

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

72 764

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 12o, 25/01

Zgłoszono: 16.05.1970 (P. 140677)

Pierwszeństwo: 19.05.1969 Niemiecka Republika
Demokratyczna

MKP C07c 169/00

Zgłoszenie ogłoszono: 25.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 01.12.1975

CZYTELNIA

11.05.1975 P. 140677

Twórcy wynalazku: Rudolf Megges, Renate Franke, Barbara Streckenbach,
Günter Kammann, Kurt Repke

Uprawniony z patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Drezno
(Niemiecka Republika Demokratyczna)

Sposób wytwarzania azotanów steroidów o działaniu nasercowym

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania działających na serce azotanów steroidów i steroidoglikozydów typu kardenolidu i bufadienolidu. Azotany tego rodzaju nie były dotychczas znane.

Estryfikacja grup hydroksylowych kwasem azotowym w celu wytworzenia estrów kwasu azotowego jest reakcją znaną już od dawna. Tak na przykład alkohole, takie jak etanol, można przez działanie stężonego kwasu azotowego w obecności mocznika przeprowadzić w odpowiednie azotany. Związki o wielu grupach wodorotlenowych w cząsteczce, np. cukry, przeprowadza się w azotany cukrów za pomocą mieszaniny bezwodnika kwasu octowego i kwasu azotowego [Advances of Carbohydrate Chemistry 12, 117–135 (1957)]. Także w przypadku niektórych steroidów hormonowych, np. 3α , 21-dwuhydroksy-11-keto-20-hydroksymetylo- 5β -pregnanu, można wytworzyć tą metodą azotan. Związków wrażliwych na kwasy nie można było jednak dotąd poddawać reakcji w ten sposób, ponieważ należało oczekiwać zachodzenia w znacznej mierze reakcji ubocznych. Estryfikację takich związków, do których między innymi należą nasercowe steroidy, można było prowadzić ewentualnie tylko w pirydynie. Jednakże badania w tym kierunku dały tylko negatywne wyniki, mianowicie w roztworze pirydyny lub w obecności zasadowych katalizatorów, np. octanu sodowego lub środka wiążącego kwas azotowy, takiego jak fluorek sodu, nie można było przeprowadzić nasercowych steroidów w ich azotany.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania azotanów nasercowych steroidów. Sposobem według wynalazku nasercowe steroidy poddaje się reakcji z nadmiarem stężonego kwasu azotowego lub jego soli zadanego bezwodnikiem kwasu octowego, ewentualnie w obecności rozpuszczalnika. Stosunek bezwodnika kwasu octowego do kwasu azotowego może wynosić od 1 : 1 do 50 : 1, a korzystnie wynosi od 1,2 : 1 do 10 : 1. Na 1 mol poddawanych estryfikacji grup OH stosuje się 1–50, korzystnie 5–30 moli kwasu azotowego lub równoważne ilości jego soli, zwłaszcza soli metali ciężkich, np. azotanu miedzi. Reakcję prowadzi się w temperaturze od -30°C do $+50^{\circ}\text{C}$, korzystnie od -20° do 25°C . Jako rozpuszczalniki stosuje się przede wszystkim chlorowcowęgłowodory, takie jak chloroform lub chlorek metylenu, dalej aceton, acetonitryl lub nitrobenzen.

Mieszanina bezwodnika kwasu octowego i kwasu azotowego lub bezwodnika kwasu octowego i soli kwasu azotowego może sama stanowić rozpuszczalnik. Nasercowe steroidy, które się nie rozpuszczają, mogą wchodzić

skutecznie w reakcję także w zawiesinie. Reakcja zachodzi bardzo szybko i na ogół w ciągu jednej godziny jest zakończona.

Reakcja według wynalazku ma przebieg o tyle nieoczekiwany, że przy wrażliwości nasercowych steroidów na kwasy należało się spodziewać reakcji ubocznych, takich jak odwodnienie i rozkład glikozydu. Takie reakcje uboczne występują jednak tylko w małym stopniu, jeżeli na 1 mol grup OH stosuje się nie więcej niż 50 moli kwasu azotowego lub równoważną ilość soli kwasu azotowego i mieszaninę reakcyjną natychmiast po przereagowaniu poddaje dalszej obróbce.

