

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

54176

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30 h, 2/03

Zgłoszono: 02.IV.1965 (P 108 225)

Pierwszeństwo: _____

MKP A 61 k

Opublikowano: 30.IX.1967

UKD

27/14

Współtwórcy wynalazku: Bogusław Borkowski, Zdzisław Kowalewski,
Mieczysław Łukaszewski, Aleksander Ożarowski

Właściciel patentu: Wrocławskie Zakłady Zielarskie „Herbapol”, Wrocław (Polska)

Sposób wyodrębniania helwetykozydu i korchorozydu A

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolowania glikozydów kardiotonicznych helwetykozydu i korchorozydu A z nasion pszonaka Perowskiego (*Erysimum perofskianum* Fisch et Mey).

Badając trzynaście różnych gatunków pszonaków B. Borkowski, J. Kozłowski i T. Wrociński (Biul. Inst. Rośl. Leczn. 3/1957/1) stwierdzili, że najsilniejsze działanie nasercowe posiada pszonak Perowskiego. Na tej podstawie Z. Kowalewski i in. (Helv. Chim. Acta 43 (1960), 957 i 1280) przeprowadzili szczegółowe badania nasion tej rośliny, identyfikując w nich szereg glikozydów, między innymi helwetykozyd i korchorozyd A. Opisany przez nich sposób izolowania ma jedynie wartość naukową.

Według patentu czechosłowackiego nr 92927 (1959) helwetykozyd otrzymuje się z ziela *Erysimum canescens* Roth poddając je siedmiodniowej fermentacji, a następnie ekstrakcji wodą. Połączone wyciągi wodne zagęszcza się i z pozostałości wyczerpuje glikozydy mieszaniną chloroformu z metanolem (3:1). Po oddestylowaniu rozpuszczalników, znajdujące się w suchej pozostałości glikozydy, rozdziela się przeciwnieprądowo w systemie: toluen-alkohol butylowy — woda (3:1:4). Wydajność 0,21% helwetykozydu.

Sposób według wynalazku polega na tym, że całe nasiona *Erysimum perofskianum* poddaje się najpierw trzydniowej fermentacji w temperaturze 35°, a następnie ekstrahuje glikozydy technicznym

metanolem lub etanolem 95%-owym. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika i rozcieńczeniu pozostałości wodą, wodny roztwór oczyszcza się przez wytrząsanie z benzenem lub czterochlorkiem węgla, po czym zobojętnia tlenkiem magnezu do pH = 6,5—7,0. Ma to na celu neutralizację kwasów organicznych oraz uchronienie helwetykozydu przed hydrolitycznym działaniem kwaśnego środowiska. Po odrzuceniu fazy organicznej zawierającej zanieczyszczenia, dodaje się do fazy wodnej chlorku sodowego i wyczerpuje glikozydy jednym z dwu sposobów: albo octanem etylu, który ekstrahuje wszystkie glikozydy zawarte w surowcu albo mieszaniną benzenu z acetonem w stosunku objętościowym 2:1, którą ekstrahuje się tylko monoheterozydy, głównie helwetykozyd i korchorozyd A.

Po oddestylowaniu rozpuszczalników otrzymuje się w obu przypadkach suche pozostałości. Znajdujące się w nich glikozydy rozdziela się przeciwnieprądowo stosując system rozpuszczalników: metanol-woda-octan etylu-benzen. Z połączonych faz górnych, po usunięciu rozpuszczalników, otrzymuje się helwetykozyd, zaś z faz dolnych po usunięciu rozpuszczalników ekstrahuje się korchorozyd A mieszaniną benzenu i acetonu w stosunku objętościowym 2:1. Odmiana sposobu według wynalazku polega na tym, że w przypadku prowadzenia selektywnej ekstrakcji glikozydów mieszaniną benzenu i acetonu (w stosunku objętościowym

wym 2:1) zamiast rozdzielu przeciwwądownego można rozdzielać glikozydy na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu, używając do ich eluowania mieszaniny acetonu z metanolem w stosunku objętościowym 92:8.

