



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

224 972

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 20 07 82

(21) PV 5543 - 82

(51) Int. Cl.³ C 07 D 307/93,
C 07 C 62/32,
A 01 N 43/08,
(A 01 N 43/08,
43/12)

(40) Zverejnené 27 05 83

(45) Vydané 01 12 84

(75)
Autor vynálezu

ONDREJKOVIČ ANTON ing.,
VIZÁROVÁ GABRIELA RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54)

Spôsob prípravy kyselín gibereľových z glukozylesterov kyselín
gibereľových

Vynález sa týka spôsobu prípravy kyselín gibberelových z glukozylesteroz kyselín gibberelových.

Rastové regulátory typu gibberelínov získali Curtis a Croos [P. J. Curtis, B.E. Croos: Chem. Ind. /Lond./ 1066 /1954/] extrakciou z rastlinného materiálu studeným metanolom alebo acetónom obsahujúcim až 50 % vody. Kyseliny gibberelové extrahovali do octanu etylového pri pH 2,5 a 3,0, reextrahovali do pufru o pH 8,0 alebo pH 6,5 a znova extrahovali do octanu etylového po úprave na pH 2,5 až 3,0. Takmer všetky voľné kyseliny gibberelové obdržali v kyslej frakcii octanu etylového. Časť glukozylesteroz kyselín gibberelových sa môže extrahovať z okyslenej vodnej fázy 1-butanolom [N. Takahashi: Plant Growth Substances 1973, Hirokawa, Tokyo, 228 /1974/]. Vysoká koncentrácia fosfátového pufru môže viesť k neúplnému získaniu nepolárnych glukozylesteroz kyselín gibberelových pri pH 8,0 [R.C. Durley, R.P. Pharis: Phytochemistry 11, 317/1972/], resp. 6,5. Extrémne hodnoty pH spôsobujú degradáciu gibberelínov. Lipidy, ktoré by prekážali pri separácii a biologických metódach sa odstraňujú petroléterom alebo dietyléterom pri neutrálnom alebo slabom alkalickom pH pred extrakciou gibberelínov. Zatiaľ čo petroléter neextrahuje gibberelíny z pufrovej fázy pri pH 8,0, dietyléter extrahuje značnú časť málo polárnych gibberelínov [R.C. Durley, R.P. Pharis: Phytochemistry 11, 317 /1972/]. Polovičné množstvo gibberelínov sú glukozylestery kyselín gibberelových, ktoré sa môžu rozrušiť hydrolýzou anorganickými kyselinami alebo zásadami a potom extrahovať octanom etylovým. Oproti kyslej a alkalickéj hydrolýze je preferovaná enzymatická hydrolýza, pretože vzniká menej deštruktívnych

produktov [T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi, S. Tamura: Agr. Biol. Chem. 35, 583 /1971/; K. Higara, T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi: Agr. Biol. Chem. 38, 2511 /1974/]. Ovšem i enzymatická hydrolýza okrem vyšších nákladov na prípravu znečisťuje produkt. Hydrolýzu pomocou β -glukozidázy, celulózy a iných enzýmov skúmali ďalší autori [H. - D. Knöfel, P. Müller, G. Sembdner: Biochemistry and Chemistry of Plant Growth Regulators, Eds.: K. Schreiber, H. R. Schütte, G. Sembdner, Acad. Sci. G.D.R., Halle /Saale/ 121 /1974/]. Pre extrakciu giberelínov z rastlinného materiálu v menšej miere sa používajú neutrálne alebo slabo alkalické pufre. [A. J. McComb: Nature/Lond./ 192, 575 /1961/]. Nízka reprodukovateľnosť delenia je u metód, kde sa giberelíny adsorbujú na aktívne uhlie a potom eluujú s acetónom [C. A. West, B. O. Phinney: J. Amer. Chem. Soc. 81, 2424 /1959/; J. Mac-Millan, J. C. Seaton, P. J. Suter: Tetrahedron 11, 60 /1960/]. Pri izolácii na chemicky modifikovaných dextranoch ostáva časť giberelínov irreverzibilne neadsorbovaná.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy kyselín giberelových z glukozylesterov kyselín giberelových podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa 1,6 až 2,0 % roztok glukozylesterov kyselín giberelových v 80 % metanole deionizuje na ionomeničoch s funkčnými sulfoskupinami a ionomeničoch s funkčnými skupinami trimetylamoniumhydroxidovými a potom sa zahustí pri tlaku 3 kPa na 30 až 90 % roztok, ktorý sa zriedí s 80 % metanolom na 3 až 5 % roztok, ktorý sa hydrolyzuje ionomeničom s funkčnými sulfoskupinami za miešania pri teplote 20 až 25 °C po dobu 2 až 3 h a hydrolyzáť po odfiltrovaní ionomeniča sa zahustí pri tlaku 3 kPa na 90 % sirup.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy kyselín giberelových z glukozylesterov kyselín giberelových oproti doterajším postupom prípravy je, že predmetný spôsob je jednoduchší a ekonomicky nenáročný. Vzniká menej deštruktívnych produktov a kyseliny giberelové sú zbavené anorganických solí.

