

CHROM. 9027

LYSERGSÄURE

II.* ISOLATION UND TRENNUNG DER LYSERGSÄUREN

RUDOLF RUČMAN

LEK, Forschungsabteilung, Celovška 135, 61001 Ljubljana (Jugoslawien)

(Eingegangen am 25. November 1975)

SUMMARY

Lysergic acids. II. Isolation and separation of lysergic acids

During studies on the isolation of both lysergic acids, D- and D-iso-, from hydrolytic mixtures of ergot alkaloids, it became necessary to find a simple chromatographic system for column isolation of lysergic acids. The column with controlled pore glass is highly effective for these purposes. The separation of both isomeric lysergic acids occurs on the column with silica gel. The assay and the composition of lysergic acid are estimated by thin-layer chromatography on precoated plates.

EINLEITUNG

Die natürliche D-Lysergsäure** ist das Grundgerüst aller Mutterkornalkaloide und lässt sich aus diesen Alkaloiden mit energischer alkalischer Hydrolyse gewinnen. Die Säure ist in letzter Zeit auch auf biochemischem Wege zugänglich geworden. Ein leicht zugänglicher und billiger Rohstoff zur Herstellung der Lysergsäure sind die alkaloidhaltigen Abfälle, die bei der industriellen Verarbeitung des Mutterkorns verbleiben. Sie enthalten nebst Ballaststoffen noch immer 40-70% Alkaloide, davon ein Teil noch in rechtsdrehender Form. Die Abfälle enthalten Ergosin, Ergotamin, Alkaloide der Ergotoxin-Gruppe, wenig Lysergsäure und wasserlösliche Alkaloide. Die Zusammensetzung der Abfälle ist jedenfalls von der Mutterkornrasse und von der Verarbeitungsmethode abhängig.

Aus der Literatur sind mehrere Verfahren bekannt²⁻⁴, nach denen im allgemeinen mehr oder weniger reine Alkaloide mit alkoholischer Alkalilauge hydrolysiert werden; die resultierende Lösung wird mit einer Säure angesäuert, damit man die Lysergsäure in kristalliner Form erhält.

Nach einem anderen Verfahren⁵ wird die Lysergsäure aus dem Hydrolysen-gemisch zuerst mit einem Diäthyläther-Äthanol-Gemisch extrahiert, der Extrakt

* I. Mitteilung: Lit. 1.

** Prefix D wird meistens ausgelassen, mit "Lysergsäure" wird die natürliche D-Lysergsäure bezeichnet.

wird angesäuert und die Lysergsäure an den Kationenaustauscher gebunden. Daraus wird die Lysergsäure mit wässrigem Ammoniak eluiert und mit Säure kristallin gefällt. Die Ausbeute ist zwar gut, das ganze Verfahren ist jedoch ziemlich langwierig und anspruchsvoll. Ausserdem sind grössere Mengen an Diäthyläther nötig.

Diese Art der Isolation lässt sich in unserem Fall nur sehr schwer ausführen, weil die Ausgangsalkaloide ein wenig reines, stark gefärbtes und komplexes Gemisch darstellen.

In der bevorstehenden Arbeit wird die hydrolytische Spaltung der Mutterkornalkaloide zweckmässig so durchgeführt, dass das eingeeengte und gekühlte Hydrolysen-gemisch zwei Phasen bildet: das Harz und die Lösung. Die Lösung enthält praktisch keine Lysergsäure und wird verworfen. Das braune Harz ist das rohe Kaliumsalz der Lysergsäure. Die Versuche, dieses Harz nach Ansäuern zur Kristallisation zu bringen, scheiterten. Deshalb ist es notwendig, diese rohe Lysergsäure säulenchromato-graphisch zu reinigen und möglichst in Komponenten zu zerlegen. Die Lysergsäure ist eine ziemlich polare Substanz und in hydroxylhaltigen Lösungsmitteln besonders bei erhöhter Temperatur zur Epimerisation geneigt. Es muss also ein für die Chromatographie geeignetes System bzw. Bedingungen gefunden werden, in dem auch die Epimerisation möglichst gehemmt wird.

