

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

197288

(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 31 03 77

(21) (PV 2151-77)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 02 04 76

(P 26 14 393.1)

Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 31 07 79

(45) Vydáno 15 02 83

(51) Int. Cl.³

C 07 H 15/12

C 07 H 1/08

(72)

Autor vynálezu

FROMMER WERNER, JUNGE BODO,
KEUP UWE, MÜLLER LUTZ, PULS WALTER a
SCHMIDT DELF, WUPPERTAL (NSR)

(73)

Majitel patentu

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, LEVERKUSEN (NSR)

(54) Způsob výroby aminocukrových derivátů

1

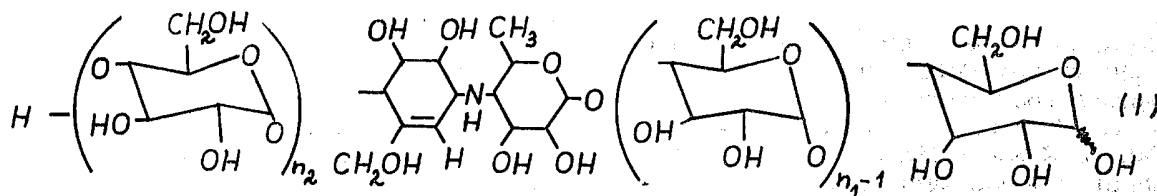
Vynález se týká způsobu výroby nových aminocukrových derivátů. Dále se zde poukazuje na farmaceutickou směs, které obsahují tyto aminocukrové deriváty jako účinné látky, stejně jako na řízení výměny uhlohydrátů u lidí a zvířat potlačováním glykosid-hydroláz pomocí těchto aminocukrů, jako například pro ošetřování Diabetes, otýlosti a zvýšeného množství tuku v krvi.

Je známo, že řada mikroorganismů třídy

2

Aktinomycet potlačuje tvorbu glykosid-hydroláz, přičemž se vždy podle podmínek při pěstování získávají inhibitory s účinkem potlačujícím převážně amylázu nebo sacharázu (viz například americké patentové spisy 3 876 766, 3 855 066 a 3 879 546).

Nyní byl objeven způsob výroby nových aminocukrových derivátů obecného vzorce I



kde

n_1 znamená číslo 1 až 7 a

n_2 znamená číslo 1 až 7, přičemž součet n_1 a n_2 má hodnotu 2 až 8.

Vždy podle hodnoty součtu n_1+n_2 mají tyto aminocukrové deriváty převážně účinek potlačující působení amylázy nebo sacharázy. Tak aminocukrové deriváty, které smě-

řují k potlačování působení amylázy jsou deriváty s $n_1+n_2=4$ až 8, zvláště s $n_1+n_2=4$ a 5. Aminocukrové deriváty, které směřují k potlačování působení sacharázy jsou deriváty s $n_1+n_2=1$ až 3, účelně s $n_1+n_2=2$ až 3 a s výhodou s $n_1=2$.

Kromě toho bylo objeveno, že se s překvapením dosahuje in vivo silného potlačení

odbourávání škrobů aminocukrovými deriváty s $n_1 + n_2 = 1$ až 3, zvláště s $n_1 = 2$.

Způsob výroby aminocukrových derivátů podle vynálezu se provádí tím, že se kultivují kmeny SE 50 (ATCC 31 042), SB 18 (ATCC 31 041), SE 82 (ATCC 31 045), SE 50/13 (ATCC 31 043) a SE 50/110 (ATCC 31 044) rodu *Actinoplanaceae* aerob v pevném nebo tekutém živném prostředí, které obsahuje zdroj uhlíku a dusíku, stejně jako soli a prostředek zabráňující pění, při teplotě 15 až 45 °C a pH 5,0 až 8,5 a požadované sloučeniny se o sobě známým způsobem izolují.

V úvahu pro výrobu aminocukrových derivátů podle vynálezu tedy přicházejí kmeny SE 50 (ATCC 31 042, CBS 961.70), SB 18 (ATCC 31 041, CBS 957.70) a SE 82 (ATCC 31 045, CBS 615.71), stejně jako mutanty nebo varianty těchto kmenů. Zvláště dobře se přitom osvědčují s ohledem na výtěžek získaných aminocukrových derivátů kmeny SE 50/13 (ATCC 31 043, CBS 614.71) a SE 50/110 (ATCC 31 044, CBS 674.73). Oba kmeny odpovídají svým popisem co nejvíce původnímu kmeni SE 50 (ATCC 31 042, CBS 971.60), ze kterého byly získány přirozenou selekcí bez vyvolávání změn.

Pro pěstování mikroorganismů se používají pevné nebo tekuté, zvláště však tekuté, vodné živné půdy, které obsahují v obvyklé koncentraci známé výchozí látky pro uhlík a dusík, soli a prostředky zabráňující pění v běžné koncentraci.

Jako výchozí látky pro uhlík slouží převážně uhlohydráty, zvláště škroby, maltóza, glukóza, stejně jako komplexní směsi látek, jako například běžně komerčně dostupný sladový extrakt.

Jako výchozí látky pro dusík přicházejí v úvahu o sobě známé komplexní směsi látek, jako například kaseinový hydrolyzát, kvasnicový extrakt, pepton, rybí moučka, masový extrakt, dále také směsi těchto výchozích látek, stejně jako jednotlivé aminokyseliny a/nebo amoniové soli jako zdroje dusíku.

Pěstování mikroorganismů se provádí aerobně v provzdušňovaných třepaných kulturách nebo v obvyklých nádobách pro kultury.

Druh koncentrace uhlíkaté látky používané jako výchozí látka ovlivňuje ve spojitosti s kmenem používaným pro fermentaci druh převážně vznikajícího konečného produktu.

Tak například v živných roztocích, které obsahují 2 hmotnostní % škrobů, tvoří se především sloučenina s $n_1 + n_2 = 4$ až 8. Pro výrobu těchto aminocukrových derivátů s $n_1 + n_2 = 4$ až 8 je zvláště vhodný kmen SE 50/13 (CBS 614.71).

Pokud živný roztok obsahuje dostatek glukózy (asi 3,5 hmotnostního %) postačí však již 0,1 až 3 hmotnostní % škrobů, aby se získaly převážně směsi aminocukrových derivátů s $n_1 + n_2 = 4$ až 8. Všechny takto získané aminocukrové deriváty se mohou

používat jako výchozí sloučeniny pro výrobu nižších homologů postupem spočívajícím v chemické nebo enzymatické hydrolýze.

Aminocukrové deriváty s $n_1 + n_2 = 1$ až 4 se v převážném měřítku získají, když se pracuje v živném roztoku prostém škrobem. Zvláště příznivě přitom působí přídavek maltózy k živnému roztoku. Tak se získají například při přidání maltózy a za použití kmeny SE 50 (CBS 961.70) směsi aminocukrových derivátů s převážně $n_1 + n_2 = 2$ až 3. Tvorby aminocukrů s $n_1 = 1$ se zvláště dosahuje tím, že se jako výchozího materiálu pro uhlík použije pouze glukózy. Zde je třeba dát pozor na to, že při přebytku glukózy při déletrvajících fermentaci vznikají také vysokomolekulární aminocukrové deriváty.

Pokud se použije živný roztok, který neobsahuje glukózu a k němu se jako výhradní výchozí látka pro uhlík přidá maltóza, získá se převážně aminocukr s $n_1 + n_2 = 2$. V technicky výhodné formě provedení se může přitom čistá maltóza nahradit levnějším produktem, jako například malzinem, to je přírodním komerčně dostupným sladovým extraktem.

Jako zvláště vhodný pro výrobu aminocukrových derivátů, které převážně obsahují deriváty s $n_1 + n_2 = 1$ až 3, se osvědčil kmen SE 50/110 (CBS 674.73).

Tento kmen poskytuje výtěžky nízkomolekulárních aminocukrových derivátů, které jsou asi dvojnásobné, než jaké se získají s kmenem SE 50/13 (CBS 614.71).

Pěstování mikroorganismů se provádí obecně při inkubačních teplotách mezi 15 a 45 °C, s výhodou mezi 24 a 32 °C. Při použití kmenů SE 50 (CBS 961.70) nebo SE 50/13 (CBS 614.71) se tak získají aminocukrové deriváty s $n_1 + n_2 = 4$ až 8 při vyšší teplotě, například 28 °C, zatímco při nižší teplotě, například 24 °C, příkladně kmeny SE 50 (CBS 961.70) a SE 50/110 (CBS 674.73) tvoří v převážném rozsahu aminocukrové deriváty s $n_1 + n_2 = 1$ až 3.

Doba pěstování obecně činí 1 až 8 dnů, s výhodou 2 až 6 dnů. Delší doba pěstování, zvláště v souvislosti s přebytkem uhlohydrátů v živném prostředí podporuje tvorbu aminocukrových derivátů s vyššími hodnotami $n_1 + n_2$.

Hodnota pH v prostředí kultury se mění obecně od 5,0 do 8,5, přičemž hodnoty pH 6,0 až 7,0 jsou výhodné.

Konec fermentace se určuje obecně stanovením potlačovacího účinku v enzymatickém inhibičním testu, stejně jako stanovení složení fermentačního prostředí chromatografií na tenké vrstvě.

Oddělování a izolace jednotlivých aminocukrových derivátů podle vynálezu vychází buď z mikrobiologických kultivačních bujů nebo z hydrolyzátů, popřípadě inkubačních směsí, ve kterých se provede enzymatické a/nebo mikrobiologické odbourávání vysokomolekulárních aminocukrových derivátů.

Zpracování se provádí různými způsoby vždy podle hodnoty pro $n_1 + n_2$. Tak se postupuje při výrobě čistých aminocukrových derivátů s $n_1 + n_2 = 1$ až 4 obecně tím způsobem, že se popřípadě po předchozím oddělení mycel příslušný kultivační bujón nebo hydrolyzát zpracuje s aktivním uhlím při neutrálním pH a potom se aminocukrové deriváty vázané na aktivním uhlí desorbují zpracováním aktivního uhlí s vodným alkoholem nebo acetonem, s výhodou s 50 až 80 % acetonem. Zvláště kvantitativně desorpce se přitom odpaří při hodnotě pH v kyselé rozmezí 1,5 až 4, s výhodou 2 až 3.

V případě, že oddělené kultivační bujóny nebo hydrolyzáty jsou velmi tmavě zbarvené, ukazuje se jako výhodné, aby se před shora popsaným zpracováním s aktivním uhlím při kyselé pH nejprve zpracovaly s aktivním uhlím nebo absorpčními pryskyřicemi, jako komerčně dostupným Laxapolem Ca 9221 [zrnění 0,35 mm, výrobce firma Bayer AG] při hodnotě pH 2 až 6, s výhodou 2 až 3 a tak se dosáhlo odbarvení. Aktivní uhlí váže přitom v kyselé oblasti s výhodou pouze barvivo a nikoli aminocukrové deriváty.

Oddělování jednotlivých aminocukrových derivátů podle vynálezu z desorbátu aktivního uhlí získaného jak shora popsáno se potom provádí obecně tím způsobem, že se tento desorbát vede přes o sobě známý kyselý katex, jako například Dowex 50 W (vyrábí firma Dow Chemicals) [pH 1 až 8 s výhodou 2 až 4; při nižší iontové síle odpovídající vodivost $<10 \text{ mS.cm}^{-1}$, s výhodou $<2 \text{ mS.cm}^{-1}$]. Jednotlivé aminocukrové deriváty se přitom váží na katex. Na takové katexy lze vázat zvláště výhodně přitom aminocukrové deriváty z acetonového roztoku (50 až 80 % acetonu, pH 1 až 5, s výhodou 2 až 4).

Selektivní desorpce aminocukrových derivátů podle vynálezu z katexů se potom provádí obecně za použití vodných kyselin nebo bází jako elučních činidel, přičemž se s výhodou používá amoniaku nebo kyseliny chlorovodíkové o koncentracích 0,01 až 1 val/litr.

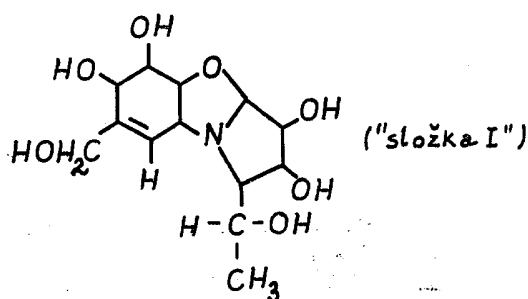
Z jednotlivých desorbátů se potom příslušný aminocukrový derivát dostane po neutralizaci desorbátu slabě kyselým nebo bazickým ionexem nebo po odstranění báze, popřípadě kyseliny ve vakuu, v případě těkavých bází nebo kyselin, po odpaření roztoku lyofilizací nebo vysrážením organickými rozpouštědly, s výhodou acetonem.

Dále je možné nízkomolekulární aminocukrové deriváty odvozené od inertních sacharidů oddělovat chromatografií na ionexu na bázi celulózy, s výhodou na bázi fosfor-celulózy (vyrábí firma Serva, Heidelberg). Jako eluční činidlo se přitom používají pufr, s výhodou fosfátový pufr, o malé iontové síle s výhodou 2 až 100 mM, zvláště 5 až 10 mM, v rozmezí pH 2,5 až 8, s výhodou 5 až 6. Předpokladem pro účinné frakcionování je přitom pokud možno nepatrný obsah so-

li v přípravcích určených k frakcionování, jejichž barevné látky méně ruší.

K výrobě čistých jednotlivých aminocukrových derivátů se chromatografují potom předčistěné preparáty přes vhodné molekulární síto, například gel Bio-Gel P-2 (vyrábí firma Bio-Rad, Mnichov), a frakce eluátu se podrobí chromatografii na tenké vrstvě. Frakce, které obsahují čisté sloučeniny podle vynálezu se spojí, opět chromatografují a potom po odpaření lyofilizují nebo pomocí organického rozpouštědla sráží, jako je popsáno shora.

Všechny aminocukrové deriváty se vyznačují tím, že při kyselé totální hydrolýze tvoří „složku I“ vzorce $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{N}$, stejně jako glukózu. Pro „složku I“ byl odvozen tento strukturní vzorec:



Počáteční člen řady aminocukrových derivátů podle tohoto vynálezu má jednu glukózovou jednotku. Tato sloučenina je bezbarvá amorfni látka s dobrou rozpustností ve vodě, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, methanolu a horkém ethanolu. Při chromatografii na tenké vrstvě za použití ethylacetátu, methanolu a vody v poměru 10:6:4 má tato sloučenina hodnotu R_f 0,46 (maltóza = 0,50 a glukóza = 0,65) na silikagelové fólii F 1500 [Schleicher a Schüll] a 0,47 (maltóza = 0,54 a glukóza = 0,66) na silikagelových deskách F 254 [Merck, Darmstadt].

