odfiltrují, dvakrát promyjí vždy 2 ml methanolu a suší. Tímto způsobem se získají 3,4 g pravotočivého epimeru (složení: 77 % ergokristininu, 1 % ergokristininu, 2 % ergotamininu a různé nečistoty převážně mastného charakteru).

Získaný surový produkt se suspenduje v 6,8 ml methylisobutylketonu a nechá stát 0,5 hodiny. Získané krystaly se odfiltrují, dvakrát promyjí vždy 2 ml methylisobutylketonu a suší. Získá se 2,7 g směsí alkaloidů o tomto složení: 97 % ergokristininu, 1 % ergokristininu a 2 % ergotamininu.

P ř í k l a d 2

1 kg drogy ergotaminového typu (vyrobené podle způsobu popsaného v maďarském patentovém spisu č. 155 148; obsah ergotalkaloidů: 3,2 % ergotaminu, 0,9 % ergotamininu, 0,3 % ergokristinu a ergokristininu, dále 1,3 % ostatních alkaloidů typu lysergové kyseliny) se rozemele na částice velikosti nejvýše 2 mm.

Extrakce drogy se provede způsobem popsaným v příkladu 1. Spojené extrakty se odpaří ve vakuu na objem 500 ml a ergotalkaloidy přítomné v extraktu se čtyřikrát extrahují vždy 50 ml směsí formamidu, vody a koncentrovaného roztoku kyseliny fosforečné v poměru 5:5:0,3.

Spojené extrakty se smíchají se 70 ml chloroformu a za míchání se provede alkalizace koncentrovaným vodným roztokem hydroxidu amonného až na pH 9 až 10. Fáze se vzájemně oddělí a vodná fáze se ještě třikrát extrahuje vždy 40 ml chloroformu. Chloroformové fáze se spojí a ve vakuu za teploty 40 °C odpaří do sucha. Jako odparek získaná surová směs epimerů peptidových alkaloidů ergolenového typu se rozpustí v 10 ml methanolu za teploty 15 až 25 °C, roztok se nechá stát při teplotě místnosti 20 hodin a potom se filtruje.

Získané krystaly se promyjí vždy 2 ml methanolu a suší. Tímto způsobem se získá 5,3 g surové směsí pravotočivých epimerů (složení: 71 % ergotamininu, 1 % ergokristininu, dále hlavně nečistoty mastného charakteru).

Surový produkt získaný shora uvedeným způsobem se suspenduje v 10,0 ml methylisobutylketonu a suspenze 30 minut míchá. Získané krystaly se odfiltrují, dvakrát promyjí vždy 2 ml methylisobutylketonu a suší. Získá se 3,84 g vyčištěného produktu o složení 96 % ergotamininu a 0,3 % ergokristininu.

P ř í k l a d 3

1 kg drogy typu popsaného v příkladu 2 se extrahuje ethylacetátem, způsobem popsaným v příkladu 1 a z extraktu se odstraní rozpouštědlo, přičemž se získá 100 ml viskózního olejovitého produktu.

K tomuto olejovitému produktu se přidá 50 ml methanolu a při teplotě místnosti míchá 20 hodin. Získané krystaly se odfiltrují, dvakrát promyjí vždy 2 ml methanolu a suší. Tímto způsobem se získá 5,8 g surového pravotočivého epimeru (složení: 63 % ergotamininu a různé nečistoty, převážně mastného charakteru).

Produkt se suspenduje ve 12 ml methylisobutylketonu a suspenze se nechá stát půl hodiny, přičemž se požadovaný produkt vyloučí v krystalické formě. Získané krystaly se odfiltrují, třikrát promyjí vždy 5 ml methylisobutylketonu a suší. Tímto způsobem se získá 3,90 g produktu obsahujícího 95 % ergotamininu.

P ř í k l a d 4

10 litrů fermentační kapaliny (získané podle způsobu popsaného v maďarském patentové spisu č. 164 816 submersní kultivací kmene *Claviceps purpurea* OKI 88/1972, uloženého u Maďarského zemského institutu pro národní hygienu OKI, Budapešť), s obsahem alkaloidů: 0,21 mg/ml ergokorninu, 0,17 mg/ml ergokryptinu, 0,08 mg/ml ergokornininu, 0,03 mg/ml ergokryptininu a 0,35 mg/ml ergometrinu, se extrahuje nejprve 5 litry a potom dvakrát vždy 3 litry methylisobutylketonu, přičemž během první extrakce se hodnota pH systému upraví koncentrovaným roztokem hydroxidu amonného na pH 9 až 10.

Po každé extrakci se fáze oddělí v separátoru, organické fáze se spojí a odpaří ve vakuu za teploty 40 °C na objem 200 ml. Koncentrát se pětikrát extrahuje vždy 100 ml směsí formamidu, vody a kyseliny vinné v poměru 5:5:0,1.

Extrakty se spojí a pětikrát vytřepou vždy 100 ml chloroformu. Chloroformové fáze se spojí a dále zpracují, zatímco vodné fáze obsahující formamid se odloží a mohou použít k získání ergometrinu.

Spojené chloroformové fáze se odpaří ve vakuu za teploty 40 °C do sucha. Jako odparek získaná surová směs epimerů peptidových alkaloidů ergolenového typu se rozpustí ve 20 ml n-butanolu a roztok se nechá stát při teplotě místnosti 24 hodiny. Pravotočivé epimery se vyloučí v krystalické formě. Krystaly se odfiltrují na slinutém skleněném filtru, dvakrát promyjí vždy 4 ml n-butanolu a suší. Tímto způsobem se získá 5,8 g produktu tvořeného směsí krystalů ergokornininu a ergokryptininu. Složení produktu je 41 % ergokornininu, 31 % ergokryptininu a dále různé nečistoty, převážně mastného charakteru.

Krystaly získané výše uvedeným postupem se suspendují v 11,6 ml n-butylacetátu ochlazeného na teplotu 0 °C, suspenze se míchá 30 minut a potom filtruje. Produkt zbývající na filtru se dvakrát promyje vždy 2 ml n-butylacetátu ochlazeného na teplotu 0 °C a suší.

Tímto způsobem se získají 4 g vyčištěného produktu, který sestává z 59 % ergokornininu a 41 % ergokryptininu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby peptidových alkaloidů ergolenového typu z námelových drog nebo ze submersních kultur paličkovice nachové extrakcí a čištěním extraktu změnou fází, vyznačující se tím, že se surová směs peptidových alkaloidů ergolenového typu rozpustí v protickém rozpouštědle, zvláště v alkanolech s 1 až 6 atomy uhlíku, roztok se nechá stát, vyloučené epimery se oddělí, odtuční rozpouštědlem tuků, zvláště methyloisobutylketonem nebo butylacetátem a získaný produkt se izoluje.