Príklad 1

224 972

2 400 g suchej fazule *Phaseolus vulgaris* sa zvlhčí 600 ml vody a nechá sa napučiavať v tme pri teplote 8 °C po dobu 18 h. Po napučaní sa fazuľa extrahuje s 3 000 ml 80 % metanolu v tme pri 8 °C po dobu 48 h. Extrakt sa sfiltruje a nechá sa stáť v tme pri teplote 8 °C po dobu 72 h. Pevný zvyšok sa reextrahuje s 3 000 ml 80 % metanolu v tme pri teplote 8 °C po dobu 72 h. Filtráciou sa získa ďalší extrakt, ktorý sa spojí s predošlým a spolu sa zahustia pri tlaku 3 kPa na 200 ml roztoku. Lipidy sa odstránia trojnásobnou extrakciou s 200 ml dietyléteru po úprave na pH 8,0 s pevným hydrogenuhličitanom sodným. Vodná fáza /260 g/ sa po úprave na pH 2,5 s 37 % kyselinou chlorovodíkovou trojnásobne extrahuje s 200 ml octanu etylového a získa sa extrakt obsahujúci kyseliny giberelové. Vodná fáza po extrakcii octanom etylovým sa pätnásobne extrahuje so 100 ml 1-butanolu a 1-butanolický extrakt sa zahustí pri tlaku 3 kPa na 43 g sirupu obsahujúceho glukozylestery kyselín giberelových, ktorý sa zriedí s 200 ml 80 % metanolu. Roztok glukozylestеров kyselín giberelových sa zbaví anorganických solí, organických kyselín a zásad deionizáciou na kolóne naplnenej ionomeničom s funkčnými sulfoskupinami /Wofatit KPS 200 0,3 až 0,85 mm/ s dĺžkou 50 cm a priemerom 4 cm a na kolóne naplnenej ionomeničom s funkčnými skupinami trimetylamoniumhydroxidovými /Dowex 1 X 8 0,3 až 0,85 mm/ s dĺžkou 50 cm a s priemerom 4 cm. Ako elučné činidlo sa použije 2 000 ml 80 % metanolu. Deionizovaný roztok a eluát sa spoločne zahustia pri tlaku 3 kPa na 3,2 g 90 % sirupu, ktorý sa rozpustí v 100 ml 80 % metanolu. Metanolicko-vodný roztok glukozylestеров kyselín giberelových sa hydrolyzuje s 50 g ionomeniča s funkčnými sulfoskupinami /Dowex 50 W X 4 0,040 až 0,075 mm/ za miešania pri teplote 20 °C po dobu 3 h. Ionomenič sa odfiltruje a premyje s 20 ml 80 % metanolu. Sfiltrovaný roztok sa odfarbí s 1 kg aktívneho uhlia a sfiltruje po dobu 16 h. Odfarbený roztok sa zahustí

pri tlaku 3 kPa na 2,6 g 90 % sirupu obsahujúceho 60 % kyselín giberelových a 30 % D-glukózy, ktorý sa zriedí s 80 % metanolom na 6 % roztok kyselín giberelových. Biologická aktivita kyselín giberelových sa stanoví biotestom [G. V.

Krylova: Rost rastenij i prirodnyje regulatory, Akademia nauk ZSSR, Moskva, 175 /1978/] na princípe rastu klíčiaceho trpasličieho hrachu; 0,05 ml 6 % kyselín giberelových spôsobil 150 % prírastok oproti kontrole a 0,075 ml 6 % kyselín giberelových spôsobil 200 % prírastok oproti kontrole; 50 μ g kyseliny giberelovej GA_3 spôsobil 200 % prírastok oproti kontrole.