Sposób według wynalazku umożliwia przeprowadzenie pierwszo lub drugorzędowych grup OH nasercowych glikozydów zarówno w części steroidowej cząsteczki, jak również w łańcuchu cukrowym, w odpowiednie azotany. Na ogół wszystkie zdolne do acylowania grupy OH ulegają zestryfikowaniu. Trzeciorzędowe grupy OH nie estryfikują się, a grupy karbonyłowe pozostają niezmienione.

Według wynalazku możliwa jest także estryfikacja częściowa. Osiąga się to przez zmiany ilości kwasu azotowego, wchodzącej w reakcję z grupami OH.

Selektywne estryfikowanie możliwe jest wtedy, gdy określone grupy hydroksylowe ochrania się przez działanie związkami, które reagują zwłaszcza z ugrupowaniem cis-1,2- i cis-1,3-diolowym, np. przez działanie trójtlenkiem boru, po czym estryfikuje się pozostałe wolne grupy hydroksylowe kwasem azotowym, a następnie odszczepia grupy ochronne.

Wytworzone sposobem według wynalazku estry kwasu azotowego zachowują niezmienną budowę stosowanych jako produkty wyjściowe nasercowych glikozydów lub steroidów. To zostało wykazane przez usunięcie reszt azotanowych z wytworzonych związków, w znany sposób za pomocą redukcji mocnymi środkami redukującymi, które nie zmieniają nasercowych steroidów i steroidoglicerydów, np. metalami, zwłaszcza pyłem cynkowym. Odzyskano w ten sposób w stanie niezmienionym produkty wyjściowe, a więc np. glikozydy i geniny typu digitalis i strofantus, a także butadienolidy, np. proscilarydyna, obok małych ilości (5%) produktu odszczepienia łańcucha cukrowego.

Budowę azotanów potwierdzono w widmie podczerwonym i za pomocą analizy elementarnej. W widmie podczerwieni występują nowe, charakterystyczne dla grup ONO_2 pasma przy około 1640 K, 1280 K i 860 K.

Wytworzone sposobem według wynalazku azotany mają dodatnie działanie inotropowe, mocniejsze niż to, które wykazują nasercowe steroidy lub steroidoglikozydy. I tak np. następujące azotany wykazują podane w tablicy 1 działanie hamujące adenozyntotrójfosfatę komórek mięśnia sercowego.

, Tablica 1

Hamowanie adenozyntotrójfosfatazy
(K. Repke i H. Portius, Experientia 19, 1963, str. 452).

Związek	Działanie hamujące 50% [μ mole]
3 β , 16 β -dwuazotan gitoksygeniny	0,43
gitoksygenina	10,8
azotan helwetykozydu	0,7
dwuazotan helwetykozydu	, 2,6
helwetykozyl	, 1,4

Niektóre wytworzone sposobem według wynalazku azotany wykazują obok inotropowego działania jednocześnie działanie rozkurczowe, jak to uwidacznia tablica 2.

Tablica 2

Działanie rozkurczowe badane na świnkach morskich Ileum

Związek	ED ₅₀ [μ mole]
3 β -azotan digitoksegeniny	1,0
3 β , 12 β -dwuazotan digitoksegeniny	10,0
dwuazotan cymarolu	10,0
cymarol	0,092 (zwiększenie napięcia mięśnia sercowego)

Azotany nasercowych steroidów stanowią ponadto produkty pośrednie do dalszych syntez, ponieważ zestryfikowane grupy hydroksylowe są w dalszych reakcjach chronione, zaś po przeprowadzeniu tych reakcji grupy ochraniające mogą być usunięte.

Przykład I. Pięcioazotan digoksyny. 100 mg digoksyny (0,128 mola) rozpuszcza się w 2 ml CH_2Cl_2 i oziębia mieszaniną lodu i soli (temperatura łaźni -16°C). Następnie dodaje się podobnie oziębioną mieszaninę 0,4 ml bezwodnika kwasu octowego, (4,2 mmola) i 0,14 ml absolutnego kwasu azotowego (3,3 mmola), co odpowiada 25 molom kwasu azotowego na 1 mol digoksyny. Po upływie 1 minuty dodaje się 25 ml wody, ekstrahuje chloroformem i ekstrakt chloroformowy przemywa aż do odczynu obojętnego. Po odparowaniu chloroformu pozostaje 125 mg pięcioazotanu digoksyny, który oczyszcza się chromatograficznie na żelu krzemionkowym i przekrystalizowuje się z pirydyny-metanolu-wody. Temperatura topnienia produktu $154,5-156,5^\circ\text{C}$. Wydajność 85 mg pięcioazotanu digoksyny.

