

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

79 425

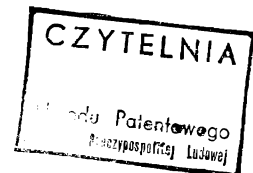
Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 07.12.1971 (P. 151 999)

Pierwszeństwo: 09.12.1970 Austria

Zgłoszenie ogłoszono: 25.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1976



MKP A61k 27/14

Int. Cl.² A61K 35/78

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Laevosan — Gesellschaft m.b.H. und
Co. KG., Linz (Austria)

Środek do badania czynności nerek i sposób wytwarzania środka do badania czynności nerek

Przedmiotem wynalazku jest środek do badania czynności nerek, na podstawie polifruktozanów oraz sposób jego wytwarzania.

Nowy środek podawany pozajelitowo nie ulega w organizmie ani rozkładowi, ani zmianom i zostaje ponownie wydzielony przez nerki. Na podstawie szybkości wydzielania oraz wydzielonej ilości środka można wnioskować o czynności nerek.

Już przed około 35 laty wykorzystywano inulinę, stanowiącą polifruktozan wyodrębniony z podziemnych organów spichrzowych pewnych gatunków złożonych (np. *Inula helenium*, *Helianthus tuberosus*, *Cichorium intybus*), w diagnostyce nerek jako substancję oczyszczającą przy oznaczaniu wielkości przesączu z kłębków nerkowych [patrz A.N. Richards, B.B. Westfal i P.A. Polt, Proc. Soc. Exper. Biol. (N.Y). 32, 73 (1934); I.A. Shannon, Amer. J. Physiol. 112, 405 (1935); oraz I.A. Shannon i H.W. Smith, I. Clin. Invest. 20, 169 (1935)]. W tym celu wprowadza się pozajelitowo pewną znaną ilość roztworu inuliny a następnie bada się usuwanie inuliny, oznaczając okresowo jej stężenie we krwi i w moczu. Warunkiem stosowania jest ta właściwość inuliny, że nie gromadzi się ona w organizmie ani też nie ulega zmianom chemicznym. Pomimo pewnych niedogodności praktycznych inulina aż do chwili obecnej okazała się najlepszą substancją standartową używaną do tego celu. Główną wadą w przypadku stosowania inuliny jest jej trudna rozpuszczalność w zimnej wodzie. Zazwyczaj stosowany 10% roztwór krystalizuje na zimno, tworząc skorupowy osad. Przed zaaplikowaniem pacjentowi osad ten musi być przez podgrzanie ponownie przeprowadzony w roztwór. Z jednej strony istnieje przy tym obawa hydrolizy do niskocząsteczkowych członów mostkowych oraz do fruktozy, które w odróżnieniu od inuliny ulegają rozkładowi w organizmie, a ponadto po wstrzyknięciu niedostatecznie rozpuszczonych preparatów może dojść do zatkania drobnych naczyń krwionośnych a tym samym do ciężkich powikłań.

W środku według wynalazku zaproponowano zastosowanie do diagnostyki nerek od dawna znanych, dobrze rozpuszczalnych w wodzie polifruktozanów wyodrębnionych z organów spichrzowych pewnych roślin jednoliściennych, a w szczególności z rodziny Liliaceae i Gramineae.

Środek do badania czynnościowego nerek, na podstawie polifruktozanów, według wynalazku zawiera łatwo rozpuszczalne w wodzie polifruktozany wyodrębnione z organów spichrzowych roślin jednoliściennych,

a zwłaszcza z rodziny Liliaceae i Gramineae. Ze względów ekonomicznych wchodzi tu w rachubę przede wszystkim zastosowanie sinistryny, to jest polifruktozanu z cebuli morskiej (*Urginea maritima*) [patrz O. Schmiedeberg Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem., 3, 112 (1879); oraz H.H. Schlubach i W. Flörsheim, Ber. dtsch. Chem. Ges., 62, 1491 (1929)] oraz polifruktozan z czosnku (*Allium sativum*) a ponadto gramininy i tritycyny (patrz G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Springer 1931, 1 część, strony 866—873; oraz K. Praech i M.V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer 1955, 2 tom, strony 184—196).