Při použití postřikového činidla dusičnan stříbrný a hydroxid sodný se dostane hnědočerné vybarvení při teplotě místnosti nebo po nepatrném zahřívání.

Sloučenina se silyluje společně s D-glukózou jako standardy ve směsi z pyridinu (1), trimethylchlorsilanu (0,5) a N-methyltrimethylsilyltrifluoracetamidu (1) a potom se podrobí chromatografii ve skleněném sloupci dlouhém 1,8 m naplněném 3 % SE 30 silikonového elastomeru (Packard) na chromosorbu WAW.

Vstříkovací teplota a teplota detektoru činí 300 °C. Teplota pece je 220 °C, isothermně až do eluování α - a β -D-glukózových standardů. Potom se teplota zvyšuje rychlostí 15 °C za minutu až na 300 °C.

Používá se plamenový ionizační detektor, přičemž se zavádí dusík jako nosný plyn rychlostí 40 ml/minutu, vzduch jako spalný

plyn rychlostí 80 ml/minutu a vodík rychlostí 20 ml/minutu. Sloučenina má retenční dobu 16 až 17 minut (α -D-glukóza = 3 minuty, β -D-glukóza = 4 minuty a sacharóza = 12 až 13 minut).

Odpařením methanolického roztoku získaný nekrytalizující vzorek sloučeniny se roz-

pustí ve vodě a stanoví se specifická optická rotace $[\alpha]_D = +134,3^\circ$.

NMR spektrum v CD_3OD při 220 MHz je znázorněno na obr. 1 (první souřadnicová osa = δ ppm).

Převládající znaky NMR-spektra jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

v ppm	Multiplicita	Relativní intenzita
1,3	dublet, $J = 6,5$ Hz	3 H
2,3	„triplet“, J_1 a J_2 8 až 10 Hz	1 H
3,15	„triplet“, J_1 a J_2 7 až 9 Hz	1 H
3,3–3,9	signály nejsou jednotlivě přiřaditelné	12 H
4,13	AB-systém, $J = 12$ Hz	2 H
4,48 a	dublet, $J = 7$ Hz } dublet, $J = 2,5$ Hz }	1 H
5,1		
4,9	singlet	11 H
		za deuterium vyměněné protony
5,0	dublet, $J = 2$ až 3 Hz (těžko rozeznatelné)	1 H
5,8	dublet, $J = 3$ až 4 Hz (těžko rozeznatelné)	1 H
		33 H

Když se tato sloučenina nechá reagovat ve směsi acetanhydridu a pyridinu v poměru 1:1 při teplotě místnosti, získá se dekaacetylový derivát (molekulová hmotnost: 903). NMR-spektrum dekaacetylového derivátu je znázorněno na obr. 2.

Pokud se reakce provádí v ethylacetátu a acetanhydridu v poměru 1:1 s katalytickým množstvím kyseliny sírové, tak lze dokázat hmotovou spektroskopii vedle dekaacetylového derivátu také vznik undeacetylového derivátu (molekulová hmotnost: 945).

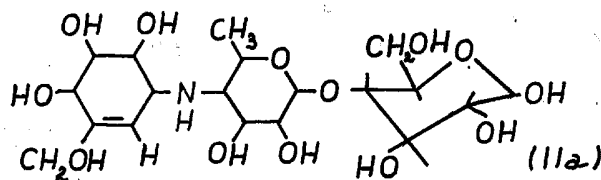
Hmotové spektrum dekaacetylového derivátu má molekulový pík při 903 (2,5 % relativní intenzita) a základní pík při 843. Důležité dílčí píky ve shora uvedeném rozsahu hmotového spektra jsou 844 (55 % relativní intenzita [dále r. I.])

784 (36 % r. I.),
783 (34 % r. I.),
759 (34 % r. I.),
556 (36 % r. I.),
496 (37 % r. I.) a
436 (29 % r. I.).

Methylace s CH_3I/NaH v dimethylsulfoxidu podle Hakomoriho poskytuje jako hlavní produkt dekamethylový derivát a v malém množství také undekamethylový derivát.

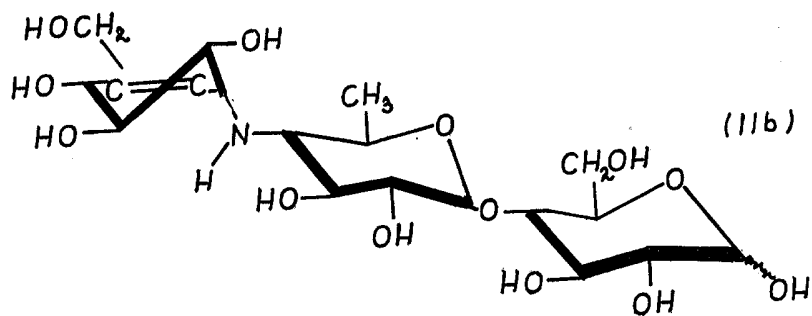
Molekulové spektrum má molekulový pík při 623 (6,1 % relativní intenzita) a základní pík při 535. Druhý molekulový pík se pozoroval při 637 (0, % relativní intenzita).

Spektroskopická data a chemické vlastnosti ukazují, že sloučenina má strukturu vzorce IIa



NMR-spektrum zvláště ukazuje, že sloučenině obecného vzorce IIa přísluší struktura O-4,6-bisdesoxy-4-[1-S-(1,4,6/5)-4,5,6-tri-

hydroxy-3-hydroxymethylcyklohex-2-en-1-ylamino]- α -D-glukopyranosyl-(1-4)-D-glukopyranózy souhlasná se vzorcem IIb



Následující člen řady ($n_1 + n_2 = 2$) má celkové složení $C_{25}H_{43}O_{18}N$ a je dobře ve vodě rozpustný produkt. Při chromatografii na tenké vrstvě má hodnotu R_f 0,35 na silikagelové fólii F 1500 a 0,33 na silikagelových deskách F 254 při použití shora popsaných systémů.

Optická rotace ve vodě $[\alpha]_D$ je $+167^\circ$.

NMR-spektrum v D_2O při 220 MHz ukazuje obr. 3 a ^{13}C -NMR-spektrum obr. 4.

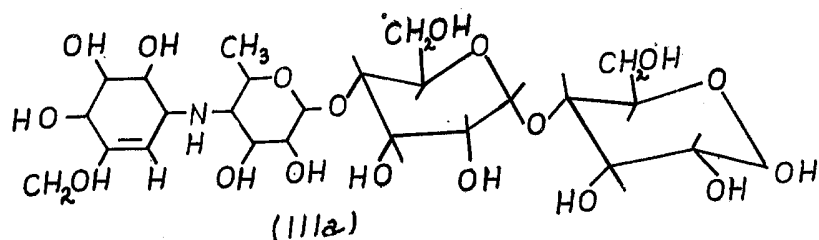
Methylace jako je popsaná shora poskytuje třináctkrát methylovanou sloučeninu a v malém množství také čtrnáctkrát methylovaný produkt.

Hmotové spektrum methylovaného produktu má molekulový pík 827 (1,5 % relativní intenzita) a odpovídá sumárnímu vzorci $C_{38}H_{69}NO_{18}$. Druhý molekulový pík s 0,1 % relativní intenzitou je při 841.

Důležité dílčí píky jsou:

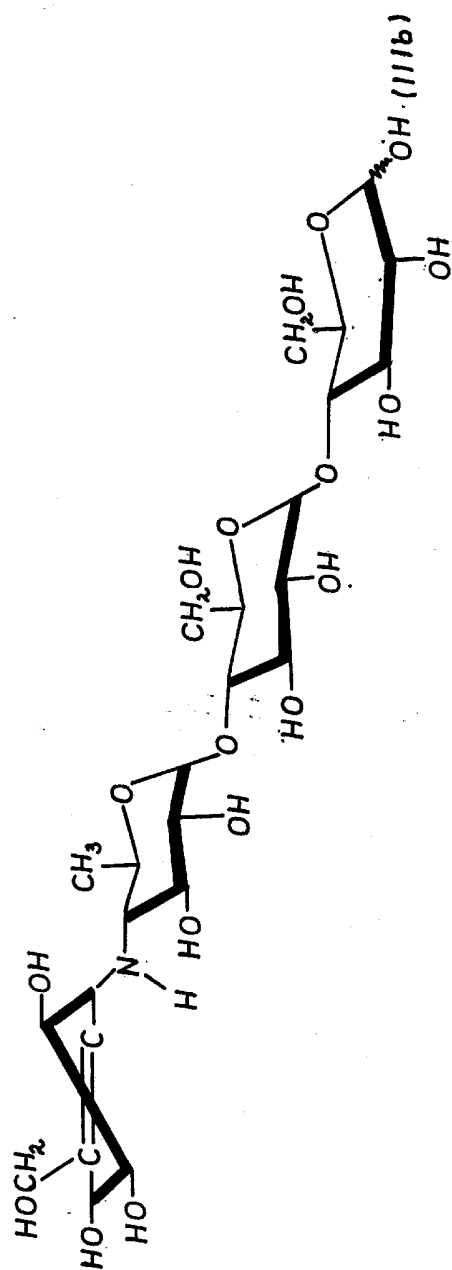
739	(27 % r. I.)
592	(3,7 % r. I.)
535	(30 % r. I.)
388	(9 % r. I.)
386	(13 % r. I.)
284	(13 % r. I.)
187	(12 % r. I.)
171	(40 % r. I.)
101	(34 % r. I.)
88	(25 % r. I.)
75	základní pík.

Z chemických a spektroskopických vlastností vyplývá, že sloučenina má strukturu vzorce IIIa:



příčemž tomuto druhému členu řady aminocukrových derivátů podle vynálezu přísluší struktur O-4,6-bisdesoxy-4-[1S-(1,4,5,6/5)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxymethylcyklo-

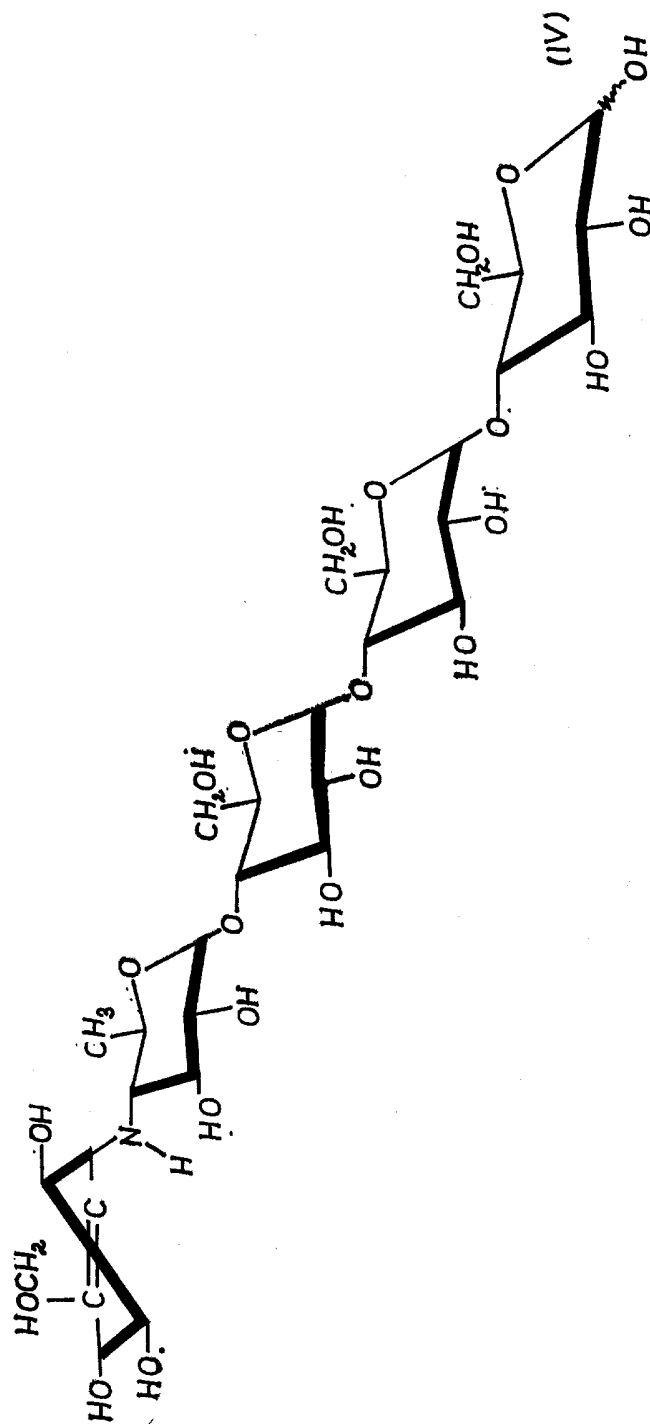
hex-2-en-1-ylamino]- α -D-glykopyranosyl-
-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-
glukopyranózy souhlasí se vzorcem IIIb



Nejbližší vyšší člen řady ($n_1 + n_2 = 3$) se dostane ve dvou isomerních formách, přičemž jedna z obou isomerních forem vniká převážně.

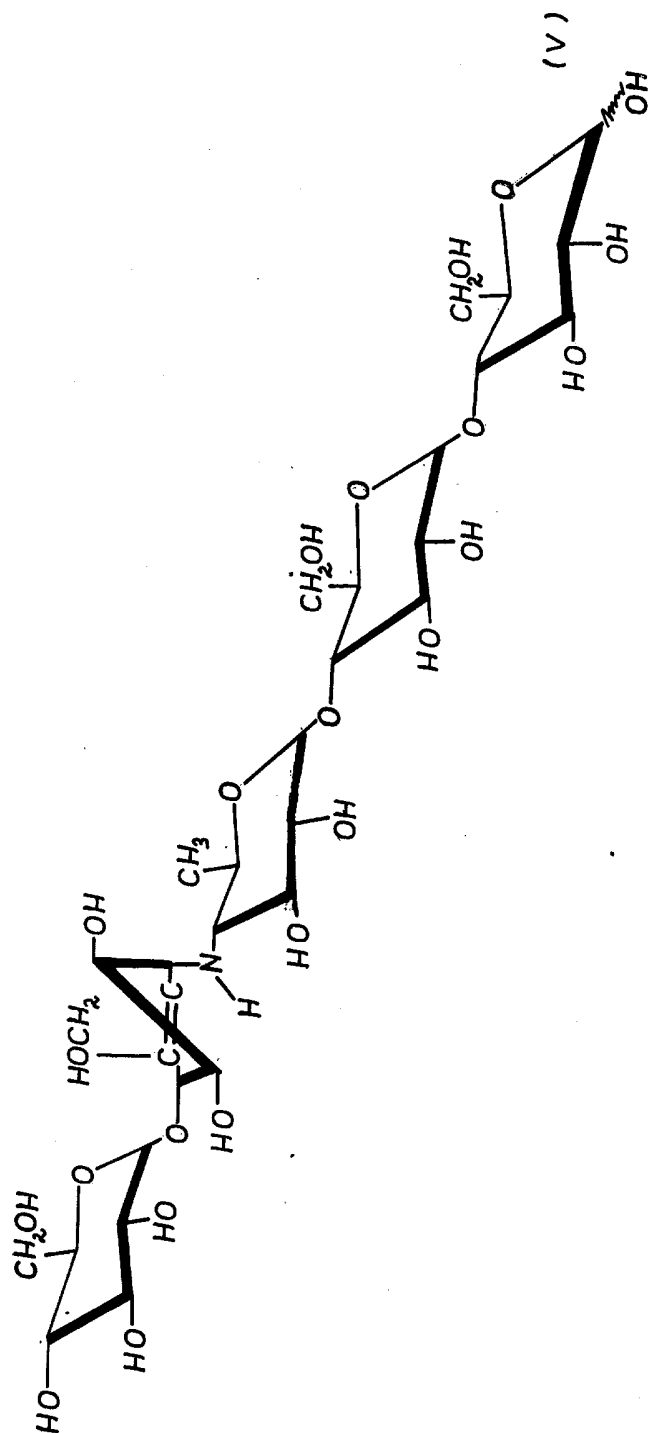
Při kyselé částečné hydrolýze se mohou obě isomerní sloučeniny štěpit na první člen řady ($n_1 + n_2 = 1$) a glukózu v molárním poměru 1:2.

