

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237326**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424948**

(22) Data zgłoszenia: **19.03.2018**

(51) Int.Cl.

**C07D 311/30 (2006.01)**

**C07H 17/07 (2006.01)**

**C12P 17/06 (2006.01)**

**C12P 19/60 (2006.01)**

(54) **4'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawon i sposób wytwarzania  
4'-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**23.09.2019 BUP 20/19**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**06.04.2021 WUP 07/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy  
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL  
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL  
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Kasperowicz**

**PL 237326 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon i sposób wytwarzania 4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Związek ten może znaleźć zastosowanie jako antyoksydant w przemyśle spożywczym oraz jako składnik środków farmaceutycznych i kosmetycznych, a także dodatek do pasz.

Flawonoidy to drugorzędowe metabolity roślin szeroko rozpowszechnione w naturze obecne w diecie ludzi w ilościach od kilkuset miligramów do 1–2 grama. Związki te znane są z prozdrowotnego działania, mają udowodnioną aktywność między innymi przeciwmikrobiologiczną, przeciwzapalną, antydiabetyczną, przeciwnowotworową, ochronną w stosunku do układu krążenia. Aktywność flawonoidów jest ściśle związana z ich strukturą – w tym stopniem nasycenia, ilością i położeniem grup hydroksylowych czy obecnością dodatkowych podstawników. U podłoża wielu aktywności biologicznych leży wykazywany przez te związki potencjał antyoksydacyjny. W działaniu przeciwutleniającym uczestniczą grupy hydroksylowe, które wyłapują wolne rodniki oraz chelatują metale. Wiele badań dowodzi, że ważna w strukturze flawonoidu jest obecność grup hydroksylowych w pierścieniu B (Sengupta B, Sahihi M, Dehkhodaei M, Kelly D, Arany I. Differential roles of 3-Hydroxyflavone and 7-Hydroxyflavone against nicotine-induced oxidative stress in rat renal proximal tubule cells. *PLoS One*. 2017, 12(6), 1–16; Shashank K, Abhay K. Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J*. 2013, 4(2), 32–48; Wang T yang, Li Q, Bi K shun.

Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>; Mahfoudi R, Djeridane A, Benarous K, Gaydou EM, Yousfi M. Structure-activity relationships and molecular docking of thirteen synthesized flavonoids as horseradish peroxidase inhibitors. *Bioorg Chem* [Internet], 2017;74:201-11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.08.001>.

Flawonoidy w roślinach występują wyłącznie w połączeniu z jednostkami cukrowymi. Glikozylacja skutkuje wzrostem rozpuszczalności cząsteczki flawonoidu w wodzie i wzrostem jego stabilności. Dzięki temu zwiększa się przyswajalność przyjmowanych z pokarmem związków (J. Xiao, T.S. Muzashvili, M.I. Georgiev, *Biotechnology Advances*, 2014, 32, 1145–1156, Plaza, M.; Pozzo, T.; Liu, J.; Gulshan Ara, K. Z.; Turner, C.; Nordberg Karlsson, E. Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. *J. Agric. Food Chem*. 2014, 62, 3321–3333).

Uważa się, że glikozydy flawonoidowe przed absorpcją w układzie pokarmowym muszą zostać poddane hydrolizie przez mikroflorę jelitową do odpowiednich aglikonów. Dowiedziono jednak, że częściowa absorpcja połączeń cukrowych flawonoidów również jest możliwa.

Cząsteczka glukozy przyłączona w pozycji 3 kwercetyny (3,5,7,3',4'-pentahydroksyflawon) zwiększała absorpcję tego glukozydu w jelicie cienkim do 52%, w porównaniu z 24% absorpcją aglikonu kwercetyny i 17% rutynozydu kwercetyny (Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem*. 2002, 13, 572–584, Hollman, P. C.; Bijsman, M. N.; van Gameren, Y; Cnossen, E. P; de Vries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res*. 1999, 31, 569-573).

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu na drodze syntezy chemicznej i biotransformacji.

W ostatnich latach w leczeniu i prewencji chorób coraz większe znaczenie zyskują związki pochodzenia naturalnego i ich odpowiedniki uzyskane na drodze biotransformacji. Dlatego istotne jest poszukiwanie nowych sposobów wytwarzania związków aktywnych biologicznie, które mogą być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym, ale też kosmetycznym i spożywczym.

Istotą wynalazku jest 4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon.

Istota otrzymywania 4'-O-β-D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-fiawonu polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2. Po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest flawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu co najmniej 96 godzin. Kolejny produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 144 godziny.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje hydroksylacja i przyłączenie 4-metoksy- $\beta$ -D-glukozy przy C-4'. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znany sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 4'-O- $\beta$ -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu wykorzystując mikroorganizm niebędący patogenem ludzkim.

Wykorzystanie biotransformacji, zamiast syntezy chemicznej, umożliwia, w sposób przyjazny dla środowiska, uzyskanie związków o wyższej biodostępności i aktywności biologicznej, niż użyte substraty (E. Kostrzewa-Susłow, J. Dmochowska-Gładysz, J. Oszmiański, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 49 (1–4), 113–117, W. A. Loughlin, Bioresource Technology, 2000, 74, 49–62).

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

**P r z y k ł a d.** Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 500 cm<sup>3</sup> sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2 ujawniony w zgłoszeniu patentowym o numerze P.416996. Po 96 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg flawonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm<sup>3</sup> tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 6 dni. Następnie mieszaninę reakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny chloroformu i metanolu w stosunku 9:1. 4'-O- $\beta$ -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon znajduje się we frakcji o pośredniej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 13 mg 4'-O- $\beta$ -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu (wydajność 14%). Stopień konwersji substratu według HPLC >99%

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)

Sygnały pochodzące od szkieletu flawonoidowego			Sygnały pochodzące od jednostki cukrowej		
$\delta$ [ppm]	J [Hz]	H	$\delta$ [ppm]	J [Hz]	H
6,83 (s)	-	H-3	5,14 (d)	7,7	1C
8,15 (d)	7,8	H-5	3,56 (t)	8,4	2C
7,52 (t)	7,4	H-6	3,70 (t)	9,0	3C
7,84 (t)	7,7	H-7	3,,28 (t)	9,3	4C
7,76 (d)	8,4	H-8	3,59 (m)	-	5C
8,09 (d)	7,9	H-2'	3,90 (d)	11,9	6C
			3,75 (dd)	11,6; 4,0	
7,28 (d)	7,9	H-3'	3,62 (s)	-	OCH <sub>3</sub>
7,28 (d)	7,9	H-5'			
8,09 (d)	7,9	H-6'			

## Zastrzeżenia patentowe

1. 4'-O- $\beta$ -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 4'-O- $\beta$ -D-(4"-O-metyloglukopiranozylo)-flawonu **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria fumosorosea* KCH J2, następnie po upływie co najmniej 72 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest flawon o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 96 godzin, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 144 godziny.

### Rysunek