W sposobie według wynalazku korzystne jest to, że wykorzystuje się nasiona całe, nieodtłuszczone, fermentując je w temperaturze 35°, co skracając znacznie czas operacji i zwiększa istotnie wydajność. Korzystne również jest użycie metanolu technicznego, gdyż nie ekstrahuje on tłuszczów a jedynie glikozydy i nieznaczna tylko ilość zanieczyszczeń. Korzystną jest także możliwość selektywnego oddzielania helwetykozydu i korchorozydu A od innych glikozydów zawartych w surowcu mieszaniną benzenu z acetonem oraz przeciwwądownego rozdzielu glikozydów w systemie rozpuszczalników: metanol-woda-octan etylu-benzen. System ten można dostosować do rozdzielu glikozydów o różnej polarności, zmieniając w nim stosunek zawartości wody i octanu etylu. Wzajemny stosunek objętościowy składników tego systemu 0,5:4,5:4:1 okazał się najprzydatniejszy do wydzielania helwetykozydu i korchorozydu A. Korzystne wreszcie w sposobie według wynalazku jest to, że stosując jako selektywny eluent mieszaninę acetonu z metanolem, można rozdzielać oba glikozydy na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu.

Zależnie od przyjętego wariantu izolowania, wydajność helwetykozydu wynosi 0,26%—0,29%, zaś korchorozydu A 0,155%—0,175% w przeliczeniu na powietrznie suchy surowiec.

Czystość produktu końcowego bada się na drodze chromatografii cienkowarstwowej na talku (J. Żurkowska, A. Ożarowski — *Planta Med.* 12 (1964), 222), zaś ilościowo oznacza się kolorymetrycznie po uprzednim rozdzieleniu na bibule. W obu rodzajach chromatografii fazą rozwijającą jest mieszanina benzenu, octanu etylu i amidu mrówkowego (J. Żurkowska, A. Ożarowski — *Acta Pol. Pharm.* 22 (1965) nr 2).

Przykład I. 100 g nasion *Erysimum perofskianum* zwilżono 100 ml wody i poddano trzydniowej fermentacji w termostacie w temperaturze 35°. Następnie nasiona ekstrahowano czterokrotnie, biorąc każdorazowo po 1000 ml metanolu technicznego i pozostawiając na 24 godziny przy okresowym mieszanu. Połączone wyciągi metanolowe zagęszczono w temperaturze do 45° pod zmniejszonym ciśnieniem, przy końcu destylacji dodając 100 ml wody i usunięto resztę metanolu. Wodną pozostałość, około 200 ml, oczyszczono przez trzykrotne wytrząsanie po 100 ml benzenu lub czterochloru węgla. Do oczyszczonej wodnej pozostałości dodano najpierw 0,5 g tlenku magnezu i pozostawiono do ustalenia pH = 6,5—7,0, następnie do roztworu wodnego dodano 30 g chlorku sodu, po czym ekstrahowano pięciokrotnie octanem etylu, biorąc każdorazowo po 100 ml.

Połączone wyciągi octanu etylu (500 ml), w którym znajdują się wszystkie glikozydy, osuszono bezwodnym siarczanem sodu, przesączono i oddestylowano rozpuszczalnik. Otrzymaną suchą pozostałość rozpuszczono w 50 ml mieszaniny metanolu i wody (0,5:4,5) i poddano rozdzielu przeciwwą-

prądowemu stosując mieszaninę: metanol-woda-octan etylu-benzen (0,5:4,5:4:1). Z połączonych faz górnych po oddestylowaniu rozpuszczalników otrzymano syropową pozostałość, którą po dodaniu 4 ml wody pozostawiono do krystalizacji. Wydajność 0,29% helwetykozydu.

Z połączonych faz dolnych (1500 ml) oddestylowano metanol, do wodnej pozostałości (około 1300 ml) dodano 65 g chlorku sodu i ekstrahowano mieszaniną benzenu i acetonu (2:1), biorąc trzykrotnie po 3 l. Po oddestylowaniu rozpuszczalników sucha pozostałość zawierała czysty korchorozyd A. Wydajność 0,155%.

Przykład II. Postępując jak w przykładzie 1, do 200 ml oczyszczonej wodnej pozostałości dodano 0,5 g tlenku magnezu, pozostawiono do ustalenia się pH = 6,5—7,0 po czym rozpuszczono w fazie wodnej 10 g chlorku sodowego. Następnie przeprowadzono selektywną ekstrakcję glikozydów mieszaniną objętościową benzenu i acetonu (2:1) biorąc dwukrotnie po 600 ml i raz 300 ml. Do fazy organicznej przeszła mieszanina helwetykozydu i korchorozydu A, zaś w fazie wodnej pozostały uboczne, bardziej polarne glikozydy. Wyciągi benzenowo-acetonowe osuszono bezwodnym siarczanem sodu, przesączono i oddestylowano z przesączu rozpuszczalniki w temperaturze do 45° i pod zmniejszonym ciśnieniem.