EXPERIMENTELLES

Chemikalien und Geräte

Die alkaloidhaltigen Abfälle stammen von der industriellen Verarbeitung des Mutterkorns und haben eine typische Zusammensetzung: Gesamtgehalt der Alkaloide, 44.7%; Zusammensetzung: wasserlösliche Alkaloide, 0.8%; Ergotamin, 0.5%; Ergosin, 21.0%; Ergocornin, 20.8%; Ergokriptin, 12.7%; rechtsdrehende Alkaloide 44.2% (insgesamt 100%).

Sephadex Gel G-10, G-15, G-25 und LH-20 sind von Pharmacia (Uppsala, Schweden), ebenso die für die chromatographischen Arbeiten verwendeten Säulen. Controlled Pore Glass, CPG-10-75, Pore Diameter 69 Å, 200-400 mesh, ist ein Produkt der Firma Electro Nucleonics (Fairfield, N.J., U.S.A.), bezogen durch Serva (Heidelberg, B.R.D.). Kieselgele 40, 60 und 100 sind Produkte der Firma E. Merck (Darmstadt, B.R.D.). Aluminiumoxid W-200, basisch und neutral, stammt von der Firma ICN Pharmaceuticals (Eschwege, B.R.D.). Die Eluierungsdiagramme wurden bei 254 nm mit einem Uvicord III Absorptiometer (LKB, Stockholm, Schweden) aufgenommen. Zur Auswertung der Dünnschichtchromatogramme wurde ein T-Scanner der Firma Camag (Muttens, Schweiz) benutzt.

Säulenfüllung

Da die Trennschärfe und der Durchfluss einer Säulenfüllung beträchtlich von der richtigen Vorbereitung des Gels abhängig sind, wird das Gel zunächst in ein ungefähr zehnfaches Volumen des jeweiligen Trennmediums eingerührt und vier Stunden stehengelassen. Danach wird diese Suspension ins Chromatographierohr eingegossen und über Nacht sedimentiert.

Methode

Die Hydrolyse des Alkaloidgemisches verläuft nach unserem Verfahren⁶ mit

hochkonzentrierter Kalilauge 8 mol/l, unter inertem Schutzgas (Stickstoff) bei 100°. Die Reaktion ist praktisch in 30–60 min beendet, nur bei wasserlöslichen Alkaloiden (z.B. Ergometrin) und bei 9,10-Dihydroalkaloiden dauert sie ungefähr zwei Stunden. Aus der danach im Vakuum zur Hälfte eingengten und auf 0° gekühlten Lösung scheidet sich die rohe Lysergsäure als Kaliumsalz in der Form eines Harzes aus und lässt sich von der Mutterlauge schnell und einfach abtrennen.

Es wurden Versuche gemacht, das rohe Kaliumsalz der Lysergsäure durch Säulenchromatographie so weit zu reinigen, dass die reine Lysergsäure aus dem Eluat nach Ansäuern auskristallisiert. Verschiedene Adsorbentien und Gele wurden einem Eignungstest unterzogen.

Analytik

Der Gehalt an beiden Lysergsäuren, sowie das Verhältnis der Lysergsäure zur Isolysergsäure wird am besten durch Dünnschichtchromatographie und Fluorimetrie ermittelt. Eine sehr gute Trennung der beiden Säuren erfolgt mit Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Art. Nr. 5721 oder 5715), Schichtdicke 0.25 mm, 20 × 20 cm.

Die Anwendung der Fertigplatten ist jedenfalls vorteilhaft, da bekannte papierchromatographische Methoden aufwendig und nicht immer gut reproduzierbar sind^{13–15}.

Die Proben werden in 2%igem Ammoniak in Methanol gelöst. Die Konzentration der Lösungen wird auf 10 µg pro 10 µl eingestellt. Die so erhaltenen Lösungen der Probe und des Standards werden mit einer Hamilton 25-µl Spritze auf eine aktivierte Fertigplatte punktförmig 2 µl pro Laufbahn aufgetragen. Aktivierung der Platte, 1 Stunde bei 105°. Laufmittel, abs. Äthanol–Wasser (80:20, v/v), mit Kammer sättigung. Es wird am besten im Kühlschrank bei 0–5° und vor Licht geschützt entwickelt. Die entwickelte Platte wird 15 min im Dunkeln an der Luft getrocknet.

Die Auswertung der entwickelten Platten erfolgt mit dem T-Scanner. Die Aufzeichnung der Kurven wird mit einem Speedomax-Kompensation-Linien-Schreiber XL-682 (Leeds & Northrup, Düsseldorf, B.R.D.) vorgenommen.

