



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr -----

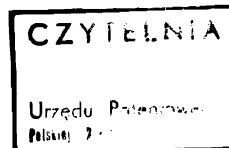
Int. Cl.³ C07J 19/00

Zgłoszono: 83 07 13 (P. 242982)

Pierwszeństwo -----

Zgłoszenie ogłoszono: 84 05 21

Opis patentowy opublikowano: 1986 09 30



Twórcy wynalazku: Janina Żurkowska, Mieczysława Darmetko

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób enzymatycznej hydrolizy lanatozydów A, B i C oraz ich dezacetylowych pochodnych

Wynalazek dotyczy sposobu enzymatycznej hydrolizy lanatozydów A, B i C oraz ich dezacetylowych pochodnych. W wyniku tej hydrolizy otrzymuje się digitoksynę, gitoksynę i digoksynę oraz ich acetylowe pochodne. W leczeniu stosowane są jako glikozydy nasercowe digitoksyna, alfa-acetylodigitoksyna, digoksyna i beta-digoksyna oraz syntetyczna pochodna gitoksyny w formie pięcioacetylogitoksyny.

Znany sposób otrzymywania wyżej wymienionych związków polega na hydrolitycznym oddzieleniu glukozy, czwartego końcowego cukru w łańcuchu bocznym lanatozydów lub dezacetylolanatozydów A, B, C w taki sposób, aby nie została naruszona struktura pozostałych dezoksy-cukrów. Jest to możliwe jedynie na drodze enzymatycznej z zastosowaniem enzymu typu betaglukozydazy. Enzymy swoście działające na wiązania betaglikozydowe między cząsteczką glukozy a trzecią z kolei digitoksozą lub acetylodigitoksozą łańcucha cukrowego występują w wielu źródłach biologicznych pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. Izolowano je również z pleśni, drobnoustrojów czy rzeźniczych odpadów poubojowych. Enzymy te wykazują przeważnie zróżnicowaną swoistość enzymatyczną w stosunku do lanatozydów i dezacetylolanatozydów A, B i C. Już poprzednio stwierdzono (Żukrowska J., Adamiec A., Herba Polonica **20** (3) 270-283 /1975/), że ekstrahowana ze słodu jęczmiennego i oczyszczona frakcja białek enzymatycznych poprzez selektywne wytrącanie siarczanem amonu i sączenie molekularne na kolumnie sephadeksydowej nie wykazuje swoistości hydrolitycznej w stosunku do lanatozydów A, B i C, natomiast hydrolizuje odacetylowane pochodne tych związków czyli dezacetylolanatozydy A, B i C.

Istotę wynalazku stanowi enzymatyczna hydroliza lanatozydów A, B i C oraz ich dezacetylowych pochodnych za pomocą enzymów wyizolowanych z ziarna słodu jęczmiennego lub jęczmienia. Słód jęczmienny lub jęczmień ekstrahuje się wodą, buforem fosforanowym bądź octanowym. Ekstrakt zawiera beta-glukozydazę obok szeregu białek enzymatycznych i bez oczyszczania jest stosowany do hydrolizy. Wykazuje on aktywność nie tylko w stosunku do dezacetylowych pochodnych lanatozydów A, B i C lecz również do glikozydów natywnych czyli lanatozydów A, B i C. W wyniku hydrolizy dezacetylowych pochodnych lanatozydów A, B i C otrzymuje się odpowiednio digitoksynę, gitoksynę i digoksynę, a hydroliza lanatozydów A, B i C daje odpowiednie pochodne

acetylowe digitoksyny, gitoksyny i digoksyny, w postaci izomeru alfa, które można ewentualnie zhydrolizować w środowisku alkali, korzystnie za pomocą amoniaku w roztworze metanowym.

Według wynalazku hydrolizę enzymatyczną przeprowadza się w środowisku buforu fosforanowego lub octanowego o pH 5–6, korzystnie o pH 5,2–5,5, do którego dodaje się ekstrakt słodowy lub jęczmienny oraz alkohol, zwłaszcza metanol. Stężenie alkoholu, od 10% do 20% korzystnie 12–15%, jest tak dobrane, aby białka enzymatyczne nie ulegały denaturacji i wytrąceniu w postaci nieaktywnego osadu i wkraplane alkoholowe roztwory odpowiednich lanatozydów A, B i C lub ich dezacetylowych pochodnych pozostawały w roztworze hydrolizatów. Hydrolizę prowadzi się w temperaturze 35–45°C, korzystnie 38–42°C, w czasie 16–30 godzin, korzystnie 18–24 godziny.

W sposobie według wynalazku warunki reakcji hydrolizy zostały tak dobrane, że reakcja przebiega z wysoką wydajnością rzędu 80–90%. Glikozydy poddawane hydrolizie nie wytrącają się po wprowadzeniu do hydrolizatów, natomiast w toku reakcji produkty hydrolizy wydzielają się częściowo w postaci krystalicznego osadu, który można łatwo oddzielić w znany sposób. Osiąga się przez to wydatne zmniejszenie ilości rozpuszczalników organicznych takich jak benzen, trójchloroetylen lub chloroform, koniecznych do selektywnej ekstrakcji produktów hydrolizy.

