
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CORRADO GALEFFI, SRECKO MATOSIC, ANTONIO
TONOLO

Gli alcaloidi della *Claviceps purpurea* (Fr) Tul (ceppo IC/39/20)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 56 (1974), n.6, p. 951–956.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_56_6_951_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Chimica. — *Gli alcaloidi della Claviceps purpurea (Fr) Tul (ceppo IC/39/20)* (*). Nota di CORRADO GALEFFI, SREČKO MATOŠIĆ (**) e ANTONIO TONOLO, presentata (***) dal Corrisp. G. B. MARINI BETTOLO.

SUMMARY. — From submerged cultures of a strain of *Claviceps purpurea* (Fr) (IC/39/20) are isolated nine alkaloids: four of clavine type (chanoclavine I, isochanoclavine I, elymoclavine and agroclavine) and five of ergot-peptide type (ergotamine, ergocornine, ergotaminine, ergocryptine and ergocryptinine). Their $k_r \cdot k_b$ values obtained by countercurrent separation are given. Their ORD curves and NMR and mass spectra are examined.

Alcaloidi ergolinici di tipo clavinico (I–IV) e lisergico-peptidico (V–IX) sono stati isolati da *Claviceps purpurea* [1–3], *C. paspali* [4] e *C. maritima* [5], da altri miceti (*Aspergillus* [6, 7], *Geotrichum*, *Rhizopus* e *Mucor* [8] e da varie piante (*Cuscuta* [9], *Ipomoea*, *Rivea* [10, 11], talune utilizzate per preparare la droga atzecca Ololuiqui.

La biogenesi di questi alcaloidi inizia da L-triptofano, ac. mevalonico ed il gruppo metilico della metionina e procede secondo la sequenza: chanoclavina I (I, fig. 1) → agroclavina (IV) → elimoclavina (III) → ammidi dell'acido lisergico (peptidici) (V–IX) [12–14].

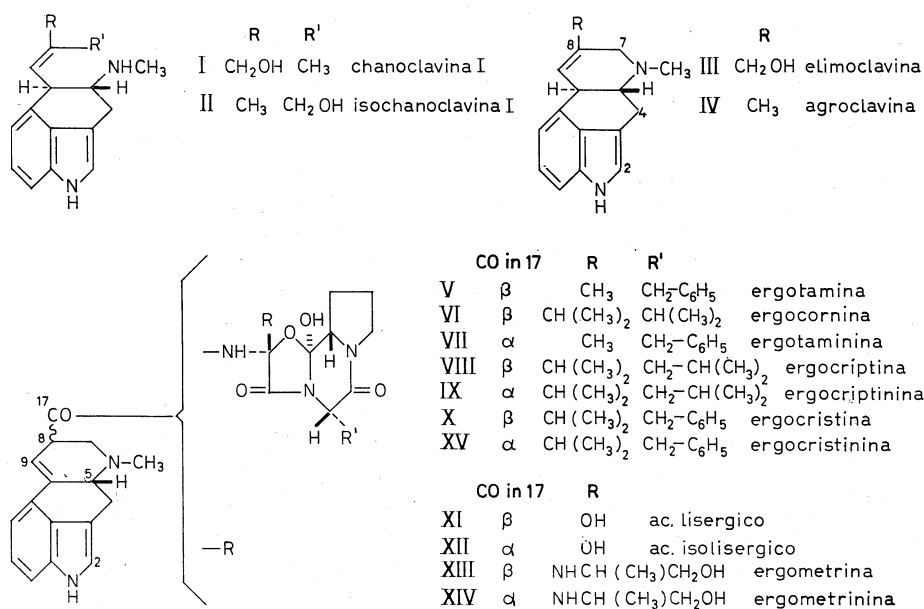


Fig. 1.

(*) Lavoro eseguito presso i Laboratori di Chimica Biologica dell'Istituto Superiore di Sanità. Roma.