W podobny sposób zamiast chlorku metylenu można stosować inne chlorowcowęgłowodory, a zamiast bezwodnika kwasu octowego aceton, acetonitryl lub nitrobenzen. Przy stosowaniu acetonitrylu reakcję prowadzi się w temperaturze -10°C w ciągu około 20 minut, a przy bezwodniku kwasu octowego – w ciągu około 1 godziny.

Po zobojętnieniu roztworu przez przemywanie można utworzone azotany wytrącić, zwłaszcza za pomocą wysokowrzących rozpuszczalników, a również przez dodanie węglowodorów, np. heptanu.

Przykład II. Czteroazotan digitoksyny. 1,0 g digitoksyny rozpuszcza się w mieszaninie 20 ml chloroformu i 4,0 ml bezwodnika kwasu octowego i mieszając w temperaturze 20°C dodaje 1,4 ml absolutnego kwasu azotowego. Po 3 minutach dodaje się 15 ml metanolu i roztwór zobojętnia nasycionym roztworem wodorowęglanu sodowego. Fazę organiczną oddziela się i wodną fazę wytrząsa dwukrotnie z 10 ml chloroformu. Połączone ekstrakty chloroformowe przemywa się wodą i odparowuje do sucha. Jako pozostałość otrzymuje się 1,1 g surowego czteroazotanu digitoksyny. Surowy produkt rozdziela się za pomocą preparatywnej chromatografii warstwowej na żelu krzemionkowym w chlorku metylenu-metanolu 193:7. Jako główny składnik po przekrystalizowaniu z metanolu-chlorku metylenu otrzymuje się 0,47 g czteroazotanu digitoksyny o temperaturze topnienia $168-170^\circ\text{C}$.

Przykład III. 2', 3', 4'-trójazotan proscilarydyny. 4,05 g proscilarydyny miesza się z 160 ml chlorku metylenu i otrzymaną zawiesinę traktuje w temperaturze -40°C oziębioną mieszaniną 20,2 ml bezwodnika kwasu octowego i 7,0 ml absolutnego kwasu azotowego. Po dalszym mieszaniu w temperaturze -40°C proscilarydyna przechodzi do roztworu w ciągu 30 minut. Po dalszych 10 minutach dodaje się 25 ml metanolu, zadaje 0,8 litra wody i mocno wytrząsa. Organiczną fazę oddziela się, wodną fazę ekstrahuje 2x40 ml chlorku metylenu i połączone fazy organiczne przemywa się wodnym roztworem wodorowęglanu sodowego do odczynu obojętnego. Po odparowaniu chlorku metylenu, mazistą pozostałość przekrystalizowuje się z metanolu-wody, otrzymując 5,4 g surowego produktu.

5 g surowego produktu rozdziela się na drodze chromatografii kolumnowej na 500g żelu krzemionkowego za pomocą mieszaniny chlorku metylenu i metanolu na 3 frakcje. Z drugiej frakcji otrzymuje się po przekrystalizowaniu z metanolu 1,7 g czystego 2',3',4'-trójazotanu proscilarydyny, o temperaturze topnienia $193-196^\circ\text{C}$, a z trzeciej frakcji po przekrystalizowaniu z chlorku metylenu-metanolu uzyskuje się 0,51 g 3',4'-dwuazotanu proscilarydyny, topniejącej z objawami rozkładu w temperaturze 200°C .

Przykład IV. Pięcioazotan digitoksyny. Roztwór 100 mg digoksyny (0,128 mmola) w 2 ml chlorku metylenu dodaje się do oziębionej lodem mieszaniny 1540 mg $(\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ i 4,5 ml (47 mmola) bezwodnika kwasu octowego i pozostawia w ciągu 10 minut w temperaturze 0°C . Postępując dalej jak w przykładzie I otrzymuje się 115 mg surowego pięcioazotanu digitoksyny, co stanowi 90% wydajności teoretycznej.

Przykład V. Mono-, dwu-, trój- i czteroazotan digoksyny. 100 mg digoksyny (0,128 mmola) poddaje się w reakcji z 0,16 ml bezwodnika kwasu octowego i 0,056 ml (1,3 mmola) absolutnego kwasu azotowego, analogicznie jak w przykładzie I. Produkt reakcji zawiera oprócz małej ilości produktu wyjściowego mono-, dwu-, trój- i czteroazotan digoksyny.