Wszystkie te polifruktozany są łatwo rozpuszczalne w wodzie i dają się łatwo hydrolizować kwasami. Średni ich ciężar cząsteczkowy wynosi około 3000, co odpowiada około 18 jednostkom monosacharydowym, a ich grupy fruktozowe są związane głównie w pozycji B—1,2 [patrz H.H. Schlubach, O.K. Sinh, Liebigs Ann., 544, 111 (1940)]. W badaniach klinicznych i farmakologicznych okazały się one całkowicie nietoksyczne.

Opisane dotychczas w literaturze sposoby otrzymywania powyższych, dobrze rozpuszczalnych w wodzie polifruktozanów okazały się mało przydatne dla wytwarzania ich w skali technicznej. [O. Schmiedeberg, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 3, 112 (1879) i G. Klein Handbuch der Pflanzenanalyse, Springer 1932, 1 część; str. 866—873], polegają one zasadniczo na sporządzeniu wyciągu wodnego, z którego usuwa się część substancji balastowych za pomocą strącania octanem ołowiu. Następnie usuwa się ołów, a polifruktozany strąca się dodaniem mleka wapiennego lub wody barytowej w postaci związków wapniowych lub barytowych. Po odsączeniu i przemyciu rozkłada się je kwasem węglowym lub szczawiowym a następnie tak oczyszczone roztwory polifruktozanów zatęża do postaci syropu i strąca alkoholem. Ponieważ ze strącanymi osadami uporczywie wiąże się popiół, monosacharydy i inne zanieczyszczenia, dlatego zwykle konieczne są wielokrotne ponowne strącania w celu uzyskania produktu o wystarczającym stopniu czystości.

Sposób wytwarzania środka do badania czynnościowego nerek polega według wynalazku na tym, że substancje podane przy omawianiu środka diagnostycznego według wynalazku ekstrahuje się niższymi alkoholami lub acetonem o zawartości wody od 80 do 40%, ekstrakt alkalizuje się korzystnie wodorotlenkiem wapnia do odczynu o wartości pH = 9, przesącza i zatęża pod zmniejszonym ciśnieniem do postaci gęstego syropu, następnie zatężony ekstrakt po dodaniu niższego alkoholu, korzystnie metanolu, w ilości około połowy ciężaru ekstraktu, zakwasza się mocnym kwasem, korzystnie kwasem solnym, do odczynu o wartości pH = 1—3, po czym polifruktozan strąca się dwu— do ośmiokrotną wagowo ilością niższego alkoholu, korzystnie metanolu, lub acetonu, i otrzymany osad poprzez wielokrotne zagniatanie z bezwodnym rozpuszczalnikiem strącającym doprowadza się do sproszkowanej postaci krystalicznej, a następnie roztwór tak otrzymanego polifruktozanu ewentualnie odsala się całkowicie w wymienniku, przesącza z węglem aktywnym i/albo bezpośrednio po odpędzeniu na drodze destylacji pozostałości rozpuszczalnika organicznego napełnia się roztworem ampułki, albo po zatężeniu roztworu do konsystencji syropu suszy się go w cienkiej warstwie pod próżnią.