(**) Borsista dell'Istituto Superiore di Sanità dell'Università di Zagabria. Jugoslavia.

(***) Nella seduta del 29 giugno 1974.

Data l'attività sul sistema nervoso centrale e periferico di questi *alcaloidi* (in particolare i peptidici e loro derivati) per incrementarne la produzione sono stati selezionati ceppi di *C. purpurea* [15, 16] e *C. paspali* [17] utilizzati in colture sommerse.

Nel presente lavoro è descritta la produzione di alcaloidi della segale cornuta in coltura sommersa con un ceppo di *C. purpurea* (IC/39/20) isolato da uno di noi [15]. Il terreno qui utilizzato è costituito da saccarosio (300 g), nitrato di calcio (1 g), L-asparagina (10 g), fosfato monopotassico (0,25 g), solfato di magnesio eptaidrato (0,25 g), cloruro di potassio (0,125 g), solfato ferroso eptaidrato (0,03 g), solfato di zinco eptaidrato (0,025 g), cisteina (0,01 g), estratto di lievito (0,1 g), acqua (1 litro), pH 5,2. L'andamento della fermentazione riportato in fig. 2 mostra dopo 10 giorni una produzione di alcaloidi di 1,1-1,3 mg/ml.

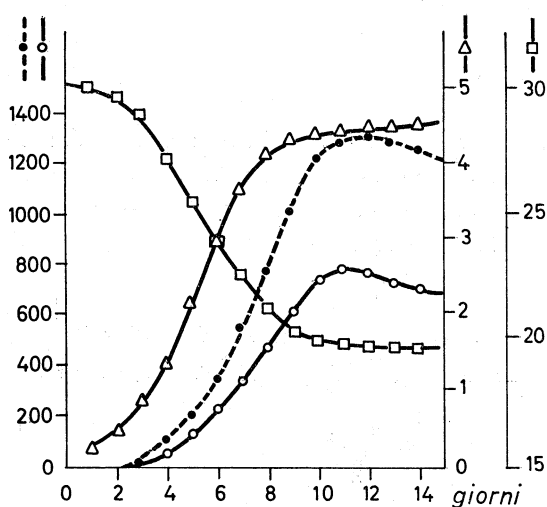


Fig. 2. - Fermentazione con il ceppo di *Claviceps purpurea* IC/39/20.

--●-- Alcaloidi totali (µg/ml),
—○— alcaloidi del brodo (µg/ml),
—△— peso secco (g/100 ml),
—□— saccarosio (g/100 ml).

Alcaloidi, calcolati come ergotamina, titolati secondo R. Voigt «Microchim. Acta», 619, 1959). Saccarosio determinato secondo A. Somogyi («J. Biol. Chem.», 16, 195, 1952). Peso secco determinato dopo centrifugazione ed essiccamento a 105°C. Preparazione inoculo: beute da 500 ml con 100 ml del terreno altrove indicato con solo il 10% di saccarosio, inoculo con una sola colonia di *C. purpurea* (sviluppata in capsula Petri a 24°C per 12 gg). Fermentazione: beute da 500 ml con 100 ml del terreno altrove indicato, con 10 ml di inoculo al 7° giorno, a 24°C con agitatore rotatorio 220 gir/min.

Per la separazione degli alcaloidi sono state finora utilizzate tutte le tecniche cromatografiche. Per la separazione analitica su strato sottile sono stati provati oltre cento eluenti [18] mentre per la cromatografia di ripartizione su carta sono stati utilizzati come fase stazionaria formammide [19] e ftalato di etile [20]. Su scala preparativa è stata utilizzata la cromatografia su carta tamponata [21] e la separazione su colonna di allumina [22], di cellulosa [23], di cellulosa [24] o celite [25] tamponata nonché la separazione con resine a scambio ionico [26, 27]. Con la distribuzione in controcorrente (d.c.c.) [28-30] secondo procedimenti talvolta brevettati ma non descritti [31, 32] è stata realizzata la separazione di alcuni alcaloidi quali elimoclavina(III) e la separazione della ergotamina(V) dalla ergotossina (miscela non risolta di ergocornina(VI), ergocriptina(VIII) ed ergocristina(X)).