Związki te charakteryzują się ruchliwością jonów w stosunku do pięcioazotanu digoksyny (układ: ester kwasu octowego) eter n-propylowy 75:75 na żelu krzemionkowym.

Rf pięcioazotan digoksyny = 100/	Azotan digoksyny = 22
	dwuazotan digoksyny = 34
	trójazotan digoksyny = 52
	czteroazotan digoksyny = 63

Tablica 3

Związek	Wzór sumaryczny	Ciężar cząsteczkowy	Zawartość N %		Temperatura topnienia °C	R _f w układzie 1)	Wytwarzanie według przykładu
			wyli czono	znaleziono			
1	2	3	4.	5	6	7	
3β-monoazotan	C ₂₃ H ₃₃ NO ₆	419,5	3,34	3,26	191–194 (CH ₃ OH)	0,94 eter n-propylo- wy (THF ⁴) 2 : 1	IV
3β,16β-dwuazotan gitoksygeniny	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₉	480,5	5,83	5,69	218–219 (CH ₃ OH– CH ₂ Cl ₂)	0,90 eter n-propylo- wy/THF 2 : 1	IV
3β,16ε-dwuazotan gitoksygeniny	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₉	480,5	5,83	5,63	206–207 (CH ₃ OH–H ₂ O)	0,57 THF-heptan 1 : 3	I
3β,12β-dwuazotan digoksygeniny	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₉	480,5	5,83	5,65	182–183 (CH ₃ OH–H ₂ O)	0,93 eter n-propylo- wy THF 2 : 1	IV
3β-monoazotan strofantydyna	C ₂₃ H ₃₁ NO ₈	449,5	3,11	3,03	207–209 (CH ₃ OH– CH ₂ Cl ₂ /1 : 1	0,15 THF-heptan	I
1β,3β,11ε,19-cztero- azotan uabageniny	C ₂₃ H ₃₀ N ₄ O ₁₆	618,5	9,05	9,05	195 (CH ₃ OH– CH ₂ Cl ₂)	0,33 THF-heptan 1 : 1	I
3', 9', 15', 16'- czteroazotan digitoksyny	C ₄₁ H ₆₀ N ₄ O ₂₁	945,0	5,93	5,72	168–170 (CH ₃ OH– CH ₂ Cl ₂)	0,80 THF-heptan 1 : 3	II
16β, 3', 9', 15', 16'- pięcioazotan gito- ksyny	C ₄₁ H ₅₉ N ₅ O ₂₄	1006,0	6,96	7,04	193–195 (CH ₃ OH– H ₂ O)	0,38 THF-heptan 1 : 4	I
3', 9', 15', 16'- czteroazotan gito- ksyny	C ₄₁ H ₆₀ N ₄ O ₂₂	961,0	5,83	–	–	77 ester kwasu octo- wego-eter-n-pro- pylowy 2) 3 : 1	VI
16α, 3', 9', 15', 16'- pięcioazotan gito- ksyny	C ₄₁ H ₅₉ N ₅ O ₂₄	1006,0	6,96	6,84	170–171 (CH ₃ OH– H ₂ O)	0,59 THF-heptan 1 : 3	I
12β, 3', 9', 15', 16'- pięcioazotan digo- ksyny	C ₄₁ H ₅₉ N ₅ O ₂₄	1006,0	6,96	6,67	154,5–156,5 (CH ₃ OH– H ₂ O)	0,87 THF-heptan 1 : 2	I i IV
12β, 3', 9'-trójazo- tan digoksyny	C ₄₁ H ₆₁ N ₃ O ₂₀	916,0	4,58	4,15	146–150 (CH ₃ OH– H ₂ O)	0,80 THF-heptan 1 : 1	VI
mono-, dwu-, trój-, czteroazotan digo- ksyny	–	–	–	–	–	22, 34, 52, 63 ester kwasu octo- wego (eter propylo- wy ₃) 3 : 1	V
B-heptoazotan lana- tozydu	C ₄₉ H ₆₉ N ₇ O ₃₄	1300,2	7,54	–	134–138 (CH ₃ OH– H ₂ O)	0,94 eter n-propylo- wy-THF 2 : 1	I i IV
C-heptaazotan lana- tozydu	C ₄₉ H ₆₉ N ₇ O ₃₄	1300,2	7,54	7,13	169–171 (CH ₃ OH– H ₂ O)	0,34 THF-heptan 1 : 3	I
4'-monoazotan cyma- ryny	C ₃₀ H ₄₃ NO ₁₁	593,6	2,36	2,21	123–125 (CH ₃ OH– CH ₂ Cl ₂)	0,46 THF-heptan 1 : 1	I