Przykład I. Do 850 ml wody destylowanej wlewa się 25 ml buforu fosforanowego o pH 5,2–5,5 a następnie 30–40 ml ekstraktu enzymatycznego, przygotowanego przez wytrząśnięcie w ciągu 1 godziny 50 g drobno zmielonego słoju jęczmiennego lub jęczmienia ze 100 ml wody lub wody z buforem fosforanowym lub octanowym o pH 5,0–5,5 (o składzie 80 ml wody i 20 ml buforu) i odsączeniu przez karbowany sączonek bibuły filtracyjnej. Doprowadza się pH otrzymanej mieszaniny do pH 5,2–5,5, ogrzewa do temperatury 38–42°C, dodaje 5 ml toluenu, umieszcza w termostacie i rozpoczyna wkraplanie roztworu odpowiedniego dezacetylanatozydu A, B lub C, otrzymanego przez rozpuszczenie 1 g substancji w 100 ml metanolu. Roztwór metanowy glikozydu wkrapla się przez 30 minut przy wolnym mieszaniu, a następnie pozostawia w termostacie w temperaturze 38–42°C na okres 18–24 godzin wolno mieszając. Po tym okresie czasu hydrolizat ochładza się do temperatury pokojowej, a następnie sączy pod próżnią. Przesącz (A) pozostawia do dalszego przerobu, a odsączony osad rozpuszcza się w 150–200 ml metanolu, miesza przez 1 godzinę, odsącza od wytrąconych metanolem resztek białek enzymatycznych i przemywa dokładnie 10–15 ml metanolu. Osad odrzuca się, a przesącz zagęszcza do 50 ml (I).

Przesącz (A) zagęszcza się do 100–150 ml przy temperaturze 40°C i zawarte w nim glikozydy ekstrahuje trzykrotnie używając każdorazowo po 50 ml chloroformu wysyconego wodą destylowaną. Połączone ekstrakty chloroformowe przemywa się jeden raz 30 ml wody destylowanej wysyconej chloroformem i zagęszcza do sucha, a utworzony osad rozpuszcza w 30–50 ml metanolu i łączy z roztworem metanowym (I), dodaje 0,5 g węgla aktywnego, miesza i sączy pod próżnią, przemywając węgiel 10–15 ml metanolu. Otrzymany klarowny i bezbarwny roztwór metanowy zagęszcza się, otrzymując digitoksynę, gitoksynę lub digoksynę w postaci krystalicznej z wydajnością 80–90%.

Przykład II. Postępuje się jak w przykładzie I z tym, że do przygotowanej mieszaniny hydrolizatu wkrapla się metanowy roztwór odpowiedniego dezacetylanatozydu A, B, C przygotowany w następujący sposób: 1 g odpowiedniego lanatozydu A, B lub C rozpuszcza się w 50 ml metanolu, dodaje 10 ml wody i 10 ml 25% roztworu amoniaku, hydrolizuje w ciągu 40–48 godzin w temperaturze 40°C, zakwasza za pomocą lodowatego kwasu octowego do pH 5–5,5 i rozcieńcza dodając 50 ml metanolu.

Przykład III. Do 1250 ml buforu octanowego o pH 5,2–5,5 dodaje się 50 ml metanolu i 5 ml toluenu. Następnie wlewa się 125 ml ekstraktu enzymatycznego otrzymanego przez wytrząśnięcie z wodą 150 g drobno zmielonego słoju jęczmiennego lub jęczmienia. Uzyskaną mieszaninę o pH 5,2–5,5 ogrzewa się do temperatury 38–40°C, umieszcza w termostacie i rozpoczyna wkraplanie roztworu 1 g odpowiedniego lanatozydu A, B lub C rozpuszczonego w 100 ml metanolu. Wkraplanie trwa około 30 minut. Hydrolizę prowadzi się 18–24 godziny przy wolnym mieszaniu. Po zakończeniu procesu hydrolizat ochładza się za pomocą wody z lodem, a następnie sączy.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób enzymatycznej hydrolizy lanatozydów A, B i C oraz ich dezacetylowych pochodnych za pomocą enzymu typu beta-glukozydazy otrzymanego ze słoju jęczmiennego lub jęczmie-

nia, **znamienny tym**, że sód jęczmienny lub jęczmień poddaje się ekstrakcji wodą, buforem fosforanowym bądź octanowym i otrzymany ekstrakt dodaje się do buforowego roztworu wodno-alkoholowego o pH 5–6 i zawartości alkoholu 10–20%, a następnie przy temperaturze 35–45°C wkrapla się alkoholowy roztwór odpowiedniego lanatozydu A, B i C lub jego dezacetylową pochodną i prowadzi się hydrolizę przy stałej temperaturze 35–45°C w czasie 16–30 godzin, następnie wyodrębnia się produkty hydrolizy w znany sposób, przy czym alfa-acetylowe pochodne digitoksyny, gitoksyny i digoksyny poddaje się ewentualnie hydrolizie alkalicznej korzystnie za pomocą metanolowego roztworu amoniaku.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sód jęczmienny lub jęczmień wytrząsa się z wodą lub z buforem fosforanowym bądź octanowym o pH 5–5,5.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrolizę prowadzi się w środowisku buforu fosforanowego bądź octanowego, korzystnie przy pH 5,2–5,5 z dodatkiem alkoholu, zwłaszcza metanolu, korzystnie do stężenia 12–15%.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hydrolizę prowadzi się korzystnie w temperaturze 38–42°C w czasie 18–24 godziny.