Uno di noi [33] aveva mostrato che nella d.c.c. con un sistema bifasico due alcaloidi aventi il prodotto $k_r \cdot k_b$ (k_r costante di ripartizione tra acqua e fase organica, k_b costante di dissociazione della base) nel rapporto 10ⁿ : 1 hanno

uguale mobilità a due pH differenti di n . Dato che tra chanoclavina I(I) ed agroclavina(IV) (alcaloidi clavinici più polari dei peptidici) i prodotti $k_r \cdot k_b$ in cloroformio, n ·propanolo 2:1 ($v:v$)/acqua sono nel rapporto di circa $10^5:1$, la ripartizione in controcorrente degli alcaloidi della *C. purpurea* a pH discontinuamente decrescente, iniziata a pH neutro, non si può proseguire sotto il valore di 2 senza pregiudicare la stabilità degli alcaloidi peptidici ancora non separati. È stato quindi utilizzato il sistema di solventi anzidetto per gli alcaloidi clavinici ed uno differente (cloroformio, tetracloruro di carbonio 1:1/acqua) per gli alcaloidi peptidici ⁽¹⁾ già utilizzato [34] per la separazione della diidroergocornina, diidroergocristina e diidroergocriptina, miscela denominata diidroergotossina.

Dalla formula seguente [33] $\log \frac{r}{n-r} = -\text{pH} + \log \frac{k_r \cdot k_b}{k_w}$ che correla il numero di trasferimenti della fase mobile acquosa (n) ed il pH con la posizione del massimo della curva di distribuzione dei singoli alcaloidi (r), si sono ricavati i valori del prodotto $k_r \cdot k_b$ che sono indicati appresso in parentesi.

Col primo sistema solvente si sono separati nell'ordine i seguenti alcaloidi clavinici: a pH 7 la chanoclavina I (I; $9 \cdot 10^{-8}$), a pH 6 la isochanoclavina (II; $4,1 \cdot 10^{-8}$), a pH 5 la elimoclavina (III; $3,2 \cdot 10^{-9}$) ed a pH 3 la agroclavina (IV; $1,4 \cdot 10^{-12}$). Col secondo sistema bifasico sono stati separati nell'ordine gli alcaloidi peptidici seguenti: a pH 3 il più abbondante, la ergotamina (V; $7 \cdot 10^{-12}$) e con altri trasferimenti della fase mobile acquosa la ergocornina (VI; $3 \cdot 10^{-12}$), a pH 2,5 la ergotaminina (VII; $1,4 \cdot 10^{-12}$) ed infine a pH 2,2 la ergocriptina (VIII; $8,8 \cdot 10^{-13}$) e successivamente la ergocriptinina (IX; $7 \cdot 10^{-14}$).

Sono riportati appresso gli estremi dell'effetto Cotton in metanolo degli alcaloidi peptidici aventi tutti la configurazione assoluta 5 R; l'effetto a circa 316 nm (corrispondente alla banda di assorbimento u.v.) è positivo come per i 5 R-6-metil-9-ergoleni [35] quali l'ac. lisergico(XI). Come per l'isomeria ac. lisergico - ac. isolisergico(XII) la rotazione molecolare (Φ) è più elevata per gli alcaloidi della serie iso come si è osservato pure tra ergometrina (XIII; $\Phi_{336} + 9500$, $\Phi_{290} - 7100$) ed ergometrinina (XIV; $\Phi_{340} + 22200$, $\Phi_{290} - 2700$) e tra ergocristina (X; $\Phi_{340} + 12400$, $\Phi_{295} + 2000$) ed ergocristinina (XV; $\Phi_{342} + 29600$, $\Phi_{292} - 16500$). Negli alcaloidi 9-10 saturi (I-IV) invece la banda di dicroismo del vicino u.v. dovuta alla chiralità indotta dalle transizioni elettroniche dell'indolo ha un effetto Cotton negativo e di bassa intensità a circa 275 nm, ben osservabile solo nei tetraciclici elimoclavina(III) ed agroclavina(IV).

