

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

52116

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 29.VIII.1963 (P 102 466)

Pierwszeństwo: 30.VIII.1962 Szwajcaria

Opublikowano: 28.X.1966

Kl. 6 b, 16/03

MKP C 12 d 1/02

BIBLIOTEKA

UKD Urzędu Patentowego
Państwa Rzeczypospolitej Ludowej

Współtwórcy wynalazku: dr Jürg Rutschmann, dr Hans Kobel

Właściciel patentu: Sandoz A. G., Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania amidów kwasu lizergowego i izolizergowego

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania amidów kwasu lizergowego i izolizergowego za pomocą nowego Szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall. Różne szczepy tego grzyba były już znane od dłuższego czasu, jednakże dopiero niedawno udało się po raz pierwszy z określonego szczepu tego rodzaju grzyba, po uprzednim „zaktywowaniu” go otrzymać pochodne kwasu lizergowego i izolizergowego. Aktywację tego szczepu prowadzono przez przeszczepienie go na kielki traw. Później inna grupa badaczy stwierdziła, że ten sposób postępowania da się w określonych warunkach ominąć, jednakże tak otrzymane wydajności kwasu lizergowego są dość małe, co bardzo utrudnia techniczne wykorzystanie tej metody.

Znany jest na przykład z brytyjskiego opisu patentowego nr. 883 329 sposób otrzymywania mieszaniny amidu kwasu lizergowego i amidu kwasu izolizergowego na drodze fermentacji roztworu wodnego pożywki, zawierającej źródło węgla, azotu i sole mineralne w warunkach aerobowych za pomocą szczepu *Claviceps paspali* Stevens et Hall wyodrębnionego ze sklerocji wytworzonych na roślinach *Paspalum disticum*, zebranych w Tivoli koło Rzymu. Szczep ten jednak, jak również inne dotychczas znane szczepy *Claviceps paspali* Stevens et Hall nie tworzy konidiów in vitro.

W sposobie według wyżej wymienionego brytyjskiego opisu patentowego nr 883 329 prowadzi się fermentację głębinową w temperaturze 22—30°C przy

2

pH = 4,6—6, w ciągu 10—15 dni. Przesącz z kultury alkalizuje i ekstrahuje rozpuszczalnikami organicznymi lub absorbuje na stałym sorbencie i wyodrębnia alkaloidy.

5 Dla wprowadzenia metod biologicznych na skalę techniczną jest rzeczą wielkiej wagi, czy określony grzyb wytwarza konidia czy też nie. Za pomocą konidiów można bowiem otrzymać kultury z jednego zarodnika i dzięki temu dochodzi się do genetycznie jednolitego materiału. Z konidii można też, działaniem promieni rentgenowskich i ultrafioletowych, jak również działaniem odczynników chemicznych, dużo łatwiej otrzymać mutanty i wydzielić je ze sterylnej grzybni. Ponadto zakażając konidiami kwitnące rośliny *Paspalum* można na naturalnym żywicielu otrzymać przetrwalniki, które doskonale nadają się do konserwowania szczepu. Z tego trwałego materiału można na przykład otrzymać świeży materiał do szczepień, o ile kultury in vitro degenerują się. Konidia mogą być również poddawane liofilizacji i w postaci zliofilizowanej mogą być przechowywane bez ograniczeń. Do szczepienia pożywki najlepiej nadaje się zawiesina konidiów, ponieważ w takiej postaci można ją najdogodniej dawkować do szczepienia i można z nią najłatwiej pracować w warunkach jałowych. Natomiast jałowa grzybnia musi być na początku zhomogenizowana.