Messbedingungen: Anregungswellenlänge, 360 nm; Aufnahme des emittierten Lichtes, 440 nm; Spaltbreite, 1 cm; Tischvorschub, 2 cm/min; Vorschub des Schreibers, 2 cm/min; Verstärkung, × 30.

RESULTATE UND DISKUSSION

Sowohl mit Aluminiumoxid, neutral oder basisch, als auch mit Kieselgel 40, 60 und 100 lassen sich mit niederen Alkoholen als Eluierungsmittel keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreichen. Entweder ist der Trenneffekt zu gering, oder die Lysergsäure haftet hartnäckig am Start.

Da die Versuche mit dem Kieselgel und Aluminiumoxid scheiterten und sich die einzelnen Komponenten im zu trennenden Gemisch im Molgewicht vermutlich genug unterscheiden, wird es naheliegenderweise mit Gelfiltration versucht. Zur Verfügung stehen uns die Sephadex Gele G-10, G-15, G-25 and LH-20. Einige davon, G-10 und G-25, werden nach bekanntem Verfahren⁷ mit Dimethylsulfat–Natriumhydroxid methyliert (Tabelle I). Mit der Einführung mehrerer Methylgruppen werden bessere Quelleneigenschaften in nichtwässrigen Lösungsmitteln erreicht, was die Trennvorgänge mit organischer Elutionsmitteln ermöglicht.

TABELLE I

QUELLUNGSEIGENSCHAFTEN VON NORMALEM UND METHYLIERTEN SEPHADEX IN VERSCHIEDENEN LÖSUNGSMITTELN (GELVOLUMINA NACH 24 STUNDEN IN ml/g TROCKENES SEPHADEX)

Sephadex	Wasser	Äthanol	Tetrahydrofuran	Chloroform	Benzol
G-10	1.98	1.78	1.78	1.65	1.55
G-10 Me*	2.35	2.20	2.40	2.55	2.22
G-15	3.25	1.85	1.25	1.25	1.20
G-25	4.55	1.15	1.20	1.10	1.25
G-25 Me*	4.55	2.60	3.35	4.25	2.80
LH-20	4.33	4.03	3.58	4.15	2.15

* Sephadex Gel nach dem Verfahren aus Lit. 7 methyliert.

Sephadex G-25, unmethyliert und LH-20, erwiesen sich für die Reinigung der rohen Lysergsäure erwartungsgemäss als ungeeignet (Fig. 2 und 3). Einen brauchbaren Trenneffekt zeigt erst Sephadex G-15 (Fig. 1).

Eine bessere Auftrennung der Komponenten erfolgte mit Sephadex Gel G-10 und Wasser als Eluent (Fig. 4). Die letzte, im ultravioletten Licht bei 366 nm stark blau fluoreszierende Zone enthält reine Lysergsäure. Beim Ansäuern des Eluats mit Eisessig oder besser mit einer gesättigten Lösung von Natriumbisulfit in Wasser bis pH 5 kristallisiert die reine Lysergsäure aus. Am Start der Säule verbleibt eine gefärbte Verschmutzung, die sich mit Wasser im Gegenstrom über Nacht auswaschen lässt. Beim Umkehren der Durchflussrichtung wird die Säulenpackung aufgelockert, damit ist die Säule wieder bereit für den nächsten Reinigungsvorgang. Das gesamte Verfahren kann mehrmals wiederholt werden. Um diese Regeneration zu erleichtern, ist es notwendig die Säule stets im Dunkeln zu bewahren. Es ist zu erwähnen, dass bei der Belichtung der Säule während des Arbeitsganges dunkelgraue Belichtungsprodukte entstehen, die stark am Sephadex haften bleiben und sich nicht entfernen lassen.