Gli spettri di massa degli alcaloidi peptidici ergocornina(VI) ed ergocriptina(VIII) come pure dell'ergocristina(X) non rinvenuta in questo ceppo

(1) È stato utilizzato un apparecchio di d.c.c. Craig mod. Post a 200 stadi, volume delle due fasi 10:10 ml.

Dalle singole frazioni unitarie gli alcaloidi sono riestratti con cloroformio a pH alcalino; nello stesso modo è stata recuperata la miscela di alcaloidi peptidici non separata col primo sistema bifasico.

di *C. purpurea*, presentano tutti il picco molecolare (rispettivamente m/e 561, 575 e 609), il picco a m/e 463 (eliminazione rispettivamente dei radicali della valina, leucina e fenilalanina) ed il picco a m/e 365 (eliminazione ulteriore della prolina); come picco base presentano tutti lo ione molecolare della lisergammide a m/e 267. Lo stesso picco è comune alla ergotamina(V) ed ergotaminina(VII) che altrettanto evidente presentano il complementare picco a m/e 314 (parte peptidica) ed inoltre il picco molecolare (m/e 581) e quello corrispondente alla eliminazione di fenilalanina e prolina a m/e 337.

Le clavine, in specie le tetracicliche, subiscono poca frammentazione: l'unico picco di una certa entità accanto a quello molecolare è a m/e 154 ($C_{11}H_8N^+$) dovuto alla parte naftoindolica [36].

Nell'elenco degli alcaloidi isolati, che segue, sono riportate anche le percentuali in peso nel ceppo in esame ed alcuni dati di risonanza magnetica nucleare (RMN) ⁽²⁾.

Chanoclavina I(I) ed isochanoclavina I(II) (8% ciascuna) sono state isolate precedentemente da un ceppo di *C. purpurea* [37]. Il primo estremo dell'effetto Cotton negativo non è osservabile; gli spettri di massa sono identici per i due isomeri: m/e 256 (100 %), 237 (62%), 183 (96 %) e 154 (53 %).

Elimoclavina (III, 4%) è stata già isolata dalla *C. purpurea* [2].

La curva di dispersione ottica rotatoria (DOR) in metanolo presenta il primo estremo a 297 nm ($\Phi - 3400$) ed il secondo a 252 nm ($\Phi + 4000$). Lo spettro RMN in deuteropiridina, come per l'agroclavina, è già stato riportato [38]. RMN dell'acetilderivato di (III) (composto amorfo, instabile): CH_3CO ppm, 2,07 (s), CH_3N 2,52 (s), CH_2OCOCH_3 4,63 (s), CH olefinico in δ 6,52 ppm (m), NH 8,6 (s).

Agroclavina (IV, 2%) isolata precedentemente da *C. purpurea* [2], *C. paspali* e *C. fusiformis* [39]. DOR: primo estremo a 300 nm, $\Phi - 3200$.

RMN in deuterocloroformio: CH_3C 1,80 ppm (s), CH_3N 2,50 (s), CH olefinico in δ 6,18 ppm (m), $CHNH$ 6,77 (d, 1 Hz), NH 8,42.

Ergotamina (V, 42%) già isolata da *C. purpurea* [1]. DOR: $\Phi_{340} + 13100$, $\Phi_{286} - 11700$.

RMN: CH_3C 1,54 (s), CH_3N 2,60 (s), $CHCO$ 4,68 (t, 6 Hz), $CHCOH$ 6,32 (q, 2 e 6 Hz), $CHNH$ 6,88 (d, 1 Hz), $NHCH$ 8,23, $NHCO$ 8,97 (s).