Z grubsza rozdrobniony materiał roślinny ekstrahuje się wyczerpująco na drodze perkolacji, ewentualnie w podwyższonej temperaturze, wodnymi roztworami alkoholi lub acetonu, korzystnie metanolem, etanolem, izopropanolem lub acetonem o zawartości 80—40% wody. Zadanie rozpuszczalnika organicznego polega przy tym po pierwsze na zapobieganiu przed zaatakowaniem przez mikroorganizmy, po drugie na powstrzymaniu działania fermentów powodujących rozkład polifruktozanów, a po trzecie na ograniczeniu łącznego rozpuszczania przeszkadzających substancji pektynowych i śluzowych. Tak otrzymane wyciągi alkalizuje się mlekiem wapiennym do odczynu o wartości pH = 9, przesącza a przesącz odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do postaci syropu, o zawartości około 70—80% substancji stałej. Po ochłodzeniu syrop traktuje się porcjami taką ilością niższego alkoholu lub acetonu, korzystnie metanolu, żeby nie powstał utrzymujący się osad, po czym stężonym kwasem solnym doprowadza się odczyn do wartości pH = 1—3, korzystnie pH = 2,5, i traktuje całość taką ilością podanego wyżej rozpuszczalnika, aż uzyska się całkowite strącenie. Dodatek kwasu powoduje pozostanie w roztworze dużej części zawartych soli i barwników, które w przeciwnym razie uległyby także strąceniu. Osad, składający się z białawej, ciągliwej masy, oddziela się od znajdującej się nad nim cieczy i wielokrotnie zagniata z małymi porcjami rozpuszczalnika, przy czym masa przechodzi stopniowo w drobnoziarnisty, krystaliczny produkt, który następnie na wirówce lub nuczy uwalnia się od związanej z nim cieczy. Tak otrzymana substancja jest już bardzo czysta, jednakże w celu stosowania pozajelitowego musi być jeszcze dodatkowo oczyszczona poprzez przepuszczenie przez wymiennik jonowy i przesączenie odsolonego roztworu z dodatkiem węgla aktywnego. Tak otrzymany roztwór można albo po usunięciu przez destylację resztek rozpuszczalnika i po nastawieniu żądanego stężenia rozlewać bezpośrednio do ampułek, lub też po zatężeniu do postaci gęstego syropu suszyć na płytach szklanych lub stalowych pod próżnią w temperaturze co najwyżej 80°C.

Podane niżej przykłady objaśniają bliżej sposób wytwarzania środka według wynalazku, nie ograniczając jego zakresu.

P r z y k ł a d I. Wytwarzanie polifruktozanu (sinistryny) z cebul *Urginea maritima*. 100 kg znajdującej się w handlu wysuszonej, czerwonej cebuli morskiej miele się zgrubnie w młynie nożowym z wkładką sitową

o średnicy otworów 4 mm, po czym zwilża wstępnie 200 kg 30% wodnego roztworu metanolu a po 24 – godzinym odstaniu poddaje się perkolacji w temperaturze pokojowej tym samym rozpuszczalnikiem, przy czym szybkość odcieku wynosi około 4 kg na godzinę. Odbiera się ogółem 300 kg ekstraktu. Ekstrakt ten doprowadza się do odczynu o wartości $\text{pH} = 9$ za pomocą zawiesiny 250 g wodorotlenku wapniowego w niewielkiej ilości wody, po czym odsąca się osad a ciecz zatęża pod zmniejszonym ciśnieniem do postaci gęstego syropu. Otrzymuje się około 75 kg syropu o zawartości 80% substancji stałej. Silnie mieszając wprowadza się cienkim strumieniem 30 kg metanolu i prawie przezrysty roztwór chłodzi do temperatury 15°C . W dalszym ciągu silnie mieszając, do roztworu dodaje się ochłodzoną mieszaninę, składającą się z 3 litrów stężonego kwasu solnego i 8 kg metanolu. Wskutek tego wytrąca się sinistryna w postaci perłowo błyszczącej, lepkiej, żółtawo-białej masy. Po krótkim odstaniu, klarowny, żółty roztwór poddaje się możliwie całkowicie i zlewa znad osadu. Roztwór ten zawiera sole, fruktozę i niskocząsteczkowe oligosacharydy. Można z niego odzyskać metanol na drodze destylacji i rektyfikacji.