Produkt přítomný v menším množství je sloučenina O-/4,6-bisdesoxy-4-[1 S-(1,4,6/S)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxymethylcyklohex-2-en-1-ylamino]- α -D-glukopyranosyl/-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopyranóza souhlasící se vzorcem IV:



Isomerní produkt přítomný ve větším množství je sloučenina O-/4,6-bisdesoxy-4-[1 S-(1,4,6/5)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxymethyl-4-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-cyklo-

hex-2-en-1-ylamino]- α -D-glukopyranosyl-/-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopyranóza souhlasící se vzorcem V:

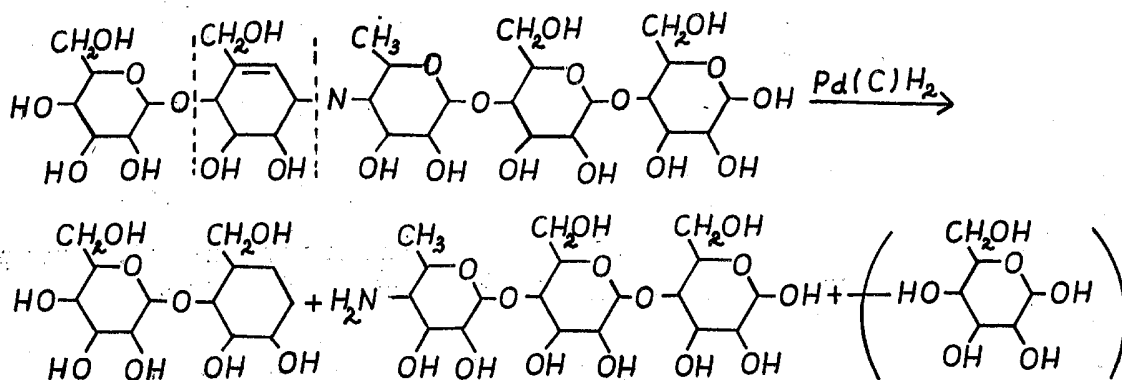


Tyto isomery mají na deskách F 1500 za použití n-butanolu, ethanolu a vody v poměru 50:30:20 hodnotu $R_{\text{glukóza}}$ 0,41 až 0,46. Přítomnost isomerů se strukturou vyznačenou vzorcem V lze dokázat, když se produkt hydrogenačního odbourávání (paládium na aktivním uhlí) analyzuje. Patří těmto produktům odbourávání:

3-hydroxymethyl-4,5,6-trihydroxy-[4-O- α -D-glukopyranosyl-(1)]-cyklohexan,
O-[4-amino-4,6-bisdesoxy- α -D-gluko-

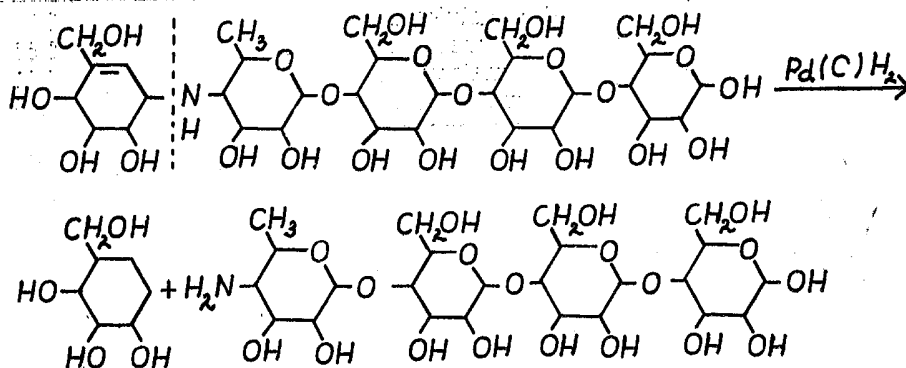
pyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4))-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopyranóza a glukóza.

Protože při tomto odbourávání C—N-vazba v alkylové poloze se štěpí a hydrogenuje vodíkem je jasné, že tato sloučenina, která je vzhledem ke sloučenině vzorce IV isomerní, se přemění na sloučeninu vzorce III a nebo vzorce IIIb, je však přítomna další glukopyranosyllová skupina v poloze 4 cyklohexenového kruhu.



Přítomnost isomerů struktury vyznačené ve vzorci IV lze dokázat tvorbou validatolu a O-[4-amino-4,6-bisdesoxy- α -D-glukopyranosyl-

-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukopyranózy.

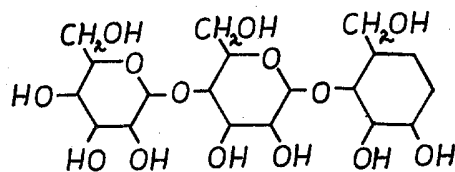


Při dalších zkouškách se isomery s $n_1 + n_2 = 3$ podle známých metod methylojí, hydrolyzují a redukují natriumborhydridem, acetylují a analyzují plynovou chromatografií. Zatímco sloučenina obecného vzorce IV poskytuje pouze 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol, poskytuje sloučenina obecného vzorce V 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol a 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol v molárním poměru 2:1. Isomery s $n_1 + n_2 = 3$ vzorce IV a vzorce V se nedegradují β -amylázou.

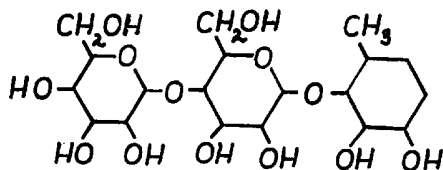
Isomerní sloučeniny vzorců IV a V se oddělují chromatografií na kyselé iontoměničové pryskyřici s 0,025 N kyselinou chlorovodíkovou, jako elučním činidlem.

Produkt s $n_1 + n_2 = 4$ se hydrogenuje na paládium na uhlí, jako katalyzátoru. Ne-

bazický produkt hydrogenolýzy se oddělí přes kyselé ionex a rozdělí preparativní chromatografií na tenké vrstvě. Po acylaci se identifikují hmotovou spektrometrií tyto dva pseudotrisacharidy jako hlavní produkty odbourávání:



(jako dekaacetát s molekulovým píkem při $m/e = 906$) a



(jako nonaacetát s molekulovým píkem při $m/e = 848$).

Značně převládající hlavní součást složky 5 je tudíž isomer odpovídající vzorci VI s glukosidicky na cyklitolovém zbytku vázanou maltózovou jednotkou.

Tato struktura je také jako výsledkem odbourávání s β -amylázou, při kterém převážná část složky s $n_1 + n_2 = 4$ se degraduje na sloučeninu vzorce III a maltózu.

Složka s $n_1 + n_2 = 5$ se chová při odbourávání s β -amylázou takto:

Přibližně 90 % se degraduje na sloučeninu vzorce V a odpovídající množství na maltózu, z čehož vyplývá, že isomerní maltózová jednotka vázaná glykosidicky na cyklitolový zbytek je hlavní složkou produktu; asi 10 % se β -amylázou nedegraduje.

Vyšší členové řady, kteří obsahují 4 až 8 glukózových jednotek o molekulové hmotnosti 969 až 1617 nemohou tolik potlačovat působení sacharózy.

Chromatografie na tenké vrstvě při použití n-butanolu, ethanolu a vody v poměru 50:30:20 poskytuje na silikagelových deskách F 1500 hodnotu $R_{glukoza}$:

0,30 až 0,34	4 glukózové jednotky,
0,21 až 0,23	5 glukózových jednotek,
0,14 až 0,16	6 glukózových jednotek a
0,09 až 0,11	7 glukózových jednotek.

Jako u nižších členů této řady poskytuje totální kyselá hydrolyza, „složku I“ a glukózu a navzájem odlišných molárních poměrů, totiž 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 a 1:8 (přičemž procentuální obsah glukózy je 74,4 %, 79,7 %, 83,3 %, 86,5 % a 89,1 %).

Při chromatografii na tenké vrstvě při použití silikagelových desek F 1500 s n-butanolem, ethanolem a vodou v poměru 45:35:20, jako rozpouštědla se pozorují při trojnásobném vyvíjení tyto hodnoty R_f :

Poměr glukóza:složka I	standard	Hodnota R_f
	glukóza	0,77
	maltóza	0,65
	maltotrióza	0,51
	maltotetraóza	0,39
4:1	maltopentaóza	0,27
		0,25
5:1	maltohexaóza	0,21
		0,18
6:1	maltoheptaóza	0,15
		0,13
7:1	maltooktaóza	0,11
		0,09
8:1		0,07

Při shora popsané katalytické hydrogenaci se rovněž ukazuje, že jednotlivé, avšak nikoli všechny glukózové jednotky těchto vyšších členů jsou v poloze 4 cyklohexenové skupiny.

Protože tyto sloučeniny obsahují lineární oligoglukosidové řetězce s vazbou 1-4, mohou být používány jako substráty pro určitá enzymatická odbourávání uhlohydrátů. Rozsah enzymů je zřejmě omezen na takové enzymy, které se v podstatě nepotlačují těmito sloučeninami.

Bakteriální α -amylázy a α -amylázy druhu hub se mohou používat k odbourávání oligoglukosidového řetězce, který obsahuje 3 nebo více glukosidové jednotky na nízkomolekulární sloučeniny a inertní sacharidové fragmenty, jako například maltózu a maltotriózu. Tento způsob odbourávání je použitelný u sloučenin s $n_1 + n_2 \geq 3$ a představu-

je další důkaz pro α , 1-4 vazbu. Sloučeniny podle vynálezu se 4 až 7 glukosidovými jednotkami jsou částečně odbouratelné β -amylázou. Protože β -amyláza odštěpuje maltózové jednotky od neredukovatelného konce glukózového řetězce s α , 1-4 vazbami, poskytuje pečlivá analýza produktu β -amylázového odbourávání cenné informace o každém z oligoglukosidových substituentů vázaných v poloze 4 cyklohexenového kruhu, zvláště podle své délky řetězce a počtu „glukóz“ v řetězci vázaných na bisdesoxyglukóze, to znamená na redukovatelném konci sloučeniny. Sloučeniny obsahující 4,5,6,7 nebo 8 glukózových jednotek nelze však zcela odbourat β -amylázou. Odolnost části sloučenin je nutno zřejmě připsat strukturálním podmínkám pro napadení β -amylázou.

Výsledky β -amylázového odbourávání se mohou takto shrnout:

Počet glukózových jednotek ve výchozím materiálu	Počet glukózových jednotek v produktu odbourávání	Odstranění maltózové jednotky
4	4 2	0 1
5	5 3	0 1
6	6 4 2	0 1 2
7	7 5 3	0 1 2
8	8 6 4 2	0 1 2 3

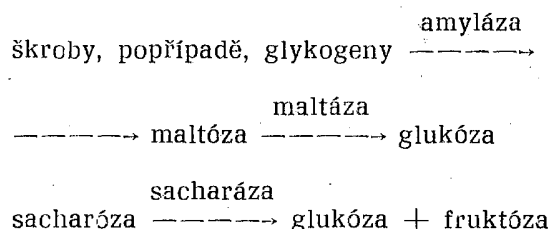
Popřípadě se část výchozího materiálu opět získává.

S ohledem na β -amylolytické odbourávání je zapotřebí ještě jednou zdůraznit, že β -amyláza umožňuje odstranit pouze maltózové jednotky a to pouze z neredukovatelného konce oligosacharidů. Je nutno se vyvarovat domněnky, že kterákoli teorie vede k nějakému omezení. Ačkoli přesná struktura těchto vyšších sloučenin není zcela osvětlena je podle shora uvedených zjištění nutno vyvodit, že sloučeninám se 4, 5, 6, 7 a 8 glukózovými jednotkami přísluší deriváty nižších sloučenin vzorce IIIa, které obsahují řetězec se 2, 3, 4, 5 a 6 glukózovými jednotkami, které jsou navzájem spojeny α , 1-4 vazbami, přičemž oligosacharidový řetězec v α -konformaci je vázán s polohou 4 cyklohexenového kruhu.

Methylace sloučenin methyljodidem a natriumhydridem v dimethylsulfoxidu, totální hydrolýza, příprava derivátů a konečně plynová chromatografická analýza poskytují 2,3,6-trimethylglukózový derivát, takže glukózové jednotky jsou nutně 1-4 vázány v připojené lineární struktuře.

Jeden ze dvou methylačních produktů, který v závislosti na methylační sloučenině je přítomen v různém měřítku nebo za určitých okolností vůbec není přítomen, je 2,3,4,6-tetramethylový derivát. Výskyt tohoto derivátu a jeho molární poměr k trimethylovému derivátu je závislý na substituentech vázaných na cyklohexenovém kruhu.

Je známo, že u zvířat a lidí po požití potravin a nápojů obsahujících uhlohydráty (například obilných a bramborových škrobů, ovoce, ovocných šťáv, piva, čokolády) dochází ke zvýšení množství cukru v krvi, které v důsledku rychlého odbourávání uhlohydrátů glykosidů — hydrolázami (například amylázami ze slin a slinivky břišní, maltázy, sacharózy) probíhá podle tohoto schématu:



Tato hyperglykémie je u diabetiků zvláště silná a nepřetržitě se projevuje. U otlých jedinců způsobuje hyperglykémie v důsledku potravy často zvláště silné vylučování insulinu, která z jedné strany vede ke zvýšené tvorbě tuku a snížení jeho odbourávání. Ve spojitosti s takovým zvýšením množství cukru v krvi dochází u lidí s dobrou látkovou výměnou a u otlých osob v důsledku vylučování insulinu často ke snížení hladiny cukru v krvi. Je známo, že jak hypoglykémie, tak také v žaludku přítomná kaše podporuje tvorbu žaludeční šťávy, která sama napomáhá nebo podporuje vznik zánětu žaludku, žaludečního vředu nebo zánětu dvanáctníku.