W sposobie według wynalazku zastosowano nowy szczep *Claviceps paspali* Stevens et Hall, zdolny do wytwarzania konidiów in vitro, Szczep ten znale-

złono w Nowej Gwinei na trawie *Paspalum dilatatum* Poir. Zdolność wytwarzania konidiów stanowi cechę odróżniającą ten nowy szczep pod względem morfologicznym od dotychczasowych szczepów używanych do otrzymywania amidów kwasu lizergowego i izolizergowego. Dalszą różnicę stanowi to, że nowy szczep ma średnie wymiary główek $2,8 \times 3,2$ mm (w porównaniu z wymiarami główek $3,4 \times 3,2$ mm u szczepu stosowanego według brytyjskiego opisu patentowego nr. 883 329). Próbkę nowego szczepu grzyba zostały zdeponowane w Departamencie Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (Northern Utilization Research and Development Division), pod numerem NRRL 3027. W przeciwieństwie do dotychczas opisanych szczepów *Claviceps paspali* Stevens et Hall przetrwalniki szczepu NRRL 3027 zawierają alkaloidy. Zawartość alkaloidów w tych próbkach przetrwalników wynosi 0,04%, w tym:

amidu kwasu lizergowego	40%
amidu kwasu izolizergowego	20%
ergobazyny	15%
ergobazyniny	10%
chanoklawiny	10%
nieznaných	5%

Należy zwrócić uwagę na fakt, że stosowane dotąd szczepy *Claviceps paspali* Stevens et Hall tworzyły tylko amidy kwasu lizergowego i izolizergowego. Szczep według wynalazku tworzy natomiast dodatkowo ergobazynę, ergobazyninę i chanoklawinę. Wyróżnia to nowy szczep od znanych pod względem fizjologicznym.

Analizę mieszaniny alkaloidów przeprowadza się metodą chromatografii bibułowej a procentowy udział poszczególnych składników oznaczono na podstawie intensywności barwy plamek.

Wydzielanie i rozmnażanie nowego szczepu grzyba odbywa się w następujący sposób:

Z wewnętrznej części sklerocjum pobiera się sterylnie mały kawałek tkanki i przenosi na pożywkę z agaru i brzeczki piwnej o składzie: 250 ml bezchmielowej jasnej brzeczki piwnej (17% suchej substancji), 18 g agaru, wody destylowanej do 1 l (pH = 5,2). Rozwija się okrągła kolonia, która po upływie 14 dni w temperaturze 24°C osiąga średnicę 15 mm. Składa się ona z błony grubości około 1 mm o strukturze pseudoprzetrwalnikowej, oraz z białej grzybni powietrznej. Brunatny barwnik dyfunduje do wnętrza agaru. Konidia nie wytwarzają się. Kolonię tę rozdrabnia się za pomocą łopatkki i przenosi do próbki zawierającej 12 cm³ pożywki agarowej o następującym składzie:

brzeczka piwna	500 ml
moczone ziarno	60 g
kwas mlekowy	1 ml
roztwór sialmiku do pH = 4,8	
agar-agar	20 g

woda destylowana do 1 l

Wokół każdej szczepionki powstaje mała kolonia o początkowo białej, później czerwono-brunatnej grzybni. Po 10 dniach na wierzchołkach strzępek grzybni zaczynają zawiązywać się konidia. Po 20 dniach konidia są już w wystarczającej ilości, aby otrzymać z nich wodną zawiesinę, którą można zaszczyć 20 próbek skośnego agaru (o składzie jak

wyżej) Kultury te poddaje się dojrzewaniu w temperaturze 24°C. Konidia kiełkują po upływie 24–36 godzin. Po 6 dniach powierzchnia agaru pokrywa się równomiernie subtelną, białą grzybnią, po 10 dniach tworzy się brunatnoszara, delikatnie zmarszczona wierzchnia warstwa grzybni, którą ściśle pokrywa agar i posiada krótkie strzępki powietrzne. Na nich zawiązują się konidia. Po upływie 12 tygodni w wielu miejscach grzybni tworzą się centra, na których wydzielają się małe kropelki czerwono-brunatnej cieczy. Kropelki osiągają średnicę 1–3 mm i wkrótce z bardzo licznych konidiów powstaje mleczne zmętnienie. Po upływie 16–18 dni tworzenie się konidiów jest praktycznie zakończone. Kultura na ukośnym agarze w próbce o średnicy 2 cm i w 12 ml pożywki agarowej zawiera około 10⁸ konidiów.