Osad sinistryny o ciężarze około 40 kg ugniatą się energicznie w ugniatarce trzykrotnie, każdorazowo z 40 kg metanolu, przy czym za każdym razem dekantuje się nadmiar metanolu i łączy go z metanolem otrzymanym jako pozostałość po pierwszym strąceniu, natomiast ugniatana masa przekształca się w drobnoziarnisto-krystaliczną zawiesinę. Następnie zawiesinę tę odwirowuje się na wirówce a otrzymaną w ilości około 35 kg substancję rozpuszcza się w 70 kg wody. Roztwór miesza się z 3 kg węgla aktywnego, przesącza a następnie z szybkością około 15 l na godzinę podaje na złożę mieszane składające się z 5 l słabo-kwaśnego wymiennicza kationowego o postaci H^{+} i 10 l silnie zasadowego wymiennicza anionowego o postaci OH^{-} . Tak otrzymany roztwór czystej sinistryny zatęża się pod próżnią do postaci gęstego syropu i suszy w cienkiej warstwie w wannach stalowych w suszarce próżniowej. Otrzymuje się białą, kruchą, dającą się łatwo sproszkować, bezwoną i nie posiadającą określonego smaku masę, powoli rozpuszczającą się w każdym stosunku w wodzie i nierozpuszczalną w większości rozpuszczalników organicznych z wyjątkiem pirydyny, formamidu, butyloaminy, fenolu, acetamidu i niższych alkoholi o dużej zawartości wody. Krioskopowo oznaczony: ciężar cząsteczkowy produktu wynosi około 3000. Skręcalność optyczna $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39,2^{\circ}$ ($c = 10\text{H}_2\text{O}$). Wydajność produktu wynosi 31,5 kg.

Przykład II. Wytwarzanie polifruktozanu z czosnku (*Allium sativum*). 100 kg czosnku oczyszcza się zgrubnie z łodyg, korzeni i zewnętrznych, suchych łusek, po czym oczyszczoną pozostałość rozdrabnia się za pomocą urządzenia rozdrabniającego, takiego jak kuter. Otrzymaną papkę miesza się natychmiast energicznie z 30 kg izopropanolu i po około dwunastogodzinnym odstaniu podaje perkolacji 30% wodnym roztworem izopropanolu przy szybkości odcieku, wynoszącej około 2,5 kg na godzinę. Odbiera się ogółem 200 kg ekstraktu. Dalej postępuje się analogicznie, jak w przykładzie I. Otrzymuje się 10,5 kg produktu o skręcalności optycznej $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40,5^{\circ}$ ($c = 10\text{H}_2\text{O}$). Pozostałe własności produktu są identyczne z podanymi w przykładzie I.

Zastrzeżenia patentowe

1. Środek do badania czynności nerek, na podstawie polifruktozanów, znamienny tym, że zawiera łatwo rozpuszczalne w wodzie polifruktozany wyodrębnione z organów spichrzowych roślin jednoliściennych, a zwłaszcza roślin z rodzin Liliaceae i Gramineae.

2. Środek według zastrz. 1, znamienny tym, że zawiera polifruktozany wyodrębnione z *Urginea maritima*.

3. Środek według zastrz. 1, znamienny tym, że zawiera polifruktozany wyodrębnione z *Allium sativum*.

4. Sposób wytwarzania środka do badania czynności nerek na podstawie polifruktozanów, znamienny tym, że łatwo rozpuszczalne w wodzie polifruktozany ekstrahuje się z organów spichrzowych roślin jednoliściennych, a zwłaszcza roślin z rodzin Liliaceae i Gramineae niższymi alkoholami lub acetonem o zawartości wody od 80 do 40%, ekstrakt alkalizuje się korzystnie wodorotlenkiem wapnia do odczynu o wartości $\text{pH} = 9$, przesącza i zatęża pod zmniejszonym ciśnieniem do postaci gęstego syropu, następnie zagęszczony ekstrakt po dodaniu niższego alkoholu, korzystnie metanolu, w ilości około połowy ciężaru ekstraktu, zakwasza się mocnym kwasem, korzystnie kwasem solnym, do odczynu o wartości $\text{pH} = 1-3$, po czym polifruktozan strąca się dwu- do ośmiokrotną wagowo ilością niższego alkoholu, korzystnie metanolu, lub acetonu, i otrzymany osad poprzez wielokrotne zagniatanie z bezwodnym rozpuszczalnikiem strącającym doprowadza się do sproszkowanej postaci krystalicznej, a następnie roztwór tak otrzymanego polifruktozanu odsala się całkowicie w wymienniczu, przesącza z węglem aktywnym i albo bezpośrednio po odpędzeniu na drodze destylacji i pozostałości rozpuszczalnika organicznego napełnia się roztworem ampułki, albo po zatężeniu roztworu do konsystencji syropu suszy się go w cienkiej warstwie pod próżnią.