Nyní bylo objeveno, že aminocukrové deriváty podle vynálezu značně snižují potravinou vyvolanou hyperglykémii, hyperinsulinemii a hypoglykémii a zvláště také reaktivní po jídle vzniklé zvýšení množství cukru v krvi.

Dále je známo, že v ústní dutině se štěpí uhlohydráty, zvláště sacharóza působením mikroorganismů a tím se podporuje tvorba zubního kazu.

Aminocukrové deriváty podle vynálezu se mohou používat pro zamezení, popřípadě snížení takovýchto zubních kazů.

Amylázový test in vitro

Amylázová inhibitorová jednotka (1 AIE) je definována jako množství inhibitoru, kte-

ré potlačí dvě amylázové jednotky na 50 procent.

Amylázová jednotka [AE] je množství enzymu, které za jednu minutu za dále uvedených podmínek testování štěpí 1 μ ekvivalent glukosidických vazeb na škroby. μ val štěpitelných vazeb se kolorimetricky stanoví jako μ val vytvořených redukovatelných cukrů s kyselinou dinitrosalicylovou a udává pomocí maltózové kalibrační křivky jako μ val ekvivalentů maltózy. Při provádění testu se 0,1 ml roztoku amylázy (20 až 22 AE/ml) smíchá s 0 až 10 μ g inhibitoru nebo 0 až 20 μ l testovaného roztoku v 0,4 ml 0,02 M natriumglycerofosfátového pufru a 0,001 M chloridu vápenatého CaCl_2 [pH 6,9] a asi 10 až 20 minut ekvilibruje na vodní lázni při 35 °C. Potom se 5 minut inkubuje s 0,5 ml 1% škrobového roztoku (rozpuštěný škrob čís. 1252 firmy Merck Darmstadt) zahřátého na 35 °C při 35 °C a potom se přidá 1 ml činidla na bázi kyseliny dinitrosalicylové (podle P. Bernfelda v Colowick-Kaplan, Meth. Enzymol., sv. 1, str. 149). Pro vyvínutí barviva se ná sada zahřívá 5 minut na vroucí vodní lázni, potom ochladí a přidá 10 ml destilované vody. Extinkce při 540 nm se měří proti odpovídající určené slepé hodnotě bez amylázy. Pro vyhodnocení se odečte z předem sestrojené amylázové kalibrační křivky účinek amylázy ještě po přidání inhibitoru a z toho se vypočte procentuální potlačení nasazené amylázy. Procentuální potlačení se vyjadřuje jako funkce kvocientu

$$\frac{\mu\text{g inhibitoru} +}{\text{AE} ++},$$

kde

+ je vztaženo na suchou látku a

++ je v neinhibované ná sadě stejné série,

bod 50% potlačení se odečte z křivky a opět přepočítá na AIE/mg inhibitoru.

Sacharázový test in vitro

Sacharázová inhibitorová jednotka (1 SIE) je definována jako množství inhibitoru, které potlačí dvě sacharázové jednotky na 50 %. Sacharázová jednotka (SE) je množství enzymu, které za jednu minutu za dále uvedených podmínek testování štěpí 1 μ mol sacharózy na glukózu a fruktózu. Počet μ molů vzniklé glukózy se stanovuje kvantitativně pomocí glukosoxidázové reakce za podmínek, při kterých již nedochází k dalšímu štěpení sacharózy působením sacharázy. K provedení testu se 0,05 ml roztoku sacharázy¹⁾ upraveného na 0,12 SE smíchá s 0 až 20 μ g inhibitoru nebo 0 až 20 μ l roztoku určeného k testování a doplní s 0,1 M natriummaleinátovým pufr [pH 6,0] na 0,1 ml. 10 minut se ekvilibruje při 35 °C a potom se přidá 0,1 ml

0,05 M roztoku sacharózy předem zahřátého na 35 °C v 0,1 M natriummaleinátovém pufru [pH 6,0]. Inkubuje se 20 minut při 35 °C a reakce sacharázy se zastaví přidáním 1 ml glukosoxidázového reakčního činidla²⁾ a inkubuje dalších 30 minut při 35 °C. Potom se přidá 1 ml 50% kyseliny sírové a při 545 nm měří proti odpovídající slepé hodnotě. Pro vyhodnocení se vypočte procentuální potlačení působení použité sacharázy a z bodu 50% potlačení pomocí glukózové kalibrační křivky vypočítá SIE/g, popřípadě SIE/litr.

1) Rozpuštěná sacharáza ze sliznice tenkého střeva vepře podle B. Borgströma, A. Dahlquist, Acta Chem. Scand. 12, [1958], str. 1997, s 0,1 natriummaleinátovým pufr [pH 6,0], zředěno na odpovídající obsah SE.

2) Glukosoxidázové reakční činidlo se vyrobí rozpuštěním 2 mg glukosoxidázy (firma Boehringer, stupeň čistoty I) ve 100 ml 0,565 M tris-HCl pufru [pH 7,0] a potom se přidá 1 ml roztoku detergentu (2 g tritonu X 100 + 8 g 95% ethanolu p. a.), 1 ml dianisidinového roztoku (260 mg dihydrochloridu o-dianisidinu ve 20 ml vody) a 0,5 ml 0,1% vodného roztoku peroxidázy (firma Boehringer, lyofilizát, stupně čistoty II).

Maltázový test

Maltázová inhibitorová jednotka (1 MIE) je definována jako množství inhibitoru, které potlačí dvě maltázové jednotky na 50 %. Maltázová jednotka (ME) je množství enzymu, které za jednu minutu za dále uvedených podmínek testování štěpí 1 μ mol maltózy na 2 μ moly glukózy. Počet μ molů vzniklé glukózy se stanovuje kvantitativně pomocí glukosoxidázové reakce za podmínek, při kterých již nedochází k dalšímu štěpení maltózy maltázou. K provedení testu se smíchá 0,05 ml maltázového roztoku¹⁾ upraveného na 0,060 až 0,070 ME s 0 až 20 μ g inhibitoru nebo 0 až 20 μ l roztoku určeného k testování a doplní 0,1 M natriummaleinátovým pufr [pH 6,0] na 0,1 ml. Ekvilibruje se 10 minut při 35 °C a potom se přidá 0,1 ml 0,05 M maltázového roztoku předem zahřátého na 35 °C v 0,1 M natriummaleinátovém pufru [pH 6,0]. Inkubuje se 20 minut při 35 °C a reakce maltázy ukončí přidávkou 1 ml glukosoxidázového reakčního činidla²⁾ a inkubuje dalších 30 minut při 35 °C. Potom se přidá 1 ml 50% kyseliny sírové a při 545 nm měří proti odpovídající slepé hodnotě.

K vyhodnocení se vypočte procentuální potlačení působení použité maltázy a z bodu 50% potlačení pomocí glukózové kalibrační křivky vypočítá MIE/g, popřípadě MIE/litr.

1) Rozpuštěná maltóza ze sliznice tenkého střeva vepře podle B. Borgströma, A. Dahl-

quista, Acta Chem. Scand. **12**, (1958) str. 1997, s 0,1 M natriummaleinátovým pufrem [pH 6,0], zředěno na odpovídající obsah ME.

2) Příprava glukosoxidázového reakčního činidla: jako je popsáno u sacharázového testu v poznámce 2).

Výsledky testu potlačujících účinek enzymů in vitro pro jednotlivé aminocukrové deriváty podle vynálezu jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Vzorec	Počet glukózových jednotek	Potlačení účinku α -amylázy AIE/g	Potlačení účinku sacharázy SIE/g	Potlačení účinku maltázy MIE/g
II B	1	300 000	30 000	5 000
III B	2	300 000	68 000	15 000
V	3	1 400 000	21 000	5 000
	4 až 6	17 500 000	8 500	—
	5 až 7	30 000 000	2 500	—

Jak je z tabulky zřejmé, silně stoupá účinek potlačování při pokusech in vitro proti pankreas- α -amyláze s přibývajícím molekulovou hmotností; tak vykazují sloučeniny s 5 až 7 glukózovými jednotkami stonásobně silnější potlačení účinku enzymu in vitro než sloučenina s 1 nebo 2 jednotkami. Potlačení účinku sacharázy je nejsilnější u derivátu se dvěma jednotkami, derivát s 1 glukózovou jednotkou potlačuje již jen z polovice tak silně a vyšší člen má další pokles specifického účinku potlačení působení sacharázy.

In vivo probíhá účinnost potlačování působení sacharázy přibližně souběžně jako u specificky zjištěného účinku potlačování. Naproti tomu s překvapením bylo objeveno, že při testu škrobového zatěžkávání in vivo pro sloučeniny s 1, 2 nebo 3 glukózovými jednotkami v porovnání s potlačováním působení amylázy in vitro se zjistí desetkrát až čtyřicetkrát silnější účinek.

Pro dosažení hyperglykémie způsobené potravou a hyperinsulinémie dostávají skupiny vždy o 6 nenakrmených krysách:

a) 2,5 g sacharózy

b) 2,5 g maltózy nebo

c) 1 g vařeného škrobu

per os ve vodném roztoku nebo jako suspenze. Šest jiných krys obdrží jmenované uhlohydráty ve stejném množství a dodatečně inhibitor glukosid-hydrolázy v uvedeném dávkování.

Kromě toho 6 dalších krys dostane odpovídající množství roztoku soli.

Krevní glukóza a sérum inzulin se měří v krátkých časových intervalech v krvi z retroorbitální Venenplexus. Stanovení krevní glukózy se provádí v autoanalyzátoru

(Technicon [®] podle Hoffmana: J. biol. Chem. **120**, 51 (1937) nebo enzymaticky s glukosoxidázou a o-dianisidinhydrochloridem), stanovení seruminsulinu se provádí metodou, kterou popsal Hales a Randle [Biochem. J. **88**, 137 (1963)].

Výsledky potlačování působení sacharázy in vivo (zpracování sacharózy) u hladových krys uvádí následující tabulka 3:

Tabulka 3

Vzorec	n	Dávka (SIE)	Krevní glukóza v mg % (střední hodnota ± odch.)		
			15 minut	30 minut	45 minut
IIb	1	roztok soli	69 ± 5,2	84 ± 3,9	91 ± 5,9
		sacharóza (kontrola)	117 ± 11	135 ± 8,1	152 ± 18
		sacharóza + 50 SIE	105 ± 11	123 ± 5,2*	128 ± 11*
		sacharóza + 100 SIE	89 ± 6,5***	111 ± 4,1***	116 ± 3,9***
IIIb	2	sacharóza + 200 SIE	72 ± 4,6***	95 ± 9,1***	104 ± 9,6***
		roztok soli	55 ± 4,5	92 ± 8,5	95 ± 6,4
		sacharóza (kontrola)	113 ± 9,9	126 ± 20	127 ± 14
		sacharóza + 25 SIE	71 ± 3,7***	100 ± 7,3*	107 ± 2,4**
V	3	sacharóza + 100 SIE	58 ± 5,9***	92 ± 4,0**	98 ± 5,0***
		roztok soli	66 ± 4,6	73 ± 4,3	76 ± 3,9
		sacharóza (kontrola)	122 ± 6,6	125 ± 16,0	128 ± 14,8
		sacharóza + 25 SIE	88 ± 11,4**	101 ± 12,0*	104 ± 7,4**
—	4 až 6	sacharóza + 50 SIE	91 ± 9,4**	106 ± 7,0*	94 ± 9,0***
		sacharóza + 100 SIE	81 ± 7,2**	90 ± 8,0***	97 ± 1,6***
		roztok soli	58 ± 2,9	49 ± 3,3	54 ± 4,8
		sacharóza (kontrola)	107 ± 11	121 ± 6,0	132 ± 16
—	5 až 7	sacharóza + 25 SIE	109 ± 6,4	105 ± 10**	112 ± 9,1*
		sacharóza + 50 SIE	103 ± 4,1	107 ± 15	102 ± 7,7**
		sacharóza + 100 SIE	85 ± 8,1**	94 ± 9,9**	95 ± 8,5***
		roztok soli	58 ± 2,9	49 ± 3,3	54 ± 4,8
—		sacharóza (kontrola)	107 ± 11	121 ± 6,0	132 ± 16
		sacharóza + 75 SIE	102 ± 11	108 ± 9,6*	109 ± 7,5**
		sacharóza + 150 SIE	92 ± 7,0*	100 ± 8,3***	109 ± 3,7***
		sacharóza + 300 SIE	95 ± 8,1*	84 ± 8,7**	93 ± 9,0***

* = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině se sacharózou = < 0,05

** = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině se sacharózou = < 0,01

*** = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině se sacharózou = < 0,001

Jak je ze shora uvedených údajů zřejmé probíhá paralelně in vivo účinek potlačování působení sacharázy s in vitro nalezeným účinkem potlačování. Tak stoupá hodnota

ED₅₀, zatímco jednotka potlačování působení sacharázy na každý mg klesá. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4

Vzorec	Glukózové jednotky	Potlačení působení sacharázy	
		in vitro (SIE/mg)	in vivo (ED ₅₀ mg/kg)
IIb	(1)	30	3,0
IIIb	(2)	68	0,21
V	(3)	21	2,65
—	(4 až 6)	8,5	~15,30
—	(5 až 7)	2,5	~52,00

In vivo potlačení odbourávání škrobů působením sloučenin vzorců IIb, IIIb a V je s překvapením mnohem vyšší než by se dalo očekávat na základě in vitro nalezených údajů pro potlačování působení amylázy a

tedy neodpovídá očekávanému vzoru. V dále uvedené tabulce 5 uvádějí se jako shora zprůměrované údaje in vivo pro nenakrmené krysy po podání škrobů.

Tabulka 5

Vzorec Glukózo-
vé jednot-
ky Dávka (AIE)

Krevní glukóza v mg % (střední hodnota ± odch.)