Kulturę wstępną przygotowuje się w następujący sposób: Jako medium stosuje się 4,5-procentowy wodny roztwór wyciągu słodowego o pH=5,4. Jeden litr tego roztworu poddaje się sterylizacji w kolbie stożkowej o pojemności 2 litrów w ciągu 20 minut w temperaturze 110°C, następnie przeszczenia się 5,10⁸ konidiów z dwudziestodniowej kultury agarowej przeszczepów otrzymanych z jednego zarodnika szczepu z Nowej Gwinei i poddaje się inkubacji w ciągu 3 dni w obrotowej wytrząsarce w temperaturze 23°C. Powstaje gęsta kultura złożona z drobnych płatków grzybni. Płatki składają się z luźnych kłębków strzępek i posiadają średnicę od 2–4 mm. Nie daje się wykryć żadnych alkaloidów.

W celu otrzymania większych ilości wstępnej kultury, przeszczenia się 5.10⁸ konidiów w szklanym aparacie do fermentacji, zawierającym 10 l tego samego medium, i poddaje dojrzewaniu w ciągu 3 dni w temperaturze 23°C przepuszczając powietrze z szybkością 6 l powietrza na minutę oraz mieszając z szybkością 200 obrotów mieszadła na minutę. Dla zwalczania piany stosuje się emulsję silikonową. Otrzymane w aparacie fermentacyjnym kultury są takiej samej jakości jak kultury otrzymane przez wytrząsanie. Dla głównej kultury okazuje się szczególnie korzystna pożywka, zawierająca w 1 l wody destylowanej:

sorbit	50 g
kwas bursztynowy	36 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,3 g
FeSO ₄	1 mg · 7 H ₂ O
ZnSO ₄	10 mg · 7 H ₂ O

o pH=5,4 ustalonym za pomocą NH₄OH.

O wpływie jonów cynku i żelaza na wzrost grzyba i zawartość alkaloidów w roztworze kultury informują dwie następujące tablice:

1. Wzrost wyrażony w g suchej grzybni na 1 litr roztworu kultury

		FeSO ₄ · 7 H ₂ O w mg/l		
		0	1	10
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0	7,2	6,1	6,1
w mg/l	1	4,2	11,7	17,1

2. Zawartość alkaloidów

Wszędzie 1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ na 1 litr roztworu kultury

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ w mg/l	Zawartość alkaloidów w mg/l.
0	8
1	1060
15	985
60	950

Pożywkę tę zaszczenia się 10-procentowym roztworem trzydniowej kultury wstępnej i poddaje inkubacji w porcjach po 100 ml w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml, umieszczonych w wstrząsarce rewersyjnej w temperaturze 23 °C. Dalej kultury poddaje się rozmnażaniu w analogiczny sposób w aparacie do fermentacji, zawierającym 170 l pożywki, wykonanym ze stali nierdzewnej. Przepuszcza się przy tym powietrze z szybkością 170 l na minutę oraz miesza się początkowo z szybkością 70 obrotów na minutę, później 180 obrotów na minutę. W celu zwalczania piany stosuje się emulsję silikonową.

W ten sposób powstają kultury, złożone z licznych jednakowych cząstek grzybní. Ich średnica wynosi około 5 mm oraz posiadają one kuliste, zwarte jądro o średnicy około 1 mm utworzone z tkanki pseudoparenchymatycznej. Jądro to posiada rozmieszczone gwiazdziste, długości około 2 mm wyrostki z równoległe ułożonych strzępeków. Pod koniec dziesięciodniowego okresu istnienia kultury grzybnia jest jasnobrunatna, a przesącz zabarwiony intensywnie na kolor czerwono-brunatny.

Tak otrzymany przesącz kultury może być poddawany na przykład następującej przeróbce: 20 l przesączu kultury traktuje się około 1,2 kg sody aż do ustalenia $\text{pH} = 9,75$ i trzykrotnie ekstrahuje się 20 l chlorku etylenu. Fazę organiczną przemywa się jeden raz 5 l wody i następnie zagęszcza się w próżni do ogólnej objętości 4 l. Koncentrat ekstrahuje się trzykrotnie 1 l i 5 procentowego kwasu winowego. Wyciągi kwasu winowego traktuje sodą do $\text{pH} = 9,0$ i ekstrahuje trzykrotnie 2 l chlorku etylenu. Wyciągi przemycie małą ilością wody i wysuszone siarczanem dają 16,7 g zasad, które według van Urka zawierają 12,2 g substancji indolowych, względnie po badaniu chromatografią bibulową zawierają 11,3 g zmydlających się indoli.