1	2	3	4	5	6	7	
4', 19-dwuazotan cy- marolu	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₁₃	640,7	4,37	4,10	107–109 (CH ₃ OH- H ₂ O)	0,47 THF-heptan 1 : 2	I
3', 4'-dwuazotan hel- wetykozydu	C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₁₃	624,6	4,48	4,16	205–208 (CH ₃ OH)	0,50 THF-heptan 1 : 1	I i II
4'-monoazotan hel- wetykozydu	C ₂₉ H ₄₁ NO ₁₁	579,6	2,42	2,47	224–225 (CH ₃ OH)	0,10 THF-heptan 1 : 1	I i II
3', 4', 19-trójazo- tan helwetykozydu	C ₂₉ H ₄₁ N ₃ O ₁₅	671,6	6,26	6,33	159–160 (CH ₃ OH-H ₂ O)	0,23 THF-heptan 1 : 3	I i II
2', 3', 4'-trójazo- tan proscilarydyny	C ₃₀ H ₃₉ N ₃ O ₁₄	665,7	6,31	6,21	193–196 (CH ₃ OH)	0,57 THF-heptan 1 : 5	III
3', 4'-dwuazotan pro- scilarydyny	C ₃₀ H ₄₀ N ₂ O ₁₂	620,7	4,51	4,26	od 200°C rozkład (CH ₃ OH-THF-heptan 1 : 5 CH ₂ Ol ₂ /	0,17	III

¹) Chromatografia na bibule Schleicher/Schüll 2043 b mgI; nasyconej formanidem

²) DC na żelu krzemionkowym G w odniesieniu do R_{pięcio}azotanu gitoksyny = 100

³) DC na żelu krzemionkowym G w odniesieniu do R_{pięcio}azotanu digoksyny = 100

⁴) czterowodorofuran.

Przykład VI. 3', 9', 15', 16'-czteroazotan gitoksyny. 100 ml gitoksyny rozpuszcza się w 0,25 ml pirydyny i dodaje roztwór 88 mg trójtlenku boru w pirydynie (1 mol gitoksyny na 10 moli trójtlenku boru) i pozostawia na okres 1 godziny w temperaturze 20°C, po czym odparowuje do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w 2 ml CH₂Cl₂ i przerabia dalej jak w przykładzie I. Otrzymany 3', 9', 15', 16'-czteroazotan gitoksyny wykazuje w cienkowarstwowej chromatografii stosunkową ruchliwość jonów, o R_f pięcioazotan gitoksyny=100) = 77. Układ: ester kwasu octowego /eter n-propylowy 75:25 na żelu krzemionkowym.

Postępując w sposób analogiczny do opisanych w przykładach I–IV otrzymuje się związki podane w tablicy 3.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania azotanów nasercowych steroidów, **znamienny tym**, że nasercowe steroidy i steroidoglikozydy typu kardenolidu i bufadienolidu poddaje reakcji z 1-50-krotnym, korzystnie 5-30-krotnym nadmiarem molowym, zadanego 1-50-krotną ilością molową bezwodnika kwasu octowego, absolutnego kwasu azotowego lub jego soli, w temperaturze od -30°C do 50°C, zwłaszcza od -20°C do 25°C, korzystnie w obecności organicznego rozpuszczalnika, w ciągu do 5 godzin, korzystnie w okresie nie dłuższym od 1 godziny.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako organiczny rozpuszczalnik stosuje się chlorowane węglowodory, korzystnie chlorek metylenu lub chloroform, aceton, acetonitryl lub nitrobenzen.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do roztworu lub zawiesiny steroidu lub steroidoglikozydu dodaje się kolejno najpierw bezwodnik kwasu octowego, a następnie absolutny kwas azotowy.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się absolutny kwas azotowy utworzony dopiero w mieszaninie reakcyjnej przez dodanie nadmiaru bezwodnika kwasu octowego.