Príklad 2

3 000 g suchej fazule *Phaseolus vulgaris* sa zvlhčí 1 000 ml vody a nechá sa napučiavať v tme pri teplote 8 °C po dobu 17 h. Po napučaní sa fazuľa extrahuje s 4 000 ml 80 % metanolu v tme a pri 8 °C po dobu 48 h. Extrakt sa sfiltruje a nechá sa stáť v tme pri teplote 8 °C po dobu 72 h. Pevný zvyšok sa reextrahuje s 4 000 ml 80 % metanolu v tme pri teplote 8 °C po dobu 72 h. Filtráciou sa získa ďalší extrakt, ktorý sa spojí s predošlým a spolu sa zahusťia pri tlaku 3 kPa na 300 ml roztoku. Lipidy sa odstraňujú štyrnásobnou extrakciou so 150 ml dietyléteru po úprave na pH 8,0 s pevným hydrogenuhličitanom sodným. Vodná fáza /440 g/ sa po úprave na pH 2,5 s 37 % kyselinou chlorovodíkovou trojnásobne extrahuje s 500 ml octanu etylového a získa sa extrakt obsahujúci kyseliny giberelové. Vodná fáza po extrakcii octanom etylovým sa dvojnásobne extrahuje s 500 ml 1-butanolom a 1-butanolický extrakt sa zahusťí pri tlaku 3 kPa na 56 g sirupu obsahujúceho glukozylestery kyselín giberelových, ktorý sa zriedí s 250 ml 80 % metanolu. Roztok glukozylesteroov kyselín giberelových sa zbaví anorganických solí, organických kyselín a zásad deionizáciou na kolóne naplnenej ionomeničom s funkčnými sulfoskupinami /Dowex 50 W X 8 0,3 až 0,85 mm/ s dĺžkou 50 cm a priemerom 4 cm a na kolóne naplnenej ionomeničom s funkčnými skupinami trimetylamoniumhydroxidovými /Ostion AT 0809 0,315 až

0,8 mm/ s dĺžkou 50 cm a priemerom 4 cm. Ako elučné činidlo sa použije 2 000 ml 80 % metanolu. Deionizovaný roztok a eluát sa spoločne zahustia pri tlaku 3 kPa na 10 ml roztoku, ktorý sa rozpustí v 100 ml 80 % metanolu. Metanolicko-vodný roztok glukozylesterov kyselín giberelových sa hydrolyzuje s 50 g ionomeniča s funkčnými sulfoskupinami /Dowex 50 W X 4 0,040 až 0,075 mm/ za miešania pri teplote 25 °C po dobu 2 h. Ionomenič sa odfiltruje a premyje s 20 ml 80 % metanolu. Sfiltrovaný roztok sa odfarbí s 1,5 g aktívneho uhlia a sfiltruje po dobe 17 h. Odfarbený roztok sa zahustí pri tlaku 3 kPa na 3,6 g 90 % sirupu obsahujúceho 60 % kyselín giberelových a 30 % D-glukózy, ktorý sa zriedí s 80 % metanolom na 6 % roztok kyselín giberelových. Biologická aktivita: 0,05 ml 6 % kyselín giberelových spôsobil 170 % prírastok oproti kontrole a 0,075 ml 6 % kyselín giberelových spôsobil 210 % prírastok oproti kontrole; 50 µg kyseliny giberelovej spôsobil 200 % prírastok oproti kontrole.

Vynález môže nájsť široké použitie v poľnohospodárstve a pri štúdiu biochemických procesov v rastlinách. Kyselinami giberelovými sa môže rušiť dormancia semien a spiacich pupeňov rastlín. U niektorých rastlín sa môže indukovať kvitnutie. Ďalej sa môže kyselinami giberelovými zväčšiť veľkosť plodov.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

224 972

Spôsob prípravy kyselín giberelových z glukozylesterov kyselín giberelových obsiahnutých vo vodnej fáze extraktu po extrakcii voľných kyselín giberelových etylacetátom s použitím hydrolýzy uvedených glukozylesterov, vyznačujúci sa tým, že sa 1,6 až 2,0 % roztok glukozylesterov kyselín giberelových v 80 % metanole deionizuje na ionomeničoch s funkčnými sulfoskupinami a ionomeničoch s funkčnými skupinami trimetylamoniumhydroxidovými a potom sa zahustí pri tlaku 3 kPa na 30 až 90 % roztok, ktorý sa zriedí s 80 % metanolom na 3 až 5 % roztok, ktorý sa hydrolyzuje ionomeničom s funkčnými sulfoskupinami za miešania pri teplote 20 až 25 °C po dobu 2 až 3 h a hydrolyzát po odfiltrovaní ionomeniča sa zahustí pri tlaku 3 kPa na 90 % sirup.