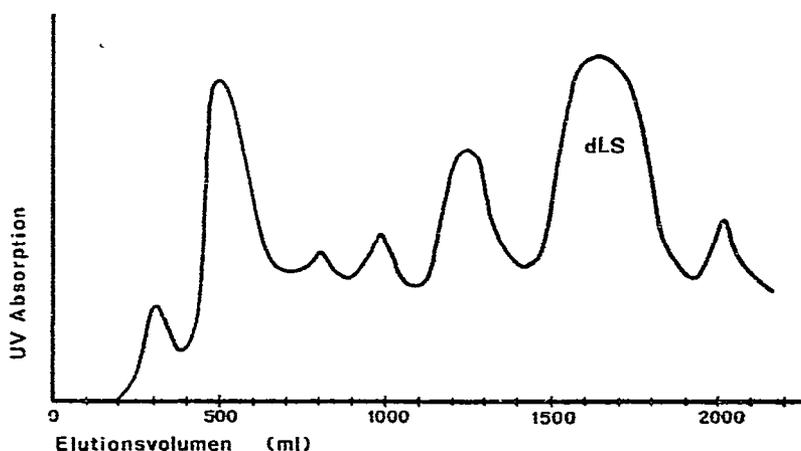


Fig. 1. Trennung der rohen Lysergsäure an Sephadex G-15. Das Chromatographierohr hat eine Länge von 500 mm und einen Innendurchmesser von 50 mm; es ist mit 330 g Gel G-15 gefüllt. Das Elutionsmittel ist Wasser von pH 7. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 400 ml/h. Die vorletzte, im ultravioletten Licht bei 366 nm intensiv blau fluoreszierende Zone enthält die Lysergsäure (dLS).

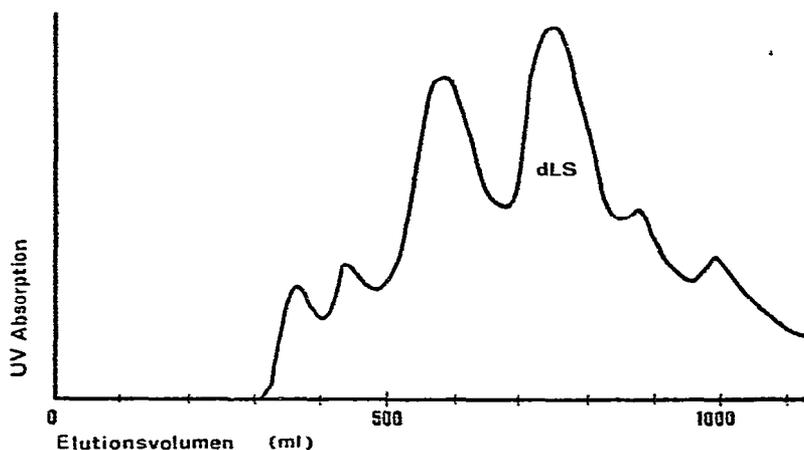


Fig. 2. Trennung der rohen Lysergsäure. Säule, 180×22 mm mit 20 g Sephadex LH-20. Elutionsmittel, Äthanol-Ammoniaklösung (25%) (95:5). Die Auftragsmenge ist 0.2 g. Die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 90 ml/h.

Vorzügliche Trenneffekte ergeben die mit porösem Glaspulver gefüllten Säulen. Mit CPG-10-75, und Wasser als Elutionsmittel, wird eine so gute Trennung erreicht, dass die reine Lysergsäure inmitten der Säule auskristallisiert und die Säule verstopft. Deshalb ist es notwendig, eine 0,1%ige Lösung von Ammoniak in Wasser als Eluent zu verwenden. Ein Beispiel der Trennung zeigt Fig. 5.

Die gesamten Ballaststoffe lassen sich von der Lysergsäure schnell und leicht abtrennen. Nachdem die Lysergsäure als letzte Zone eluiert ist, ist die Säulenpackung schon wieder farblos, damit automatisch regeneriert und für den nächsten Vorgang bereit. Nach mehreren Vorgängen verfärbt sich das Glaspulver leicht braun. In diesem Fall wird das Glaspulver mit konzentrierter, heisser Salpetersäure digeriert, mit Wasser gründlich gespült und damit vollständig regeneriert. Das poröse Glaspulver als