		5 minut	10 minut	15 minut	20 minut	30 minut	45 minut
I Ib	1	roztok soli	74 ± 3,0	82 ± 9,4	71 ± 11	76 ± 5,4	90 ± 9,2
		škrob (kontrola)	135 ± 13	146 ± 4,8	151 ± 9,5	148 ± 18	156 ± 19
		škrob + 75 AIE	130 ± 6,9	128 ± 5,4**	143 ± 11	125 ± 11*	132 ± 18*
		škrob + 150 AIE	116 ± 9,0*	128 ± 5,8**	127 ± 4,8**	115 ± 5,2*	137 ± 5,2**
		škrob + 300 AIE	106 ± 1,8**	110 ± 8,9**	111 ± 2,1**	108 ± 5,3*	121 ± 7,2*
III b	2	roztok soli	68 ± 3,9	83 ± 5,3	75 ± 8,7	91 ± 5,2	84 ± 1,5
		škrob (kontrola)	120 ± 7,7	132 ± 11	140 ± 12	135 ± 5,0	128 ± 14
		škrob + 150 AIE	105 ± 4,2**	120 ± 6,0*	124 ± 7,0*	134 ± 6,1	125 ± 5,2
		škrob + 300 AIE	97 ± 2,7**	105 ± 10*	118 ± 6,7**	119 ± 9,9**	130 ± 5,9
		škrob + 600 AIE	80 ± 8,8**	94 ± 6,9**	91 ± 16**	103 ± 9,2**	102 ± 4,2**
V	3	škrob + 1200 AIE	84 ± 7,7**	88 ± 7,4**	97 ± 5,2**	97 ± 5,0**	100 ± 4,3**
		roztok soli	75 ± 7,9	57 ± 3,7	78 ± 9,6	82 ± 6,5	70 ± 6,9
		škrob (kontrola)	133 ± 12	127 ± 9,3	152 ± 15	156 ± 15	124 ± 7,7
		škrob + 750 AIE	107 ± 5,0**	117 ± 8,7*	121 ± 12**	126 ± 11**	114 ± 3,6**
		škrob + 1500 AIE	92 ± 9,6**	94 ± 9,5**	113 ± 9,7**	112 ± 8,8**	111 ± 4,2**
—	4 až 6	škrob + 3000 AIE	101 ± 3,3**	82 ± 11**	112 ± 4,5**	109 ± 6,4**	104 ± 2,5**
		roztok soli	55 ± 4,8	63 ± 5,9	67 ± 5,8	72 ± 4,7	66 ± 5,0
		škrob (kontrola)	103 ± 11	117 ± 8,6	118 ± 8,5	128 ± 8,9	109 ± 11
		škrob + 6000 AIE	99 ± 4,5	118 ± 5,8	104 ± 8,1*	123 ± 11	107 ± 7,3
		škrob + 12 000 AIE	90 ± 5,2*	98 ± 8,2**	99 ± 4,1**	117 ± 6,7*	104 ± 8,2
—	5 až 7	škrob + 24 000 AIE	74 ± 5,5**	82 ± 2,9**	83 ± 3,7**	96 ± 6,6**	85 ± 6,4**
		roztok soli	55 ± 4,8	63 ± 5,9	67 ± 5,8	72 ± 4,7	66 ± 5,0
		škrob (kontrola)	103 ± 11	117 ± 8,6	118 ± 8,5	128 ± 8,9	109 ± 11
		škrob + 6000 AIE	95 ± 4,3	107 ± 3,3*	102 ± 5,5**	111 ± 3,0**	102 ± 6,7
		škrob + 12 000 AIE	87 ± 8,6*	94 ± 8,8**	89 ± 8,5**	98 ± 8,3**	91 ± 4,3**
		škrob + 24 000 AIE	74 ± 8,9**	84 ± 7,2**	84 ± 6,9**	85 ± 6,5**	85 ± 4,9**

* = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině se škrobem = < 0,05

** = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině se škrobem = < 0,01

*** = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině se škrobem = < 0,001

Se shora uvedených údajů je zřejmé, že zatímco se projevuje stupeň potlačování působení sacharázy jak in vitro, tak také in vivo jako zřetelná funkce molekulové hmotnosti, potlačování působení amylázy in vitro závisí na molekulové hmotnosti, zatímco potlačování odbourávání škrobů in vivo neklesá s poklesem molekulové hmotnosti, nýbrž zůstává s překvapením konstantní.

Ačkoli tedy účinek potlačování působení amylázy in vivo klesá s molekulovou hmotností, jsou hodnoty ED₅₀ potlačování stravování škrobu v zažívacím ústrojí pro všechny sloučeniny podle vynálezu v podstatě stejné. Tyto údaje jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6

Vzorec	Glukózové jednotky	Potlačení působení δ -amylázy	Potlačení stravování škrobů v zažívacím ústrojí in vivo (ED ₅₀ mg/kg)
		in vitro AIE/mg	
IIb	(1)	300	0,76
IIIb	(2)	300	1,60
V	(3)	1 400	1,61
—	(4 až 6)	17 500	1,42
—	(5 až 7)	30 000	1,00

S překvapením je také možné se sloučeninami vzorců IIb, IIIb a V současně potlačovat působení sacharázy a stravování škrobů v zažívacím ústrojí a to při přesně předem předvídané a charakteristické dávce.

Sloučeniny kromě toho mají výhodný účinek s ohledem na absorpci glukózy. Toto je zřejmé z údajů uvedených v tabulce 7 (pokusy s hladovými krysami) pro sloučeninu vzorce IIIb ($n_1=2$).

Tabulka 7

Dávka	Krevní glukóza v mg % (střední hodnota $\pm$ odch.)		
	15 minut	30 minut	45 minut
roztok soli	72 $\pm$ 4,6	78 $\pm$ 1,3	87 $\pm$ 6,8
glukóza (kontrola)	142 $\pm$ 12	142 $\pm$ 12	158 $\pm$ 19
glukóza + 30 mg	135 $\pm$ 13	128 $\pm$ 5,5	132 $\pm$ 7,3
glukóza + 60 mg	125 $\pm$ 13*	118 $\pm$ 2,9**	130 $\pm$ 9,0***

* = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině s glukózou = 0,05

** = Pravděpodobnost proti kontrolní skupině s glukózou = 0,01

Čištění směsi vyšších členů této řady a použití v čisté formě vede neočekávaně k ještě vyššímu účinku a specifičnosti. To lze dokázat porovnáním údajů o potlačování pů-

sobení α -amylázy a sacharázy in vitro uvedených v tabulce 2 a údajů uvedených v tabulce 8 pro čisté sloučeniny.

Tabulka 8

Počet glukózových jednotek	Potlačování působení δ -amylázy AIE/g	Potlačování působení sacharázy SIE/g
4	67 000 000	7000
5	57 000 000	3500
6	42 000 000	1200
7	24 000 000	60
8	5 000 000	10

Předchozí výsledky ukazují vysoký účinek sloučeniny se 4 glukózovými jednotkami jako inhibitoru působení α -amylázy. Také sloučeniny s 5 a 6 jednotkami mají podstatně vyšší specifický účinek potlačování než jaký byl sledován u přípravků až dosud známých. Úbytek účinku potlačování nastává s přírůstkem molekulové hmotnosti, jako je zřejmé u sloučenin se 7 a 8 glukózovými jednotkami, ačkoli i tyto sloučeniny mají

ještě podstatný účinek potlačování. Při potlačování působení sacharózy in vitro je naopak zřejmá závislost na molekulové hmotnosti. Sloučenina se 4 glukózovými jednotkami má asi 1/10 specifického účinku, jaký má sloučenina se 2 glukózovými jednotkami, proti kterému je účinek potlačování u sloučeniny s 8 glukózovými jednotkami jen nepatrný.

Sloučeniny se mohou používat bez ředění,

například jako prášek nebo v želatinovém obalu nebo v kombinaci s nosičem ve farmaceutických směsích.

Farmaceutické přípravky mohou obsahovat větší nebo menší množství inhibitoru, například 0,1 až 99,5 % v kombinaci s farmaceuticky přijatelným netoxickým inertním nosičem, přičemž nosič může obsahovat alespoň jedno pevné, polopevné nebo tekuté ředidlo, plnivo a/nebo netoxický inertní farmaceuticky snášlivý pomocný prostředek pro formulaci. Takovéto farmaceutické přípravky jsou s výhodou ve formě dávkových jednotek, to znamená fyzikálně oddělených jednotek obsahujících stanovení množství inhibitoru, které odpovídají zlomku nebo násobku dávky, jež je potřebná k dosažení požadovaného účinku potlačování. Dávkové jednotky mohou obsahovat 1, 2, 3, 4 nebo více jednotlivých dávek nebo 1/2, 1/3 nebo 1/4 této jednotkové dávky. Jednotková dávka obsahuje s výhodou dostatečné množství účinné látky, aby se při její aplikaci podle předem stanoveného dávkovacího schématu dosáhlo jedné nebo několika dávkovými jednotkami požadovaného účinku potlačování, přičemž se podává celá, polovina, třetina nebo čtvrtina denní dávky obvykle jednou, dvakrát, třikrát nebo čtyřikrát za den. Jiné terapeutické přípravky se mohou také používat. Ačkoli by se mělo v každém případě pečlivě uvážit dávkování a dávkovací schéma, při použití důkladných odborných úsudků a s ohledem na stáří, hmotnost a stav pacienta, druh a obtížnost onemocnění je dávkování obvykle možné v rozmezí asi 30 až asi $3 \cdot 10^5$ AIE/kg a asi 1 až asi $1 \cdot 10^4$ SIE/kg tělesné hmotnosti a den. V mnoha případech se přitom dosahuje dostačujícího terapeutického účinku s menší dávkou, zatímco v jiných případech je potřebná větší dávka.

Orální aplikace se provádí za použití pevných a tekutých dávkových jednotek, jako například prášků, tablet, dražé, kapslí, granulátů, suspenzí, roztoků a podobně.

Prášky se vyrábějí rozmělněním látky na vhodnou velikost a mísením s rovněž rozmělněným farmaceutickým nosičem. Ačkoli k tomuto účelu se normálně používají jedlé uhlohydráty, jako například škroby, laktóza, sacharóza nebo glukóza a také zde je možné je použít, je žádoucí používat nemetabolizovatelné uhlohydráty, jako například deriváty celulózy.

Společně s nimi se mohou používat také sladiva, ochucovadla, konzervační prostředky, dispergovadla a barviva.

Kapsle se mohou vyrábět smísením shora popsané práškové směsi a plněním již do připravených želatinových obalů. K práškové směsi se mohou přidávat před plněním kluzné látky, jako například křemelina, mastek, stearát hořečnatý, stearát vápenatý nebo pevné polyethylenglykoly. Směs může rovněž obsahovat látky napomáhající rozpadávání nebo pomocná rozpouštědla, jako například agar-agar, uhličitán vápenatý nebo uhličitán

sodný, aby se při použití kapsle usnadnila dostupnost inhibitoru.

Zhotovování tablet se provádí například výrobou práškové směsi o hrubém nebo jemném zrna a přidáním kluzné látky a látky napomáhající rozpadávání. Z této směsi se formují tablety. Prášková směs se získává smísením látek, které se vhodným způsobem rozmělnily a doplnily zředovadly nebo jinými nosnými látkami, jak bylo popsáno shora. Popřípadě se přidává pojivo, například karboxymethylcelulóza, alginát, želatina nebo polyvinylpyrrolidon, zpomalovač rozpouštění, jako například parafin, urychlovač resorpce, jako například kvartérní sůl a/nebo adsorpční prostředek, jako například bentonit, kaolín nebo střední fosforečnan vápenatý. Prášková směs se může granulovat společně s pojivem, jako například sirupem, škrobovým mazem, akáciovým mazem nebo roztoky na bázi celulóзовých nebo polymerních materiálů. Potom se produkt protlačí hrubým sítem. Podle jiné možnosti se může prášková směs nechat procházet tabletovacím strojem a získané nerovnoměrně formované kusy rozmělnit až na velikost zrna. Aby vzniklá zrna neuvázla v tabletovací trysce, může se přidávat kluzná látka, jako například kyselina stearová nebo její sůl, mastek nebo minerální olej. Tyto směsi s kluznými vlastnostmi se potom lisují do tablet. Účinná látka může být také spojena s volně tekoucími inertními nosiči a přímo používána k výrobě tablet při vynechání granulárního a rozmělnovacího stupně. Produkt se může opatřit čirým nebo opalescentním ochranným potahem, například potahem ze šelaku, z cukru nebo polymerních látek a potah se může vyleštit voskem. K povlaku se mohou přidávat barviva, aby se mohlo rozlišit mezi různými dávkovými jednotkami.

Formy pro orální podávání, jako například roztoky, sirupy nebo elixíry mohou být vyrobeny v dávkových jednotkách, tak že stanovené množství přípravku obsahuje určené množství účinné látky. Sirup se může vyrábět tak, že se účinná látka rozpustí ve vodném roztoku, který obsahuje vhodné ochucovadlo, elixíry se vyrábějí za použití netoxických alkoholických nosičů. Suspenze mohou představovat disperze sloučeniny v netoxickém nosiči. Lze též přidávat pomocná rozpouštědla a emulgátory, jako například ethoxylovaný isostearylalkohol a polyoxyethylensorbitester, konzervační prostředky a přísady zlepšující chuť, jako je například pepermátová silice, sacharid a podobně.

Dávkovací předpisy mohou být také uvedeny pro kapsle. Dávkování může být mimo to zajištěno tak, že účinná látka se podává protražovaně, například při zadržování účinné látky v polymerních substancích, voscích a podobně.

Toxicita těchto sloučenin je velmi malá. Také bez konečného čištění se například surový produkt z příkladu 8 s účinkem 26 000 SIE g snáší bez vedlejších účinků, když se

aplikuje 340 000 SIE/kg u myši a krys perorálně. Také při intravenózní injekci snáší myši 10 000 SIE/kg bez vedlejších účinků.

Farmaceutické přípravky podle vynálezu mohou obsahovat také jiné farmaceuticky účinné sloučeniny, zvláště jiná orální antidiabetika, jako například β -cytotropní deriváty sulfonylmočoviny a biguanidiny snižující hladinu krevního cukru.

Kromě shora zmíněných farmaceutických přípravků lze dodatkově vyrábět také potraviny obsahující tyto účinné látky, například cukr, chléb, bramborové produkty, ovocné šťávy, pivo, čokoládu a jiné druhy cukrovinek a konzervované potraviny, jako například marmeládu, přičemž k těmto produktům se přidává terapeuticky účinné množství alespoň jednoho inhibitoru podle vynálezu.

Osvětlení některých používaných reagentů a pomocných látek

Jako ionexy se mohou používat například tyto komerčně dostupné produkty:

Amberlit IRA 410 Cl^- (anex),
Amberlit (HCO_3^- -forma) (anex),
Amberlit IRC 120 (H^+ -forma), (silně kyselý katex),
Amberlit IRA 410 OH^- (silný bazický anex),
Amberlit IRC 50 H^+ (slabě kyselý katex) (zboží firmy Rohm a Haas Company),
Dowex 50 WX 4H^+ (silně kyselý katex) (značka zboží firmy Dow Chemical Co. Midland, Michigan, USA).

