

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237329**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424951**

(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) **3-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawon  
i sposób wytwarzania  
3-O-β-D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu**

(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 WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Kasperowicz**

**PL 237329 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawon i sposób wytwarzania 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu 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.

Większość prozdrowotnych korzyści ze spożywania związków flawonoidowych wynika z ich aktywności przeciwutleniającej i zdolności do chelatowania jonów metali (Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 572–584). Szereg badań dowodzi wagi obecności w cząsteczce związku flawonoidowego grupy hydroksylowej w pozycji 3, a także ugrupowania katecholowego w pierścieniu B, szczególnie w przypadku wyłapywania wolnych rodników tlenowych, czy chelatowaniu jonów żelaza (Cotelle, N.; Bernier, J.L.; Henichart, J.P.; Catteau, J.P.; Gaydou, E.; Wallet, J.C.: *Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones*. *Free Radic Biol Med.* 1992, 13, 211–219).

Kwercetyna (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) jest jednym z najsilniej przeciwcukrzycowo działających flawonoidów. Badania prowadzone na szczurach z wywołaną insulinoopornością dowodzą, że otrzymane na drodze syntezy chemicznej analogi 3-hydroksyflawonu (posiadające dodatkowe grupy metylowe, etylowe, hydroksylowe i dimetyloaminowe w różnej liczbie i pozycjach) znoszą insulinooporność, redukują hiperglikemię, dyslipidemię i wzmagają obronę antyoksydacyjną (Nayak, Y.; Venkatachalam, H.; Daroji, V. K.; Mathew, G.; Jayashree, B. S.; Unnikrishnan, M. K. *Antidiabetic activity of 3-hydroxyflavone analogues in high fructose fed insulin resistant rats*. *EXCLI J.* 2014, 13, 1055–1074).

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 (3,3',4',5,7-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).

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 antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids*. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 3321–3333).

W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat otrzymywania 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu 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 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawon.

Istota otrzymywania 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu 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 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon (kwercetyna) 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 240 godzin.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria fumosorosea* KCH J2, następuje przyłączenie 4-metoksy- $\beta$ -D-glukozy przy C-3. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu 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 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawonu (kwercetyny) o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm<sup>3</sup> tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 10 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną 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. 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawon znajduje się we frakcji i niższej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 9,3 mg 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu (wydajność 12,1%). 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>):  $\delta$  = 8,04 ppm (1H, d, J<sub>2,6</sub>=2.1 Hz, H-2');  $\delta$  = 7,64 ppm (1H, dd, J<sub>6,5</sub>=8.4 Hz, J<sub>6,2</sub>=2.2 Hz, H-6');  $\delta$  = 7,00 ppm (1H, d, J<sub>5,6</sub>=8.4 Hz, H-5');  $\delta$  = 6,55 ppm (1H, d, J<sub>8,6</sub>=2.1 Hz, H-8);  $\delta$  = 6,32 ppm (1H, d, J<sub>6,8</sub>=2.0 Hz, H-6);  $\delta$  = 5,27 ppm (1H, d, J=7,8 Hz, H-1'');  $\delta$  = 3,73 ppm (1H, d, J=12.0 Hz, H-6''a);  $\delta$  = 3,64 ppm (2H, m, H-3'', H-6''b);  $\delta$  = 3,57 ppm (3H, s, C-4''-OCH<sub>3</sub>);  $\delta$  = 3,50 ppm (1H, t, J=8.1 Hz, H-2'');  $\delta$  = 3,34 ppm (1H, m, H-5'');  $\delta$  = 3,18 ppm (1H, m, C-4'').

## Zastrzeżenia patentowe

1. 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 3-O- $\beta$ -D-(4''-O-metyloglukopiranozylo)-3',4',5,7-tetrahydroksyflawonu, **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 3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon (kwercetyna) 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 zastrzeżenia 2, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 240 godzin.

## Rysunek