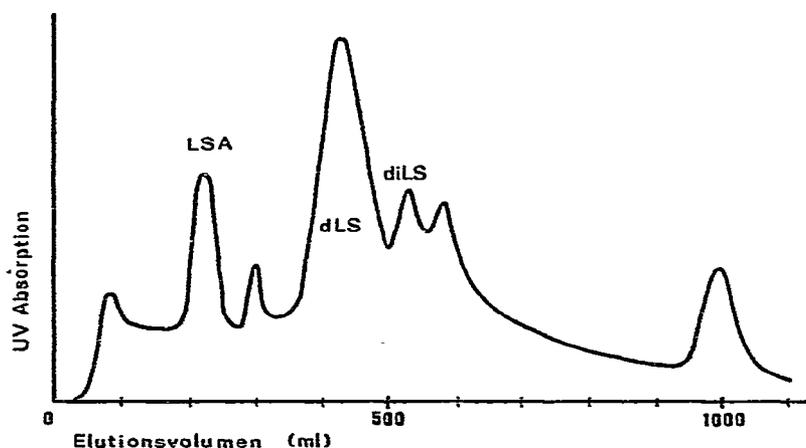


Fig. 3. Elutionsdiagramm der Lysergsäure bei Trennung mit Sephadex G-25, methyliert. Säule, 180×22 mm. Elutionsmittel, Chloroform-Methanol (85:15). Die Auftragsmenge ist 0.25 g, die Durchflussgeschwindigkeit 80 ml/h. Lysergsäure = dLS, Isolysergsäure = diLS, Lysergsäureamid = LSA.

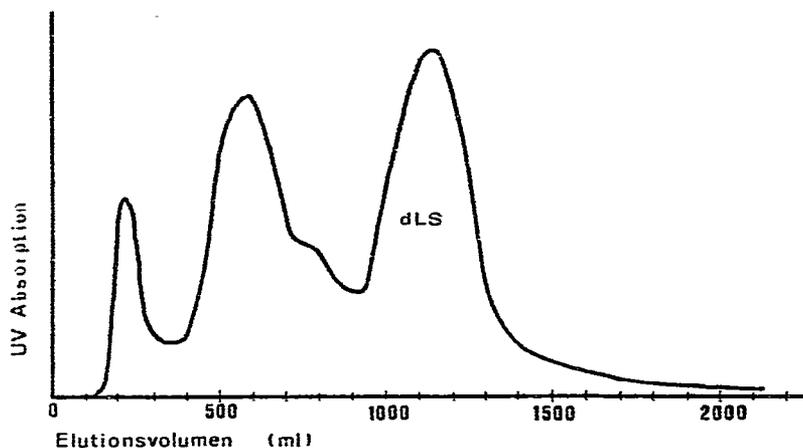


Fig. 4. Elutionsdiagramm der rohen Lysergsäure bei Trennung mit Sephadex G-10. Säule, 600×50 mm; Füllung, 350 g Sephadex G-10. Elutionsmittel, Wasser; Durchflussgeschwindigkeit, 400 ml/h. Der letzte Peak stellt die Lysergsäure dar, die anderen Peaks entsprechen den nicht näher untersuchten Zersetzungsprodukten der Hydrolyse.

Säulenfüllung ermöglicht hohe Eluierungsgeschwindigkeiten von 50 bis 100 ml/cm² h.

Die nach diesem Verfahren gereinigte Lysergsäure ist weisses, kristallines Pulver mit spezifischem Drehung α_D^{20} in Grenzen von $+20^\circ$ bis $+50^\circ$ ($C = 0.4$ in Pyridin) und schmilzt bei $235\text{--}237^\circ$ (unter Zersetzung). Der Drehwert der reinen Lysergsäure ist $+10^\circ$ und der reinen Isolysergsäure $+281^\circ$ ($C = 0.4$ in Pyridin)⁸. Das weist daraufhin dass unser Produkt ein Gemisch aus vorwiegend Lysergsäure und etwas Isolysergsäure sein muss.

Dies bestätigt auch die dünnschichtchromatographische Untersuchung. Durchschnittlich besteht die aus Abfallalkaloiden gewonnene Lysergsäure aus 3–15% an iso-Lysergsäure. Die aus der Kristallisationsmutterlauge gewonnene Lysergsäure enthält jedoch 20–40% iso-Lysergsäure. Das ist nicht erstaunlich, da der Ausgangs-