Jako anex na bázi celulózy se může používat například EAE-celulóza firmy Schleicher a Schüll.

Jako polyakrylamidový gel se může používat například Bio-Gel P-2 (označení zboží firmy Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornie, USA).

Malcin je přírodní sladový extrakt formy Diamalt AG, Mnichov (NSR).

Lévapol $\text{\textcircled{R}}$ je nespecifická adsorpční pryskyřice firmy Bayer AG, Leverkusen (NSR).

Klarcel je pomocný filtrační prostředek firmy CECA, Velizy-Villacoublay (Francie).

SE 50 je silikonový elastomer firmy Hewlett Packard.

Používané mikroorganismy jsou uchovávány v americké sbírce typů kultur (ATCC) pod těmito čísly:

Kmen	ATCC—Nr.
SE 50 (CBS 961.70)	310 42
SE 18 (CBS 957.70)	310 41
SE 82 (CBS 615.71)	310 45
SE 50/13 (CBS 614.71)	310 43
SE 50/110 (CBS 674.73)	310 44

Příklad 1

Skleněný fermentátor s 8 litry živného roztoku obsahujícího 5,0 % škrobů, 1 % kvasnicového extraktu, 0,2 % K_2HPO_4 se naočkuje 3 dny třepanou baňkou s kmenem SE 50/13 (CBS 614.71) a inkubuje za intenzivního míchání a provzdušňování 3 dny při 28 stupních Celsia a získá se kultivační bujón s 105 000 AIE/ml.

6 litrů tohoto fermentačního živného roztoku se po ochlazení na 20 °C upraví polokonzentrovanou kyselinou dusičnou na pH 2,5, přidá se 30 g aktivního uhlí Karborafin a míchá 10 minut. Potom se 15 minut odstřeďuje při 10 000 ot/min a čirý světlý žlutý zbytek po neutralizaci amoniakem odpaří na 500 ml. 500 ml koncentrátu se 45 minut míchá s 200 g anexu Amberlit IRA 410 Cl^- , oddělí na nuči a přidají 4/5 objemu tedy 400 mililitrů methanolu, aby se vysrážela hlavní část vysokomolekulárního produktu odbourávání škrobu (společně s ještě přítomným zbytkem aktivního uhlí). Potom se 5 minut odstřeďuje při 5000 ot/min. 850 ml zbytku se přikape za intenzivního míchání do 4 litrů vysušeného ethanolu. Bílá vločkovitá sraženina se oddělí na nuči, promyje třikrát vysušeným ethanol a dvakrát etherem a suší ve vakuu při 50 °C. Výtěžek: 36 g bílého prášku s $10 \cdot 10^6$ AIE/g. V některých dalších příkladech se tato látka používá.

Potlačení působení enzymu na deskách v tenké vrstvě

Pro posouzení konečného produktu a složení přípravku pomocí chromatografie na tenké vrstvě se nanese 1 μl fermentačního živného roztoku nebo 1 μg preparátu na hotové desky ze silikagelu (firma Schleicher und Schüll, Dassel; typ F 1500) a vyvíjí dvakrát systémem n-butanol, ethanol a voda v poměru 50 : 30 : 20.

K vybarvení pro potlačení působení sacharázy se postříkají vyvinuté a dobře vysušené desky s enzymgelem (20 ml na desku 20 x 20 cm) a gel se nechá ztuhnout. Potom se 5 minut předem inkubuje ve vlhké komoře při teplotě místnosti a nakonec sytý postříká substrátovým gelem. Po ztuhnutí této druhé vrstvy gelu se desky vnesou do vlhké komory a inkubují při 40 °C. Zbarvení inhibitoru (světlé skvrny, červeně hnědé pozadí) se vyvine po 60 až 90 minutách. Ve chvíli optimálního vyvinutí barvy se proces přerušuje a desky s agarovými vrstvami na nich se nacházejícími suší proudícím horkým vzduchem.

Příprava gelů

Enzymgel: 1,5 g agarózy (L'Industrie Biologique Française) se suspenduje ve 100 ml 0,2 M natriummaleinátového pufru (pH 6,0) a potom rozpustí varem. Čirý agarózový roztok se ochladí na 50 °C a přidá 250 μl roz-

toku Tritonu X-100 (2 g Tritonu X 100+8 g ethanolu p.a.) a 0,5 ml roztoku dianisidinu (20 mg dianisidinu v 1 ml acetonu) za třepání. Přímě před použitím gelu se přidá 1 ml reagentie GOD/POD (12,5 mg glukosoxidázy, stupeň čistoty I, firmy Boehringer, a 2,5 mg peroxidázy, stupeň čistoty II, lyofilizát firmy Boehringer rozpuštěné v 5 ml maleinátového pufru) a 4 až 5 jednotek sacharózy z tenkého střeva prasat. Gel se musí až do postříkání udržovat na 50 °C, protože jinak v průběhu stříkání tuhne v trysce.

Substrátový gel: 0,5 g agarózy se suspenduje ve 100 ml natriummaleinátového pufru (pH 6,0) a rozpustí za varu. Potom se ochladí na 50 °C, přidá 100 μ l Tritonu (2 g Tritonu X-100+8 g ethanolu p. a.) a přidá 1 gram sacharózy (Serva č. 35 579). Po rozpuštění sacharózy je gel připraven k použití.

K vybarvení inhibice acylázy se postříkají vyvinuté a usušené tenké desky pro chromatografii amyláz-gelem (20 ml na desku 20 X 20 cm) a nechají ztuhnout. Po 5 minutách předchozí inkubace při teplotě místnosti se na desky nanese vrstva 0,5% škrobového roztoku (1 g škrobu Merck čís. 1252, ve 200 mililitrech 0,2 glycerofosfátového pufru 0,01 M CaCl₂ (pH 6,9), rozpuštěno za varu) a nechá se tam 2 minuty při 40 °C roztok za třepání. Potom se desky dobře opláchnou destilovanou vodou a pro vybarvení neodbouraných škrobů se smáčí ve zředěném jodovém roztoku (4 ml základního jodového roztoku na 500 ml vody, základní jodový roztok: 2,2 g jodu+4,4 g jodidu draselného, rozpuštěno ve 100 ml vody). Asi po 1 minutě je vybarvení optimální. Hned se fotografují, protože modré skvrny rychle zblednou.

Příprava amylázového gelu

1 g agarózy se rozpustí ve 100 ml pufru z 0,2 M natriumglycerofosfátu a 0,01 M chloridu vápenatého (pH 6,9) při 100 °C a po ochlazení na 50 °C se přidá 100 μ l Tritonu X-100 (2 g Tritonu X-100+8 g ethanolu p.a.). Přímě před postříkáním se přidá 100 μ l suspenze krystalické amylázy (10 μ g amylázy ze slinivky břišní prasat na ml nasyceného roztoku síranu amonného, firma Boehringer).

Příklad 2

Pokud se naočkuje jednolitrová Erlenmeyerova baňka se 120 ml živného roztoku obsahujícího 4 % škrobu, 2,4 % glukózy, 0,9 % kaseinového hydrolyzátu a 0,9 % kvasnicového extraktu, pH upraví hydroxidem sodným na 7,6, přidá 0,4 % uhlíčitanu vápenatého a sterilizuje 30 minut při 121 °C, s 3 ml výchozí kultury kmene SE 82 (CBS 615.71) rostoucí v živném roztoku sestávajícím z 2 % škrobu, 1 % glukózy, 0,5 % kaseinového hydrolyzátu a 1 % kvasnicového extraktu, pH upraví s NaOH na 7,2, přidá 0,4 % uhlíčitanu vápenatého, sterilizuje při 121 °C 30 minut

a inkubuje 5 dní při 28 °C na zakružovací třepače, tak se získá roztok kultury s 122 000 AIE/ml. Během zpracování se mycelium oddělí od spojených roztoků kultury odstředováním při 12 000 ot/min., 300 ml filtrátu kultury se upraví částečně koncentrovanou kyselinou dusičnou na pH 2,5 a míchá 10 minut s 2,4 g aktivního uhlí p. a. Po oddělení uhlí odstředováním při 12 000 ot/min. se k roztoku neutralizovanému pomocí 10 N hydroxidu draselného na pH 6 přidá 300 ml methanolu, krátce nechá stát a při 12 000 ot/min. odstraní sraženina. Nyní se zbytek přikape do 3 litrů ethanolu a po krátkém stání sraženina izoluje odstředováním při 12 000 ot/min. Sraženina se dvakrát promyje absolutním ethanolom a jednou etherem a suší ve vakuu. Získá se tak 2,23 g produktu s 7,45.10⁶ AIE/g, který obsahuje 95 % sloučenin s $n_1 + n_2 = 4$ a více glukózovými jednotkami.

Příklad 3

Když se naočkuje jednolitrová Erlenmeyerova baňka se 120 ml živného roztoku obsahujícího 3,5 % glukózy, 2 % škrobu, 0,5 % kaseinového hydrolyzátu, 1,3 % kvasnicového extraktu, 0,3 % uhlíčitanu vápenatého a 0,3 % středního fosforečnanu draselného, před sterilizací upraví na pH 7,8, sterilizuje 30 minut při 121 °C, s 6 ml kultury kmene SE 50/110 v živném roztoku obsahujícím 3 % sójové mouky, 3 % glycerinu a 0,2 % uhlíčitanu vápenatého a inkubuje 3 až 4 dny na zakružovací třepače při 24 °C, získá se roztok kultury obsahující 153 000 AIE/ml a 12 200 SIE/litr.

1 litr roztoku kultury se kyselinou dusičnou upraví na pH 2,5, míchá 10 minut s 5 g aktivního uhlí a potom odstřeďuje 30 minut při 5000 ot/min. Nakonec se neutralizuje přidáním 25 g Amberlitu IRA 410 (OH⁻ forma). Neutrální zbytek se v rotačním přístroji upraví na 100 ml, přidá 100 ml methanolu a filtruje. Filtrát se rozmíchá ve 2 litrech absolutního ethanolu, vysrážena sraženina se odstraní na nuči a třikrát promyje acetone a etherem a suší ve vakuu.

Výtěžek: 14 g bílého prášku s 5.10⁶ AIE/g; převážně sloučeniny alespoň s $n_1 + n_2 = 4$ glukózovými jednotkami.

Příklad 4

Pokud se pracuje podle příkladu 3 avšak s 0,5 % škrobu, získá se po čtyřdenní fermentaci kultivační bujón s 40 000 AIE a 184 SIE/ml. Kultivační bujón obsahuje směs sloučenin podle vynálezu, které mají alespoň jednu glukózovou jednotku.

Příklad 5

Pokud se naočkuje jednolitrová Erlenmeyerova baňka, která obsahuje 120 ml živného roztoku skládajícího se z 3 % glukó-

zy, 0,6 % kaseinového hydrolyzátu, 1,6 % kvasnicového extraktu, 0,3 % uhlíčitanu vápenatého, 0,3 % středního fosforečnanu draselného, pH se před sterilizací upraví hydroxidem draselným na 7,8, s výchozí kulturou kmene SE 50/110 (CBS 674.73) podle příkladu 3 a inkubuje 4 dny při 24 °C na zakružovací třepačce, získá se kultivační bujón se 10 800 SIE/litr, obsahující převážně sloučeninu podle vynálezu s jednou glukózovou jednotkou.

5 litrů filtrátu kultury se oddělí od mycelia při 13 000 ot/min., upraví polokoncentrovanou kyselinou dusičnou na pH 2,5 a 15 minut míchá s 55 g aktivního uhlí a 200 g klarcelu. Po odstranění pevného podílu odsátím se neutralizuje koncentrovaným amoniakem na pH 7, roztok se odpaří na 1,5 litru a vystráží pětinasobným množstvím ethanolu.

Získaná vločkovitá sraženina se oddělí na odstředivce s průběžným rotorem při 12 000 ot/min. a žlutavý zbytek odpaří na 150 ml a pro oddělení nepatrného podílu nerozpustného materiálu odstředuje na pomaloběžné odstředivce. 50 ml tohoto roztoku se vnese na silně kyselým katexem Amberlit IR-120 (H⁺—forma) plněnou kolonu (30 X X 300 mm; 30 ml vody na hodinu). Potom co se zachytí celkem 300 ml eluátu, který obsahuje inertní sacharidy stejně jako podíl neadsorbovaných inhibičně účinných složek, převede se katex s asi 400 ml vody do kádinky a za míchání přidává tak dlouho koncentrovaný amoniak, až se upraví hodnota pH na 11,5. Po 30 minutách dalšího míchání se oddělí katex, odpaří se na 1/20 objemu, filtruje přes sloupec (20 X 150 mm) ionexu Amberlit IRA-410 (HCO₃⁻—forma) a jímá při rychlosti toku 30 ml/h asi 500 ml eluátu, který se odpaří a po lyofilizaci poskytně 1,3 g surového produktu.

Pro další čištění se surový preparát frakcionuje na polyakrylamidovém gelu Bio-Gel P-2, 100—200 mesh (firma Bi-Rad, Mnichov). K tomu slouží sloupec o průměru 50 mm a délce 450 mm, kde se pracuje s vodou při rychlosti toku 40 ml/h, přičemž se shromažďují frakce vždy po 10 ml. Všechny frakce se zkouší anthronovým testem na uhlohydráty, stejně jako pomocí testu potlačujícího působení sacharázy na inhibičně účinné složky. Frakce obsahující inhibitor sacharázy se dále zkoušejí chromatografií na tenké vrstvě podle příkladu 1 na jejich obsah individuálních složek. Frakce obsahující sloučeninu s 1 glukózovou jednotkou se spojí, odpaří a lyofilizují. Dostane se 35 mg látky s 0,3.10⁶ AIE/g a 30 000 SIE/g.

Příklad 6

Pokud se naočkuje jednolitrová Erlenmeyerova baňka vždy se 120 ml živného roztoku obsahujícího 5 % škrobu, 1 % kvasnicového extraktu, 0,2 % středního fosforečnanu draselného pokaždé 2 ml výchozí kultury podle příkladu 3, získá se po třídenní

inkubaci při 28 °C roztok kultury s výtěžkem inhibitoru amylázy:

kmen	AIE/ml
SE 50 (CBS 861.70)	37 000
SE 50/13 (CBS 614.71)	109 000
SE 50/110 (CBS 674.73)	53 500

který převážně tvoří směs sloučenin se 4 nebo více glukózovými jednotkami.

