



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 105

(21) PV 121-88.C
(22) Přihlášeno 05 01 88

(40) Zveřejněno 12 09 89
(45) Vydáno 31 08 90

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 07 D 519/02

(75)
Autor vynálezu

STUHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ,
FLIEGER MIROSLAV RNDr. CSc.,
VOTRUBA JAROSLAV ing. CSc., PRAHA,
CVAK LADISLAV ing.,
ZAPLETAL JIŘÍ pharm. dr.,
SAJDL PŘEMYSL RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Způsob separace agroklavinu ze směsi klavino-
vinových alkaloidů

(57) Řešení se týká izolace nebo odstranění agroklavinu ze směsi klavino-
vých alkaloidů obsažených ve fermentač-
ních tekutinách, vodných roztocích nebo
biologických médiích. Separace se dosáhne
adsorpcí na modifikovaném silikagelu
při optimu pH. Postupem lze dosáhnout
vysoké specifiky separace a tím dokona-
lého odstranění agroklavinu.
Řešení může být využito ve farmaceutic-
kém průmyslu pro účely průmyslové a a-
nalytické.



Vynález se týká způsobu separace agroklavinu ze směsi námelových alkaloidů, obsažených ve fermentačních tekutinách, vodných roztocích, biologických tekutinách jako je krevní plasma atd.

Námelové alkaloidy jsou produkovány v saprofytních kulturách *Claviceps purpurea* a *Claviceps paspali*, *Aspergillus* sp., *Penicillium sizoia*, *Penicillium roqueforti*, atd. (M. Abe a kol., Jap. pat. 178 336, M. Abe. U. S. pat. 2 835 675, D. Gröger a V.E. Tylar Iv. Lhoydia 26, 174 (1963).

Klavínové alkaloidy tvoří surovinovou základnu pro výrobu nejrůznějších polosyntetických, terapeuticky využívaných derivátů. (Eich E., Pharmacia 30, 8, 1975, Tung-Chung Choong a H. R. Shough, Tetrahedron Lett. 19, 1627, 1977, J. Křepelka a kol. Coll. Czech. Chem. Comm 42 1412 (1977).

Způsob izolace peptidických námelových alkaloidů z fermentačních tekutin extrakcí, popřípadě sorpcí na bentonitu, aktivním uhlí řeší několik vynálezů, například EP 22 418, DD 146 - 620 a DT 2840 - 670. Způsob izolace a dělení agroklavinu a elymoklavinu popisuje čs. autorské osvědčení č. 199 986 (Řeháček Z. a kol., 1980) a autorské osvědčení č. 329 441 (Stuchlík a kol. 1984).

První čs. autorské osvědčení řeší izolaci alkaloidů extrakcí organickým rozpouštědlem a jejich separací sloupcovou chromatografií na silikagelu. Nevýhodou řešení je tvorba obtížně dělitelných emulzí při extrakci.

Druhé čs. autorské osvědčení řeší především provozní zpracování fermentačních tekutin a separaci agroklavinu od elymoklavinu extrakční metodou. Tímto postupem se dosahuje maximální čistoty alkaloidů okolo 95 %.

Předkládaný vynález řeší především separaci agroklavinu ze směsi ostatních polárnějších námelových alkaloidů, a to především ze směsí, ve kterých je agroklavin obsažen v maximální koncentraci 20 % z celkového obsahu alkaloidů. Pro separaci je využito specifické sorpce agroklavinu na modifikovaný silikagel - upravený navázáním nepolárního substituentu jako je alkanová skupina obsahující dva až osmáct uhlíků, fenylová skupina, s výhodou oktadecylová skupina. Specifická adsorpce, respektive hodnoty Freundlichovy a Langmuirovy isothermy jsou uvedeny v tabulce.

	Freundlichova izoterma		Langmuirova izoterma	
	K	N	K	KS
Elymoklavin	8.28635E-28	10.2111	-2.30202E-05	-218.114
Chano-aldehyd	3.1833E-31	10.5972	-3.85419E-05	-393.662
Agroklavin	4.06993E-04	.35359	3.16814E-03	47.3833
Chanoklavin	3.94185E-28	10.33333	4.2309E-05	-892.372
Alk. celkem	1.65763E-13	3.17546	-1.24211E-03	-2408.48

pH separací = 5,2

Jak vyplývá z tabulky 1, adsorpce agroklavinu mnohonásobně převyšuje adsorpci ostatních polárnějších alkaloidů. Optimum pro specifickou sorpci agroklavinu leží v oblasti pH 5 až 7. V oblasti vyššího pH (8 až 11) dochází k vyrovnání hodnot koeficientů jednotlivých alkaloidů adsorpce, a tím k potlačení specifity sorpce agroklavinu.

Popsaným postupem lze s výhodou odstraňovat nižší koncentrace agroklavinu z různých preparátů, zvláště elymoklavinu, s výhodou dočistění krystalických preparátů, pro účely analytické, popřípadě k izolaci agroklavinu z vysoce zředěných biologických materiálů, například při testování účinku agroklavinu a jeho derivátů.

Příklad

1 l přefiltrované fermentační tekutiny obsahující 2,1 g elymoklavinu, 0,15 g agrokla-

vinu a 0,05 g chanoklavinu byl upraven vodným roztokem amoniaku na pH 6,8. K tomuto roztoku bylo přidáno 2 x 35 g silikagelu s navázanou oktadecylovou skupinou o velikosti částic 50 um (Separon SGX C 18 Tessek Praha) a mícháno 15 min na magnetickém míchadle.

Směs byla zfiltrována, filtrační koláč promyt 100 ml destilované vody a odsát. Filtrační koláč byl extrahován 3 x 150 ml methanolu obsahujícího 5 % vodného amoniaku. Extrakty byly spojeny a zahuštěny na odparek.

Ve zbývající fermentační tekutině byly metodou vysoko účinné kapalinové chromatografie nalezeny tyto obsahy alkaloidů: Elymoklavin 2,05 g/l, chanoklavin 0,05 g/l, agroklavin stopy. HPLC analýza odparku: Odparek o celkové hmotnosti 0,30 g o celkovém obsahu alkaloidů 70 %, obsahoval 0,14 g agroklavinu, 0,05 g elymoklavinu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob separace agroklavinu ze směsi klavinových alkaloidů, obsažených ve fermentační tekutině, vodných roztocích, biologických tekutinách jako je krevní plasma, vyznačující se tím, že agroklavin se ze směsi alkaloidů selektivně adsorbuje na silikagel modifikovaný fenylovou skupinou, alkanovou skupinou obsahující 2 až 18 uhlíků, s výhodou oktadecylovou skupinou při pH 5 až 7 a uvolní ze sorbentu desorpceí.