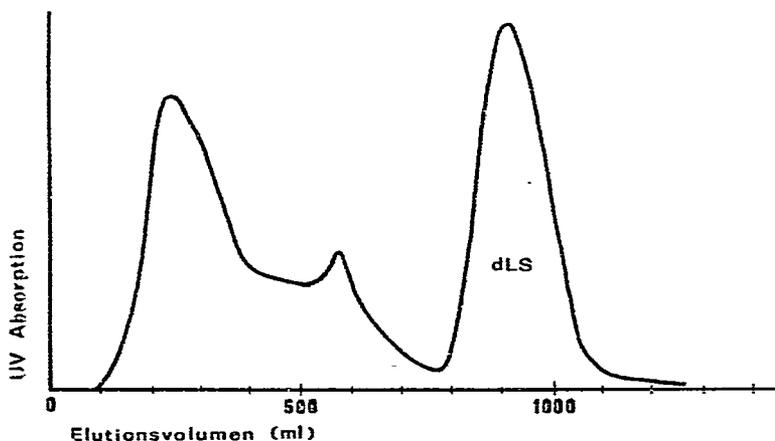


Fig. 5. Trennung des Hydrolysenproduktes an Controlled Pore Glass (CPG-10-75), 200–400 mesh, Porenweite 69 Å. Säule, 250×22 mm. Eluent ist 0.1% NH_4OH in Wasser. Die Auftragsmenge beträgt 1 g, die Durchflussgeschwindigkeit 200 ml/h.

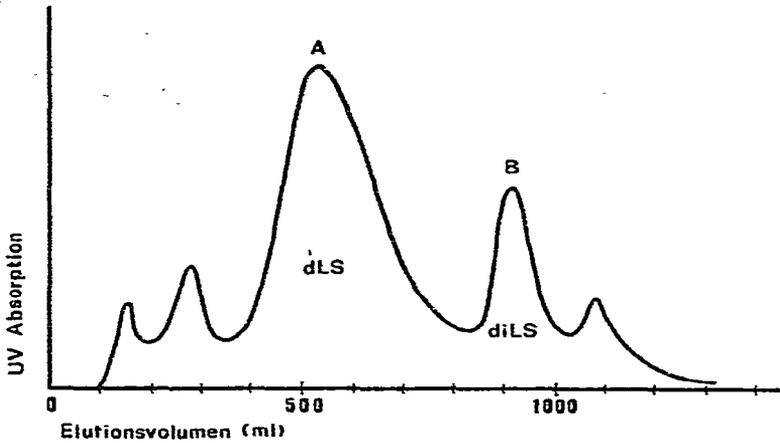


Fig. 6. Trennung der Lysergsäure (dLS) von Isolysergsäure (diLS). Säule, 720 × 50 mm. Adsorbens, Kieselgel 60, Korngrösse 0.04–0.063 mm. Das Elutionsmittel ist abs. Äthanol. Das Verhältnis Gel-Lysergsäure ist 100:1, die Durchflusgeschwindigkeit beträgt 80 ml/h.

stoff links- un rechtsdrehende Alkaloide enthält. Bei der Hydrolyse entsteht jedoch mehr Lysergsäure als dem Gehalt an linksdrehenden Alkaloiden entsprechen würde. Dieses Phänomen wird mit der Epimerisation der entstandenen iso-Lysergsäure zu der Lysergsäure noch im Laufe der Hydrolyse erklärt. Die Voraussetzung für solche Epimerisation —stark alkalisches Medium und hydroxylhaltiges Lösungsmittel— ist bereits erfüllt^{9,10}.

Die Anwesenheit der iso-Lysergsäure in Lysergsäure stört im allgemeinen nicht viel und kann auch das Gemisch beider Säuren für die Synthese gut verwendet werden. Erstens reagieren beide Säuren gleich, z.B. bei der Peptid Synthese, ausserdem lassen sich die Lysergsäureamide viel besser trennen als die Säuren selbst¹¹.

Es ist zwar möglich, das Gemisch der Lysergsäure und iso-Lysergsäure als Ammoniumsalz an einer Säule mit feingekörntem Kieselgel 60 und mit Äthanol oder