Příklad 7

Pokud se naočkuje jednolitrová Erlenmeyerova baňka vždy se 120 ml živného roztoku obsahujícího 1,3 % maltózy, 3,5 % glukózy, 0,5 % kaseinového hydrolyzátu, 1,3 % kvasnicového extraktu, 0,3 % uhlíčitanu vápenatého a 0,3 % středního fosforečnanu draselného, vždy 2 ml výchozí kultury podle příkladu 3, získají se po čtyřdenní inkubaci na zakružovací třepačce při 24 °C s různými kmeny tyto výtěžky:

kmen	SIE/ml	AIE/ml
SE 50 (CBS 961.70)	25	580
SE 50/13 (CBS 614.71)	14,8	1460
SE 50/110 (CBS 674.73)	57,9	755

kde převážně jde o směs sloučenin se 4 nebo méně glukózovými jednotkami.

Příklad 8

Pokud se naočkuje v fermentátoru 100 litrů živného roztoku obsahujícího 3,5 % glukózy, 2,5 % sladového extraktu maleinu, 0,5 % kaseinového hydrolyzátu, 1,3 % kvasnicového extraktu, 0,3 % uhlíčitanu vápenatého, 0,3 % středního fosforečnanu draselného a 0,1 % protipěněního prostředku, s 5 litry výchází kultury podle příkladu 3 a inkubuje se za míchání s provzdušňováním 5 dnů při 24 °C, tak se získá roztok kultury s 73 000 SIE/litr, který obsahuje převážně sloučeninu s $n_1 + n_2 = 2$.

90 litrů fermentační násady s myceliem se upraví na pH 2,5 koncentrovanou kyselinou dusičnou při sledování pH-metrem a za míchání přidá 900 g (= 1 %) aktivního uhlí pro adsorpci hlavního podílu vzniklých barevných látek. Míchá se 15 minut, potom oddělí na odstředivce při 3000 ot/min. od mycelia a hlavního podílu uhlí a zbytek potom filtruje za přídavku 3 kg klarcelu přes tlakovou nuči. Získá se 61 litrů světle hnědého čirého filtrátu s obsahem 60 000 SIE/litr.

Filtrát se upraví koncentrovaným amoniakem na pH 7 a pro adsorpci se účinná látka míchá s 1300 g (2 %) aktivního uhlí 30 minut. Filtruje se přes tlakovou nuči a sediment aktivního uhlí dobře do sucha odlisuje a míchá třikrát se 4 litry 50% acetonu při pH 2,5 vždy 15 minut, aby se účinná látka

ka desorbovala z uhlí. Acetonové desorbáty se po oddělení uhlí filtrací spojí. Spojené desorbáty se odpaří na rotační odparce na 250 ml, přidá se stejný (250 ml) objem methanolu a filtruje přes skládaný filtr. Filtrát (480 ml) se za intenzivního míchání nakape do 5 litrů acetonu. Vysrážená sraženina se oddělí na nuči a třikrát promyje acetonem a etherem. Potom se suší ve vakuu při 35 °C. Výtěžek: 230 g s 8500 SIE/g.

25 g shora uvedeného surového produktu se rozpustí v 1 litru vody a míchá s 300 g silně kyselého katexu Dowex^R 50WX 4 H⁺ (200 až 400 mesh) 30 minut. Pryskyřice se odfiltruje a promyje třikrát 2 litry 0,001 N kyseliny chlorovodíkové. Promytý katex Dowex se potom suspenduje v 500 ml vody a suspenze upraví přidáním 25% amoniaku na pH 9,0 při sledování pH-metrem. Nakonec se desorbuje ještě dvakrát vždy 500 ml 0,6% amoniaku, desorbáty spojí a odpaří na rotační odparce na 100 ml. Pro odbarvení tohoto koncentráту se míchá 5 minut s 2 g anexu DEAE-celulóza (firma Schleicher und Schüll, čís. 02035, 0,6 mval/g) a potom odstřeďuje. Světle žlutý zbytek se přidá ke stejnému objemu (100 ml) methanolu a potom nakape do 2 litrů acetonu za intenzivního míchání. Sraženina se odsaje na nuči, promyje acetonem a etherem a suší ve vakuu při 35 °C. Výtěžek činí 4,2 g s 26 000 SIE/g.

Pro řádné vyčištění se 4,0 g inhibitoru gelově filtrují po 0,5 g dílech přes polyakrylamidový gel Bio-Gel P-2. Potom se vždy 0,5 g preparátu rozpustí v 10 ml vody a vnese na sloupec gelu Bio-Gel P-2 (200 až 400 mesh, firma Bio-Rad) o průměru 5 cm a délce 95 cm. Vyvíjí se vodou při rychlosti toku 80 ml/h. Jímají se 12 ml frakce. Ve všech frakcích se vyšetří celkový obsah uhlohydrátu (ve formě anthronového testu, jako extinkce při E₆₂₀), stejně jako obsah inhibitoru sacharózy a inhibitoru amylázy. Kromě toho se frakce zkoušejí chromatografií na tenké vrstvě (vybarvení inhibitoru enzymu podle příkladu 1).

Frakce obsahující sloučeniny se 4 až 6 glukózovými jednotkami se spojí, odpaří ve vakuu na 10 ml a vysráží nakapáním do 200 ml suchého ethanolu. Sraženina se oddělí odstředěním, promyje acetonem a etherem a suší ve vakuu. Výtěžek ze 4,0 g surového inhibitoru: 0,2 g sloučenin se 4 až 6 glukózovými jednotkami s 17,5.10⁶ AIE/g a 8500 SIE/g.

Frakce obsahující sloučeninu se 3 jednotkami se zpracují stejným způsobem, přičemž se vysrážení provede 200 ml acetonu. Výtěžek ze 4,0 g surového inhibitoru: 0,1 g sloučeniny s $n_1 + n_2 = 3$, s 1,4.10⁶ AIE/g a 21 000 SIE/g.

Z frakcí obsahujících sloučeninu s $n_1 + n_2 = 2$ (vysráženo acetonem) se izoluje 0,9 g sloučeniny s $n_1 + n_2 = 2$ jednotkami s 0,3.10⁶ AIE/g a 68 000 SIE/g.

Příklad 9

Pokud se naočkují 3 malé fermentátory vždy s 8 litry živného roztoku s obsahem 7,5 % sladového extraktu maleinu, 0,3 % kaseinového hydrolyzátu, 0,7 % kvasnicového extraktu, 0,3 % uhličitanu vápenatého, 0,3 % středního fosforečnanu draselného, s 5 % výchozí kultury kmene SE 50/110 (CBS 674.73) (získáno podle příkladu 3), tak se po pětidenní inkubaci při 24 °C získá kultivační bujón s 73 SIE/ml, který převážně obsahuje sloučeninu s $n_1 + n_2 = 2$. Po odstřeďování (30 minut, 3000 ot/min) po oddělení mycelia se získá 20,5 litrů tmavohnědého roztoku kultury s 67 000 SIE/litr. Upraví se kyselinou dusičnou na pH 3,5 a přidá pro odbarvení 60 g adsorpční pryskyřice Lewapol (Ca 9221, 0,35 mm zrnění, firma Bayer) na litr, tedy 1,23 kg Lewapolu. Po dvacetiminutovém míchání se oddělí na nuči přes filtr (Seitz K3). Odbarvený roztok kultury se neutralizuje amoniakem (18,5 litru, 67 000 SIE/litr). Nakonec se pro adsorpci účinné látky vmíchá 20 g/litr aktivního uhlí, tedy 370 g a po dobu 20 minut míchá. Pak se odfiltruje přes filtr (Seitz K3), který je opatřen vrstvou pomocného filtračního prostředku klarcel. Filtrát (17,5 litru, 3600 SIE/litr) se odloží. Zbytek na uhlí se třikrát promyje 2 litry destilované vody. Pro desorpci účinné látky z uhlí se třikrát míchá vždy s 1 litrem 80% acetonu 15 minut, přičemž se pH upraví na 2,5 koncentrováním kyselinou chlorovodíkovou. Desorbáty se spojí (2,4 litry, 371 000 SIE/litr). Do desorbátu se vnese 20 g/litr katexu Dowex H⁺ (Dowex 50 W X 4, H⁺-forma firma Serva, Heidelberg), tedy 46 g Dowexu a míchá 20 minut. Potom se pryskyřice odfiltruje (Dowexová frakce I) a promyje asi 75 % acetonem. Filtrát a promývací kapalina (3 litry = 215 000 SIE/litr) se rozmíchají s 60 g/litr silně bazického anexu Amberlit IRA 410 (OH⁻-forma, firma Serva, Heidelberg) a upraví na pH 7. Potom se odfiltruje a k filtrátu (2,8 litru, 219 000 SIE/litr) přidá 72 gramu katexu Dowex H⁺ a míchá 20 minut. Přitom se udržuje pH 3,0 zavěšením porézního nylonového sáčku naplněného anexem Amberlit IRA 410 OH⁻. Potom se odfiltruje od katexu Dowex (Dowexová frakce II) a filtrát (2,6 litru, 27 000 SIE/litr) odloží.

Dowexová frakce I a II se promyjí odděleně třikrát vždy 75 % acetonem při pH 3,5 a potom desorbují vždy třikrát 100 ml (dowexová frakce I) nebo 150 ml (dowexová frakce II) 0,6 % amoniaku. Při první desorpci, při které množství amoniaku pro neutralizaci pryskyřice Dowex není dostačující, se upraví přídavkem koncentrovaného amoniaku pH na 9 při sledování pH-metrem. 3 desorbáty dowexových frakcí I a II se spojí, na rotační odparce odpaří skoro do sucha, vyjmou 50 ml vody, pomocí pH-metru upraví kyselinou chlorovodíkovou na 3 až 4 a přidá 50 ml methanolu. Roztok se za

míchání nakape do 1,5 litru absolutního acetonu, vysrážená sraženina se odsaje na nučl a promyje třikrát acetonem, stejně jako jednou etherem a suší ve vakuu.

Výtěžek:

frakce I	6,5 g	25 000 SIE/g
frakce II	12,3 g	36 000 SIE/g

Výtěžek

	Objem (litr)	SIE/litr	SIE celkem	Výtěžek SIE %
1) Roztok kultury	20,5	67 000	1 373 500	100
2) Po odbarvení Lewapolem	19,5	67 000	1 306 500	95
3) Po adsorpci na aktivním uhlí	18,5	3 600	66 600	(4,8 odložen)
4) 1. desorbát	0,7	742 000	519 400	37,8
5) 2. desorbát	0,9	329 000	296 100	21,6
6) 3. desorbát	0,8	85 000	68 000	5,0
7) Směsný desorbát (4–6)	2,4	371 000	890 400	64,8
8) Po 1. dowexové adsorpci	3,0	215 000	645 000	
9) Po neutralizaci s IRA OH ⁻	2,8	219 000	613 200	
10) Po 2. dowexové adsorpci	2,5	27 000	67 500	(4,9 odložen)
11) Spojené NH ₃ desorbáty z dowexové frakce I	0,29	682 000	197 780	14,4
12) spojené NH ₃ desorbáty z dowexové frakce II	0,45	1 419 000	638 550	46,5
13) Srážení frakce I	6,5 g	25 000/g	162 500	11,8
Srážení frakce II	12,3 g	36 000/g	442 800	32,2

Příklad 10

Pokud se inkubují 2 g přípravku jako je popsán v příkladě 1 v 60 ml 20 mM natrium-glycerofosfátového pufru [pH 6,9] a 1 mM chloridu vápenatého s 1 g α -amylázy z *Aspergillus spec.* (Serva čís. 13 418) za neustálého míchání 120 hodin při 37 °C, potom se zahřívá 5 minut na 100 °C a odstřeďuje při 4000 ot/min. od nerozpustného podílu, tak se po lyofilizaci roztoku získá 1,9 g produktu s 3500 SIE/g a $2 \cdot 10^6$ AIE/g. Zkouší-li se tento produkt pomocí chromatografie na tenké vrstvě a zbarvení inhibitoru sacharázy jako je popsáno v příkladě 1, tak se ukáže, že sloučeniny s aktivitou potlačování jsou v podstatě sloučeniny podle vynálezu s $n_1 + n_2 = 1, 2$ a 3.

Příklad 11

Pokud se inhibují 2 g přípravku jako je popsán v příkladě 1 v 30 ml 20 mM acátového pufru [pH 4,8] s 1,25 mg β -amylázy z bataty (Boehringer) za neustálého mí-

Frakce I a II obsahují jako složku s potlačujícím účinkem hlavně sloučeninu podle vynálezu s $n_1 + n_2 = 2$, vedle nepatrného podílu sloučeniny s $n_1 + n_2 = 3$.

Následující tabulka uvádí potlačování působené sacharázou u preparátů v po sobě jdoucí řadě:

chání 120 hodin při 37 °C, zahřívá 5 minut na 100 °C a odstředí při 4000 ot/min. od nerozpustného podílu, tak se získá po lyofilizaci roztoku 1,5 g produktu s 1800 SIE/g a $3,8 \cdot 10^6$ AIE/g. Zkouší-li se tento produkt pomocí chromatografie na tenké vrstvě a zbarvení inhibitoru sacharázy jako je popsáno v příkladě 1, tak se ukáže, že sloučeniny s účinkem potlačování jsou v podstatě sloučeniny podle vynálezu s $n_1 + n_2 = 2$ a 3.

Příklad 12

Pokud se naočkuje 200ml Erlenmeyerova baňka s 25 ml živného roztoku s obsahem 0,1 % středního fosforečnanu draselného, 0,2 % síranu amonného, 0,05 % síranu hořečnatého, 0,05 % chloridu draselného, 0,01 % síranu železnatého, 2 % přípravku jako je popsán v příkladě 1, se suspenzí spor kmene *Asp. niger* ATCC 11 394 a inkubuje při 28 °C na zakružovací třepačce, tak poklesne po 6 dnech AIE-titr z 210 000 AIE/ml na 53 000 AIE/ml a po 10 dnech na

21 300 AIE/ml. Současne vzroste obsah SIE/ml z 7,0 na 72 SIE/ml.

20 ml roztoku inkubovaného 10 dní se suspenzí spor se odstraňuje pro oddělení mycelia 30 minut při 3000 ot/min. 15 ml zbytku (72 000 SIE/litr) se odsolí třicetiminutovým mícháním s 2 g katexu Amberlit IRC 50 H⁺ a 1 g anexu Amberlit IRA 410 OH⁻ (vodivost menší než 2 mS.cm⁻¹). Ionexy se odfiltrují a filtrát nechá protékat v množství 5 ml/h katexem Dowex H⁺ ve sloupci (průměr 1 cm, délka 10 cm) ekvilibrovaném 0,001 N kyselinou chlorovodíkovou. Potom se promyje 200 ml 0,001 N kyseliny chlorovodíkové. K desorpci se čerpá 10 ml/h 0,6% roztoku amoniaku sloupcem a jímají se 5 ml frakce. Frakce vykazující aktivitu potlačování působení sacharázy se spojí, odpaří na rotační odparce na 2 ml a přidají se 2 ml methanolu. Roztok se upraví na pH 3 až 4 a vysráží přikapáním 100 ml acetonu. Sraženina se oddělí na nuči, promyje acetonem a etherem a suší se ve vakuu. Výtěžek činí 26 mg s 28 000 SIE/g, kde látka sestává ze sloučenin s $n_1 + n_2 = 2$ a 3. Získání čisté sloučeniny s $n_1 + n_2 = 2$ z tohoto produktu se provádí jako je popsáno v příkladě 8 gelovou filtrací na sloupci gelu Bio-Gel P-2. Získá se 7 mg sloučeniny s $n_1 + n_2 = 2$ o 60 000 SIE/g.