Otrzymaną suchą pozostałość rozpuszczono w 10 ml acetonu, wiano na kolumnę wypełnioną 20 g tlenku glinu, a następnie eluowano glikozydy mieszaniną objętościową acetonu z metanolem (92:8). Zebrano następujące frakcje: I frakcja (50 ml) zawierała sam korchorozyd A, II frakcja (około 150 ml) zawierała mieszaninę korchorozydu A i helwetykozydu, III frakcja (250 ml—300 ml) zawierała sam helwetykozyd. Frakcję III przerabiano tak samo jak fazę górną w przykładzie 1, otrzymując czysty helwetykozyd. Z frakcji II, po oddestylowaniu rozpuszczalników, otrzymano suchą pozostałość, którą rozpuszczono w 10 ml acetonu i zawrócono na tę samą kolumnę z tlenkiem glinu, eluując jak powyżej. Po zupełnym przerobieniu tej frakcji otrzymano korchorozyd A 0,160%, zaś helwetykozydu 0,26%.

Przykład III. Postępowano tak samo jak w przykładzie II do chwili gdy po oddestylowaniu mieszaniny benzenu z acetonem otrzymano suchą pozostałość zawierającą mieszaninę helwetykozydu i korchorozydu A. Tę suchą pozostałość poddano rozdzielu przeciwwądownemu w układzie metanol-woda-octan etylu-benzen (0,5:4,5:4:1) dokładnie w taki sposób jak opisano w przykładzie I. W połączonych fazach górnych znajdował się czysty helwetykozyd zaś w fazach dolnych korchorozyd A. Uzyskano 0,275% helwetykozydu i 0,175% korchorozydu A.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyodrębniania helwetykozydu i korchorozydu A przez ekstrakcję uprzednio sfermentowanych nasion pszonaka Perowskiego za pomocą metanolu technicznego lub etanolu 95%-owego i następne selektywne rozdzielanie

obydwu glikozydów za pomocą rozpuszczalników organicznych **znamienny tym**, że z metanolowego lub etanolowego ekstraktu glikozydów oddestylowuje się rozpuszczalnik a pozostałość po rozcieńczeniu wodą wytrząsa się z benzenem lub z czterochlorkiem węgla i zobojętnia do wartości $\text{pH} = 6,5-7,0$, po czym po odrzuceniu fazy organicznej, z fazy wodnej uprzednio zadanej chlorkiem sodowym ekstrahuje się wszystkie obecne w surowcu glikozydy za pomocą octanu etylu albo tylko monoheterozydy a więc głównie helwetykozyd i korchorozyd A za pomocą benzenu i acetonu a następnie oddestylowuje rozpuszczalnik, a suchą pozostałość ekstrahuje przeciwwąadowo mieszaniną rozpuszczalników metanol-woda-octan etylu-benzen, po czym z fazy górnej po usunięciu rozpuszczalnika wydziela się helwetykozyd a z fazy dolnej po usunięciu rozpuszczalnika ekstrahuje korchorozyd A mieszaniną benzenu i acetonu a następnie oddestylowuje mieszaninę rozpuszczalników.

2. Odmiana sposobu według zastrz. 1 **znamienna**

tym, że z monoheterozydów wyekstrahowanych mieszaniną benzenu i acetonu w stosunku objętościowym 2:1 oddziela się helwetykozyd od korchorozydu A na drodze rozdzielu na kolumnie z Al_2O_3 i przez kolejne eluowanie helwetykozydu i korchorozydu A mieszaniną acetonu i metanolu, w której stosunek objętościowy składników wynosi 92:8.

3. Sposób według zastrz. 1—2 **znamienny tym**, że monoheterozydy ekstrahuje się z fazy wodnej mieszaniną benzenu i acetonu, w której stosunek objętościowy składników wynosi 2:1.

4. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że ekstrakcję przeciwwąadową prowadzi się za pomocą mieszaniny metanolu, wody, octanu etylu i benzenu zawierającej wymienione składniki w stosunku objętościowym 0,5:4,5:4:1.

5. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że korchorozyd A ekstrahuje się z fazy dolnej pochodzącej z rozdzielu przeciwwąadowego mieszaniną benzenu i acetonu, w której stosunek objętościowy składników wynosi 2:1.