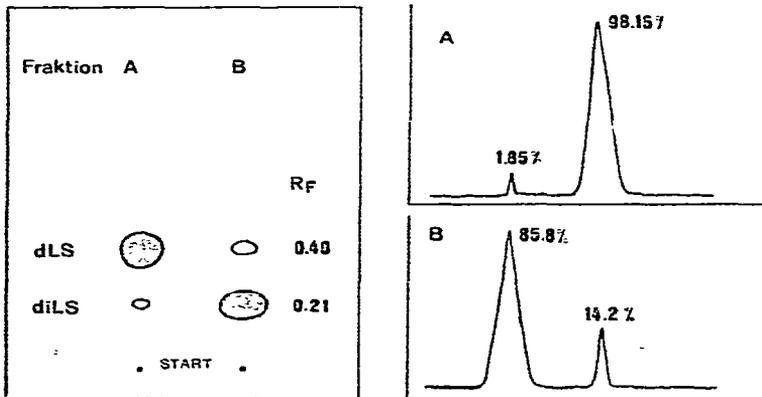


Fig. 7. Links: Dünnschichtchromatogramm der Lysergsäure (A) und iso-Lysergsäure (B) auf der Merck Fertigplatte. Auftragsmenge: 20 µg. Laufmittel, Äthanol-Wasser (80/20, v/v). Detektion, UV Licht bei 366 nm. dLS = Lysergsäure, diLS = Isolysergsäure. Rechts: Die fluorimetrische Auswertung der Flecken A und B mit T-Scanner.

Propanol (*n*- oder iso-) als Eluent in Komponenten zu zerlegen (Fig. 6). Dies geschieht vorteilhaft bei 0–5°, um Epimerisation zu unterdrücken¹².

Die Zusammensetzung der Fraktionen A und B, die Lysergsäure und iso-Lysergsäure enthalten sollten, wird dünnschichtchromatographisch und fluorimetrisch bestimmt. Fraktion A ist sehr reine Lysergsäure, die nur 1,85% iso-Lysergsäure enthält, Fraktion B ist iso-Lysergsäure, verunreinigt mit 14,2% Lysergsäure.

SCHLUSSBEMERKUNG

Die chromatographische Trennung der Lysergsäure aus dem rohen Hydrolysenmisch an einer Säule mit porösem Glaspulver CPG-10-75 erwies sich als weitaus beste. Es sind hohe Eluierungsgeschwindigkeiten möglich, was den Vorgang wesentlich verkürzt. Dem hohen Preis des Glaspulvers steht eine recht leichte und fast unbegrenzte Regenerierbarkeit gegenüber. Man erhält Lysergsäure in hoher Ausbeute.

DANK

Diese Arbeit wurde von "Republiška raziskovalna skupnost Slovenije", Ljubljana, Jugoslawien, unterstützt. Der Autor dankt Fräulein L. Kožuh und Herrn S. Jankovič für die geschickte experimentelle Ausführung.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei Untersuchungen der Isolation beider Lysergsäuren, D- und D-iso-, aus den Hydrolysenmischungen der Mutterkornalkaloide zeigte sich der Bedarf ein einfaches Chromatographiesystem für Säulenisolation der Lysergsäuren zu finden. Die Säule mit porösem Glaspulver erwies sich für diese Zwecke als die beste. Die Trennung beider isomeren Lysergsäuren erfolgt an der Säule mit Kieselgel. Der Gehalt und die Zusammensetzung der Lysergsäure werden dünnschichtchromatographisch an Fertigplatten bestimmt.

LITERATUR

- 1 B. Pelan, R. Ručman und M. Milohnoja, *Hemija u Industriji*, 24 (1975) 382.
- 2 W. A. Jacobs und L. C. Craig, *J. Biol. Chem.*, 104 (1934) 547.
- 3 A. Stoll und A. Hofmann, *Z. Physiol. Chem.*, 250 (1937) 7.
- 4 A. Stoll, A. Hofmann und B. Becker, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 1602.
- 5 M. Semonský, V. Zikán und M. Berán, *ČSSR Pat.* 123689, 15.7.1967.
- 6 R. Ručman, *Jug. Pat.* P-654/75, 17.3.1975.
- 7 E. Nyström und J. Sjövall, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 235.
- 8 A. Hofmann, *Mutterkornalkaloide*, Ferdinand Enke, Stuttgart, 1964, S. 35–37.
- 9 M. Semonský und A. Černý, *ČSSR Pat.* 123690, 15.7.1967.
- 10 A. Stoll und A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta*, 26 (1943) 944.
- 11 P. Stadler und P. Stütz, *CH Pat.* 543,683, April 1973.
- 12 R. Ručman, *Jug. Pat.* P-653/75, März 1975.
- 13 K. Macek, M. Semonský, S. Vaneček, V. Zikán und A. Černý, *Pharmazie*, 9 (1954) 752.
- 14 A. L. Kapoor, H. Schumacher und J. Büchi, *Pharm. Acta Helv.*, 32 (1957) 411.
- 15 R. C. Weast (Editor), *Handbook of Chromatography*, Vol. I., CRC Press, Cleveland, Ohio, 1972, S. 397.