Příklad 13

2 litry filtrátu kultury, který se získal z fermentační násady jako je popsáno v příkladě 5 odstraněním mycelia při 13 000 ot/min. a který má aktivitu 13 000 SIE/g se míchá pro redukci obsahu solí (vodivost filtrátu kultury asi 10 mS.cm⁻¹) s 500 g směsi ionexů z 2,5 dílu Amberlitu IRC-50 (H⁺-forma) a 1 dílu Amberlitu IRA-410 (OH⁻-forma) 1 hodinu. Ionexy se oddělí, roztok odpaří na poněkud menší objem než 100 ml a pro odstranění nerozpustného podílu při 20 000 ot/min. odstředuje 15 minut. Zbytek se doplní na 100 ml, (má skoro vodivost 3,5 mS.cm⁻¹) P-celulózy (Serva č. 45 130, připraven podle známých metod a v 5 mM amoniumfosfátovém pufru [pH 5,5] ekvilibruje). Jako eluční činidlo slouží uvedený pufr. Rychlost toku je 90 ml/h a jímají se frakce o objemu 18 ml.

Frakce eluátu se potom zkoušejí na jejich obsah uhlohydrátů (pomocí anthronového testu) a sloužek potlačujících působení sacharázy (pomocí testu inhibice sacharázy). Spojí se frakce, které jsou podle anthronového testu takřka prosté uhlohydrátů a současně mají při testu inhibice sacharázy zvláštní účinek (frakce 60 až 170), odpaří na 150 ml a filtrují přes sloupec (50 X X 300 mm) anexu Amberlit IRA-410 (HCO₃⁻-forma). Pro lepší kontrolu desionizace se zachycuje eluát ve frakcích (10 ml frakce za 20 minut) a zkouší na uhlohydrát (pomocí anthronového testu: pořadí skoro negativní), na fosfát (pomocí reagentie ky-

selina askorbová-molybdát: zcela negativní) a na potlačování působení sacharázy (pomocí testu inhibice enzymu). Frakce s potlačujícím účinkem (3 až 30) se spojí, odpaří, lyofilizují, znovu rozpustí a lyofilizují. Dostane se 280 mg surového inhibitoru.

Další čištění surového inhibitoru na gelu Bio-Gel P-2 se provádí jako je popsáno v příkladě 6 frakcionizací. Z frakcí, které obsahují čistou sloučeninu s $n_1 + n_2 = 1$ se po lyofilizaci izoluje 30 mg produktu s 0,3.10⁶ AIE/g a 35 000 SIE/g.

Příklad 14

Pro získání aminocukrových derivátů s 5 až 7 glukózovými jednotkami se například vychází z přípravku, jako byl popsán v příkladě 1.

30 g přípravku podle příkladu 1 se rozpustí ve 250 ml vody. Vodivost tohoto roztoku činí 10 mS.cm⁻¹ a pH 5,5. Pro odsolení se k roztoku přidá 60 g slabě kyselého katexu Amberlit IRC 50 H⁺ (katex, který aminocukrové deriváty váže jen ve stopách z vodného roztoku) a 20 g anexu Amberlit IRA 410 OH⁻ a míchá 20 minut. Filtrát (o vodivosti 0,5 mS.cm⁻¹, pH 3,5) se upraví 1 N kyselinou chlorovodíkovou na pH 3,0 (vodivost 0,6 mS.cm⁻¹). Tento roztok se čerpá rychlostí 42 ml/h katexem Dowex 50 W (H⁺-forma) naplněným ve sloupci o průměru 2,5 cm a výšce 40 cm (ekvibrace v 0,001 N kyselině chlorovodíkové a nakonec se promyje 2 litry 0,001 N kyseliny chlorovodíkové. Po promytí sloupce se eluuje 1,2% vodným amoniakem a jímají se 10 ml frakce. Frakce s potlačujícím účinkem se spojí, amoniak odťáhne ve vakuu a roztok potom odpaří ve vakuu na 30 ml. Nakapáním do 600 ml suchého ethanolu se provede srážení, srážení na oddělí na nuči a suší ve vakuu po promytí ethanollem a etherem. Výtěžek činí 4,4 g s 26,5.10⁵ AIE/g.

0,5 g látky se pro jemné vyčištění nanese na sloupec preparativního gelu Bio-Gel P-2, jako je popsáno v příkladě 8 a vyvíjí. Frakce obsahující podle chromatografie na tenké vrstvě (vybarvené inhibitorem amylázy) sloučeniny s $n_1 + n_2 = 5$ až 7 se spojí, odpaří ve vakuu a vysráží suchým ethanollem jako bylo popsáno shora. Výtěžek z 0,5 g surového produktu činí 0,2 g aminocukrového derivátu s $n_1 + n_2 = 5$ až 7, s 30.10⁶ AIE/g a 2500 SIE/g.

Příklad 15

Tento příklad ukazuje jak se mohou eluovat sloučeniny z katexů za kyselých podmínek.

Sloupec o průměru 1,5 cm se naplní 30 g (hmotnost za vlhka) katexu Dowex^R 50 W X X 4 (H⁺-forma), 200 až 400 mesh v 0,001 N kyselině chlorovodíkové. Potom se čerpá 500 mililitrů smíšeného desorbátu (400 000 SIE/

/litr, pH 2,5, 60% aceton), získaného podle příkladu 9 (tabulka, průběh č. 7) asi 1 hodinu sloupcem a potom se promyje 500 ml 0,001 N kyseliny chlorovodíkové. Za těchto podmínek se eluuje sloučenina pouze se stopami účinku. Potom se desorbuje 0,0125 N kyselinou chlorovodíkovou, přičemž se registruje vodivost nebo index lomu eluátu vytékajícího z kolony. Mimoto se eluát testuje na obsah SIE. Účinné frakce 74 až 100 se spojí a po přidání enexu Amberlit IRA 410 OH⁻ se neutralizují, potom odpaří na 5 ml, nechají reagovat s 5 ml methanolu a vysráží přidáním do 200 ml acetonu. Po promytí acetonem a etherem se suší ve vakuu.

Výtěžek činí 1 g sloučeniny s $n_1 + n_2 = 2$ s 65 000 SIE/g.

Z účinných předních frakcí se mohou získat sloučeniny s $n_1 + n_2 = 3$ a 4 glukózovými jednotkami.

Tento způsob kyselé desorpce umožňuje také naopak vzhledem k alkalické desorpci frakcionování pro získání jednotlivých aminocukrů této řady.

Když se přípravek se 4 až 8 glukózovými jednotkami jako je popsáno shora podrobí tomuto postupu, přičemž se neutralizovaný eluát lyofilizuje, získají se následující jednotlivé větší frakce:

$n_1 + n_2 = 4 = 67\,000$ AIE/mg

$n_1 + n_2 = 5 = 57\,000$ AIE/mg

$n_1 + n_2 = 6 = 42\,000$ AIE/mg

$n_1 + n_2 = 7 = 24\,000$ AIE/mg

$n_1 + n_2 = 8 = 5\,000$ AIE/mg

Příklad 16

Shora popsáný způsob odbourávání β -amylázy se provádí takto:

100 mg sloučeniny se rozpustí v 1,9 ml 20 mM natriumacetátového pufru (pH 4,75) a přidá 0,1 ml β -amylázy z butaty (Boehringer, 5 mg/ml, 500 jedn./mg). Směs se udržuje 48 hodin při 37 °C a zahřívá 5 minut na 100 °C a nakonec odstředí při 4500 ot/min., aby se vysrážená bílkovina a jiné nečistoty odstranily. Celá směs se potom vnese na sloupec gelu Bio-Gel P-2 (průměr 22 mm, délka 100 cm, teplota udržována termostatem na 65 °C) a eluuje vodou při rychlosti toku 25 ml/h. Eluát se vede konduktometrem a vysoce citlivým reflektometrem s průtokovými květami. Jímají se frakce vždy o 2,5 ml. Frakce se mohou zkoušet na účinek potlačující působení amylázy nebo sacharázy nebo pomocí anthronového testu. Elektrolyty pocházející z pufru a enzymový preparát se eluují s vyloučeným objemem a produkty odbourávání podle ubývající molekulové hmotnosti. Úplné oddělení sloučenin, jejichž molekulová hmotnost se jen málo liší se provádí opakovanou chromatografií za shora popsaných podmínek. Frakce obsahující produkt určený k izolování se spojí a lyofilizují.

Příklad 17

Pro oddělení isomerních sloučenin se třemi glukózovými jednotkami se vnese 10 g isomerní směsi rozpuštěné ve vodě na sloupec naplněný katexem Dowex^R 50 W X 4 (H⁺-forma). Sloupec se nejprve promývá vodou až je eluát neutrální a potom eluuje 0,025 N kyselinou chlorovodíkovou. Frakce se jímají vždy po 3 ml a zkouší chromatografií na tenké vrstvě. Chromatografie na tenké vrstvě se provádí na silanizovaných deskách silikagelu se směsí ethylacetátu, methanolu, vody a 25% amoniaku v poměru 100:60:40:2 s trojnásobným vyvíjením. Sloučenina vzorce IV, probíhá větší vzdáleností od výchozího místa než sloučenina vzorce V. Frakce 215 až 272 obsahující 6 g isomeru vzorce V a frakce 288 až 294 obsahující 600 miligramů isomeru vzorce IV se spojí, neutralizují anexem Amberlit IRA-410 (OH⁻-forma) a odpaří.

Potlačení působení sacharázy in vitro u isomeru vzorce IV izolovaného tímto postupem je 19 000 SIE/g.

Příklad 18

Vyčištěné preparáty sloučenin s $n_1 + n_2 \leq 4$ se mohou získat opakovanou gelovou prostupovou chromatografií (recycling gel permeation chromatography) podle tohoto příkladu.

6,0 g surového preparátu sloučeniny s $n_1 + n_2 = 4$ a 5 získaného podle příkladu 8 nebo 17 se zbaví příměsí solí rozpuštěním materiálu v 1 nM amoniaku a tento roztok se vnese na kolonu (o průměru 50 mm a délce 100 cm) plněnou Sephadexem G-10^R. Sloupec se eluuje 1 nM amoniakem a eluát se sleduje pomocí průtokového refraktometru a konduktometru s průtokovým článkem. Eluát se může také zkoušet chromatograficky na tenké vrstvě na silikagelových deskách s n-butanolem, ethanolem a vodou v poměru 45:35:20. Frakce obsahující čistý materiál se spojí a lyofilizují. Výtěžek činí 4,4 gramu.

2,0 g tohoto materiálu se k dalšímu dělení vnesou na kolonu (průměr 50 mm, délka 100 cm) naplněnou gelem Bio-Gel P-2^R, 200 až 400 mesh. V koloně se udržuje teplota termostatem na 65 °C a eluuje se vodou při rychlosti toku 80 ml/h.

Nepoužitelná frakce a frakce obsahující sůl, které ještě mohou být přítomny po chromatografii na Sephadexu se odloží. Systém skládající se z kolony, oběhového čerpadla, průtokového refraktometru a průtokového konduktometru se uzavře a roztok se nechá obíhat přes gel. Jak pokročilo oddělování se zkouší neustálým sledováním indexu lomu a vodivosti. Dostačujícího oddělení se dosáhne po 5 obězích. Potom se kolona opět připojí na zásobník rozpouštědla a eluuje, přičemž se jímají frakce vždy s objemem 16 ml. Frakce se zkoušejí chromatografií na tenké

vrstvě, jako bylo shora popsáno a frakce, které obsahují čisté sloučeniny a mezifrakce se spojí a lyofilizují. Výtěžek činí 600 mg sloučeniny s $n_1 + n_2 = 4$; 420 mg sloučeniny s $n_1 + n_2 = 5$ a 100 mg méně oddělených látek jako mezifrakce.

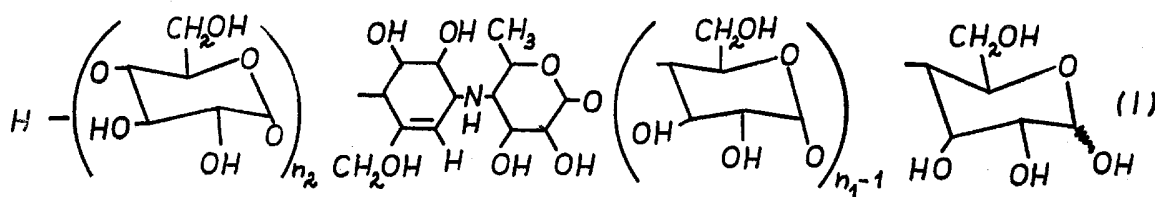
Příklad 19

3 jednolitrové Erlenmeyerovy baňky, které obsahují vždy 200 ml živného roztoku s obsahem 2 % škrobů, 1% glukózy, 0,5 % aminu NZ, 1 % kvasnicového extraktu a 0,4

procenta uhličitanu vápenatého (sterilace po dobu 30 minut při 121 °C, pH před sterilací upraveno na 7,2) se naočkovují vždy 2 ml výchozí kultury (získané ve stejném živném roztoku, očkované s agarem s ovesnými vločkami ze šikmých trubičkových kultur). Tyto baňky se kultivují při teplotě 28 °C na zakružovací třepačce. Po třídenní době kultivace se obsah všech tří baněk spojí a mycelium se oddělí na odstředivce. Získá se 425 mililitrů zbytku, který obsahuje 1100 AIE/ml, 0,17 MIE/ml a 1,0 SIE/ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby aminocukrových derivátů obecného vzorce I



kde

n_1 znamená číslo 1 až 7 a
 n_2 znamená číslo 1 až 7, přičemž součet n_1 a n_2 představuje číslo 2 až 8, vyznačující se tím, že se kultivují kmeny SE 50 (ATCC 31 042), SB 18 (ATCC 31 041), SE 82 (ATCC 31 045), SE 50/13 (ATCC 31 043) a

SE 50/110 (ATCC 31 044) rodu Actinoplanaceae aerob v pevném nebo tekutém živném prostředí, které obsahuje zdroj uhlíku a dusíku, stejně jako soli a prostředek zabráňující pění, při teplotě 15 až 45 °C a pH 5,0 až 8,5 a požadované sloučeniny se o sobě známým způsobem izolují.