Ergocornina (VI, 10%) già isolata da *C. purpurea* [1] insieme ad ergocriptina ed ergocristina, DOR: $\Phi_{341} + 12300$, $\Phi_{284} - 14200$.

Ergotaminina (VII, 10%), DOR: $\Phi_{340} + 27000$, $\Phi_{290} - 13800$.

Ergocriptina (VIII, 10%) isolata oltre che dalla *C. purpurea* anche dalla *C. maritima* [5]. DOR: $\Phi_{341} + 11000$, $\Phi_{282} - 13400$.

RMN: 4 CH_3 0,93, 1,02, 1,04 e 1,06 (d, 7 Hz), CH_3N 2,62 (s), $CHCO$ 4,51 (t, 6 Hz), $CHCOH$ 6,37 (q, 2 e 6 Hz), $CHNH$ 6,92, CH olefinico in δ 7,40 (d, 1,5 Hz), $NHCH$ 8,32, $NHCO$ 9,73 (s).

(2) Apparecchio Varian HA 100; solv. deuterocloroformio, rif. interno tetrametilsilano, spostamenti chimici in δ (ppm).

Ergocriptinina (IX, 6%), DOR: $\Phi_{342} + 28000$, $\Phi_{282} - 15600$.

RMN: 4 CH₃ 0,92, 0,95, 0,96 e 1,15 (*d*, 7 Hz), CH₃N 2,60 (*s*), CHCO 4,40 (*t*, 6 Hz), CHCOH 6,54 (*q*, 2 e 6 Hz), CHNH 6,88, NHCH 8,24, NHCO 9,94 (*s*).

CONCLUSIONI

Con un particolare ceppo di *C. purpurea* (IC/39/20) in cultura sommersa si è realizzata una notevole produzione di alcaloidi ergolinici (1,1–1,3 mg/ml) tra i quali prevale l'ergotamina. Gli alcaloidi sono stati separati in controcorrente con due diversi sistemi bifasici e con fase mobile acquosa a pH discontinuamente decrescente: sono stati così determinati i valori del prodotto $k_r \cdot k_b$ per i singoli composti identificati come chanoclavina I(I), isochanoclavina I(II), elimoclavina(III), agroclavina(IV), ergotamina(V), ergocornina(VI), ergotaminina(VII), ergocriptina(VIII) ed ergocriptinina(IX). È esaminata la loro frammentazione allo spettrometro di massa e sono riportati alcuni dati RMN e gli estremi dell'effetto Cotton, positivo per i 5 R-9-ergoleni (a 316 nm), negativo per i 5 R-8-ergoleni (a 275 nm).