Tak otrzymana mieszanina zasad, po zanalizowaniu metodą chromatografii bibulowej wykazuje następujący skład:

amid kwasu lizergowego	45%
amid kwasu izolizergowego	42%
ergobazyna	3%
ergobazynina	3%
chanoklawina	3%
elimoklawina	2%
penniklawina	2%

Wychodząc z kultury fermentacyjnej otrzymuje się z niej po 12 dniach hodowli 145 l przesączu. Ten przesącz po zalkalizowaniu 2n ługiem sodowym

ekstrahuje się 5 razy 200 l estru octowego przy $\text{pH} = 7,4$ i 3 razy 200 l estru octowego przy $\text{pH} = 10$. Oba wyciągi z octanem etylu zagęszcza się do objętości 10 l i z koncentratu ekstrahuje się alkaloidy wodnym roztworem kwasu winowego. Wyciągi uzyskane z ekstrakcji wodnym roztworem kwasu winowego ekstrahuje się po zalkalizowaniu ponownie przy $\text{pH} = 7,4$ i $\text{pH} = 10$ octanem etylu i po przemyciu małą ilością wody odparowuje do suchości. Pozostałość ekstrakcyjna po zanalizowaniu metodą chromatografii bibulowej wykazuje następujący skład:

amid kwasu lizergowego	66%
amid kwasu izolizergowego	21%
ergobazyna	4%
ergobazynina	2%
chanoklawina	2%
elomoklawina	2%
agroklawina	2%
penniklawina	1%

Otrzymana mieszanina jest szczególnie bogata w amid kwasu lizergowego względnie amid kwasu izolizergowego. Oba te związki w przeciwieństwie do naturalnych alkaloidów sporyszu, takich jak na przykład ergobazyna dają się znacznie łatwiej hydrolizować do wolnego kwasu lizergowego, który jest ważnym produktem pośrednim dla syntezy wysokoaktywnych preparatów farmaceutycznych. W razie potrzeby można również tę hydrolizę przeprowadzać bezpośrednio w cyklu roboczym, wydzielając mieszaninę alkaloidów z przesączu kultury, na przykład w następujący sposób:

16,7 g otrzymanej według powyższej metody mieszaniny surowych alkaloidów rozpuszcza się w 50 procentowym alkoholu i alkaliczny roztwór po dodaniu 75 g wodorotlenku barowego i 2 g dwutlenianu sodowego ogrzewa się w ciągu ½ godziny pod chłodnicą zwrotną.

Do oziębionej mieszaniny reakcyjnej dodaje się 16 ml stężonego amoniaku i 218 ml 2n kwasu siarkowego. Następnie osad odfiltruje się. Pozostałość odszlamowuje się jeszcze 5 razy za pomocą 200 ml gorącej mieszaniny metanolu i amoniaku (9:1). Przesącz oczyszcza się przez przemywanie roztworem mieszaniny metanolu i amoniaku i zagęszcza w próżni. Tak otrzymany surowy kwas lizergowy wytrąca się z mieszaniny o zawartości 75 ml metanolu i 75 ml 2n ługu sodowego przez dodatek 33 ml lodowatego kwasu octowego. Wydajność czystego kwasu lizergowego wynosi 6,5 g.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania amidów kwasu lizergowego i izolizergowego na drodze mikrobiologicznej, znamienny tym, że tworzący konidia szczep *Claviceps paspali* Stevens et Hall nr NRRL poddaje się głębokiej hodowli saprofitycznej na pożywce, składającej się z polialkoholu jako źródła węgla, soli amonowej kwasu organicznego jako źródła azotu i soli mineralnych, uzyskaną masę sacczy, a z przesączu wyodrębnia amidy kwasu lizergowego i/lub izolizergowego przez ekstrakcję organicznym rozpuszczalnikiem.