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. STOLL, A. HOFMANN e T. PETRZILKA (1951) - «Helv. Chim. Acta», 34, 1544.
- [2] M. ABE, T. YAMANO, Y. KOZU e M. KUSUMOTO (1952) - «J. Agr. Chem. Soc. Japan», 25, 458.
- [3] M. ABE (1954) - «J. Agr. Chem. Soc. Japan», 28, 44.
- [4] F. ARCAMONE, C. BONINO, E. B. CHAIN, A. FERRETTI, P. PENNELLA, A. TONOLO e L. VERO (1960) - «Nature», 187, 238.
- [5] R. J. SAMUELSON e G. GJERSTAD (1966) - «Medd. Norsk Farm. Selskap», 28, 228.
- [6] L. A. R. SALLAM e A. E. EL-REFAI (1971) - «Z. Allg. Mikrobiol.», 11, 147.
- [7] T. YAMANO, K. KISHINO, S. YAMATODANI e M. ABE (1962) - «Takeda Kenkyusko Nempo», 21, 83.
- [8] A. E. EL-REFAI, L. A. R. SALLAM e N. NAIM (1970) - «Jap. J. Microbiol.», 14, 91.
- [9] R. IKAN, E. RAPOPORT e E. D. BERGMANN (1968) - «Israel J. Chem.», 6, 65.
- [10] D. STAUFFACHER, H. TSCHERTER e A. HOFMANN (1965) - «Helv. Chim. Acta», 48, 1379.
- [11] K. GENEST, W. B. RICE e C. G. FARMILLO (1965) - «Proc. Can. Soc. Forensic Sci.», 4, 167.
- [12] S. AGURELL e M. JOHANSSON (1964) - «Acta Chem. Scand.», 18, 2285.
- [13] H. G. FLOSS, U. HORNEMANN, N. SCHILLING, K. KELLEY, D. GROEGER e D. ERGE (1968) - «J. Am. Chem. Soc.», 90, 6500.
- [14] M. ABE, T. OHASHI, S. OHMOMO e T. TABUCHI (1971) - «Nippon Nogei-Kagaku Kaishi», 45, 6.
- [15] A. TONOLO (1966) - «Nature», 209, 1134.
- [16] A. M. AMICI, A. MINGHETTI, T. SCOTTI, C. SPALLA e L. TOGNOLI (1969) - «Appl. Microbiol.», 18, 464.
- [17] F. ARCAMONE, E. B. CHAIN, A. FERRETTI, A. MINGHETTI, P. PENNELLA, A. TONOLO e L. VERO (1961) - «Proc. Roy. Soc. (London)», Ser. B, 155, 26.
- [18] J. L. LAUGHLIN, J. E. GOYAN e A. G. PAUL (1964) - «J. Pharm. Sci.», 53, 306.
- [19] M. PÖHM (1958) - «Arch. Pharm.», 291, 468.
- [20] A. STOLL e A. RÜEGGER (1954) - «Helv. Chim. Acta», 37, 1725.

- [21] M. ABE, T. YAMANO, Y. KOZU e M. KUSUMOTO (1955) – «Nippon Nogei-Kagaku Kai-shi», 29, 364.
- [22] *Lek Tovarna Farmaceutskih* in Kemicnik Izdelkov, *Fr* 2.089.081, 11 Feb. 1972.
- [23] R. VOIGT e A. KAEHLER (1962) – «Pharm. Zentralhalle», 101, 95.
- [24] J. E. CARLESS (1953) – «J. Pharm. and Pharmacol.», 5, 883.
- [25] PIN LIANG e TONH-HUI CHOU (1960) – «Yao Hsueh Hsueh Pao», 8, 181.
- [26] A. M. TOUBIO (1959) – «Farmacognosia (Madrid)», 19, 257.
- [27] T. ZAWISZA e L. KUCZYŃSKI (1960) – «Acta Polon. Pharm.», 17, 117.
- [28] H. HELLBERG (1953) – «Farm. Revy», 52, 535.
- [29] M. SEMONSKY e M. BERAN – *Czech* 113.109, 15 Gen. 1965.
- [30] C. LORINCZ (1966) – «Herba Hung.», 5, 211.
- [31] M. ABE – *Japan* 3496, 22 Lug. 1953.
- [32] *Takeda Pharmaceutical Industries* – *Brit.* 757.696, 26 Set. 1956.
- [33] C. GALEFFI (1974) – «J. Chromatog.», 92, 1.
- [34] C. GALEFFI e E. MIRANDA DELLE MONACHE (1974) – «J. Chromatog.», 88, 413.
- [35] K. BLÁHA (1972) – «Collect. Czech. Chem. Commun.», 37, 2473.
- [36] M. BARBER, J. A. WEISBACH, B. DOUGLAS e G. O. DUDEK (1965) – «Chem. Ind. (London)», 1072.
- [37] D. STAUFFACHER e H. TSCHERTER (1964) – «Helv. Chim. Acta», 47, 2186.
- [38] R. G. MRTEK, H. L. CRESPI, N. GAIL, M. I. BLAKE e J. J. KATZ (1968) – «Phytochemistry», 7, 1535.
- [39] S. G. KING, P. G. MANTLE, C. A. SZCZYRBK e E. S. WAIGHT (1973) – «Tetrahedron Letters», 3, 215.