

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWAURZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

63340

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 25.X.1967 (P 123 220)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 25.IX.1971

Kl. 12 o, 26/01

MKP C 07 g, 3/00

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej LudowejWspółtwórcy wynalazku: Arnold Adamiec, Bogdan Rakowski, Janina
Żurkowska, Łucja PilchWłaściciel patentu: Kutnowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa” Przed-
siębiorstwo Państwowe, Kutno (Polska)Sposób otrzymywania produktów odbudowy digilanidów takich,
jak digitoksyna, gitoksyna, digoksyna i/lub ich mieszaniny

1

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania produktów odbudowy digilanidów takich jak digitoksyna, gitoksyna, digoksyna i/lub ich mieszaniny. Substancje te wchodzi w skład preparatów, mających szerokie zastosowanie w praktyce klinicznej przy leczeniu schodzeń w przypadkach niewydolności krążenia pochodzenia sercowego, zwłaszcza w przewlekłej niedomodze serca, jak i przy przerostym mięśniu sercowym.

Wiadomo, że substancje te można otrzymywać kilkoma sposobami na drodze hydrolizy alkalicznej kompleksu digilanidów ABC, w wyniku której w cząsteczkach poszczególnych digilanidów następuje odszczepienie grupy acetylowej, oraz na drodze hydrolizy enzymatycznej, w wyniku której w powstałych cząsteczkach poszczególnych dezacetylodigilanidów następuje odszczepienie cząsteczki glikozy. Ale podczas gdy hydroliza grup acetylowych w cząsteczkach digilanidów lub acetylodigitoksyny, acetylogitoksyny i acetylodigoksyny w łagodnych warunkach środowiska alkalicznego zachodzi stosunkowo łatwo i nie następuje trudności, to hydroliza enzymatyczna cząsteczki glikozy w cząsteczkach digilanidów lub ich dezacetyloodpowiedników przebiega jedynie przy zastosowaniu odpowiednich enzymów, a przy tym prowadzenie procesu jest bardzo skomplikowane, uciążliwe i w skali przemysłowej stwarza wiele trudności. Najbardziej dostępnym źródłem enzymów, pod wpływem których następuje odszczepienie cząsteczki glikozy od

2

steček poszczególnych digilanidów, są liście Digitalis lanata lub Digitalis purpurea.

Według jednego ze znanych sposobów liście Digitalis lanata ekstrahuje się kilkakrotnie za pomocą organicznych rozpuszczalników w celu usunięcia z nich glikozydów, garbników i innych zanieczyszczeń. Liście po wyekstrahowaniu i odsączeniu stanowią preparat enzymatyczny, który zawiera znaczną ilość zanieczyszczeń, utrudniających prawidłowy przebieg hydrolizy enzymatycznej, wyizolowanie otrzymanych produktów, ich oczyszczanie itp.

Również niekorzystne wyniki przynosi stosowanie związków ołowiu do oczyszczania ekstraktów digilanidowych, ponieważ osady tych związków adsorbują znaczne ilości produktu, a poza tym odsączają się bardzo trudno. W rezultacie długotrwałych i pracochłonnych operacji oraz zużywania znacznej ilości rozpuszczalników wydajność procesu jest niska.

Według innego sposobu wyjściowym materiałem do otrzymywania produktów odbudowy digilanidów są liście Digitalis lanata, które obok pełnego kompleksu digilanidów A, B i C zawierają również enzymy zdolne do odszczepiania cząsteczki glikozy od cząsteczek poszczególnych digilanidów. Liście te ekstrahuje się za pomocą wody, przy czym ekstrahowane digilanidy pod wpływem zawartych w liściach enzymów tracą cząsteczkę glikozy i przechodzą odpowiednio w acetylodigitoksynę, acetylogitoksynę i acetylodigoksynę, które w toku dalszych

operacji poddaje się hydrolizie alkalicznej. Jednakże i ten sposób jest mało przydatny ze względu na długotrwałe i uciążliwe operacje, nadmierne zużycie rozpuszczalników, trudności przy oczyszczaniu ekstraktów i niską wydajność końcowych produktów.

Znane są również sposoby przeprowadzania hydrolizy enzymatycznej digilanidów za pomocą enzymów z pleśni i drobnoustrojów, z ślimaka *Helix pomatice*, z ślimaka winniczka itp. Jednak stosowanie tych sposobów do procesów w skali przemysłowej nie ma większego znaczenia.

Wynalazek ma na celu z procesu otrzymywania produktów odbudowy digilanidów na drodze hydrolizy enzymatycznej wyeliminowanie wprowadzania do reakcji dużych ilości liści, a z nimi różnych zanieczyszczeń, stosowania nadmiernych ilości rozpuszczalników i pracochłonnych operacji poprzez zastosowanie czystego kompleksu digilanidów A, B i C lub poszczególnych jego składników albo ich dezacetylopo pochodnych oraz łatwo dostępnych enzymów, zdolnych do szybkiego i pełnego odszczepiania cząsteczki glikozy od cząsteczek hydrolizowanych produktów.

Stwierdzono, że produkty odbudowy digilanidów takich jak digitoksyna, gitoksyna, digoksyna i/lub ich mieszaniny o wysokim stopniu czystości można otrzymywać w prosty sposób i z dobrymi wydajnościami, jeżeli mieszaninę digilanidów ABC lub ich dezacetylopowiedników albo poszczególne digilanidy A, B lub C albo też ich dezacetylopowiedniki podda się hydrolizie enzymatycznej w środowisku wodno-metanolowym o wartości $\text{pH} = 5-6$ w temperaturze $38-45^\circ\text{C}$ w ciągu 24 godzin za pomocą preparatu enzymatycznego, otrzymanego uprzednio ze zwierzęcego górnego odcinka przewodu trawienego wraz z jego treścią. W tym celu świeże odpady poubojowe zwierząt rzeźnych, składające się z górnego odcinka przewodu trawienego zwierzęcia wraz z jego treścią sieka się i maceruje za pomocą wody w ciągu około dwóch godzin w temperaturze pokojowej, po czym odciska na prasie lub odwirowuje na wirówce z perforowanym bęb-
nem.

Do otrzymanej mętnej cieczy dodaje się substancji buforującej typu fosforanowego, octanowego lub cytrynianowego i zakwasza do uzyskania wartości $\text{pH} = 5-6$. Uzyskuje się gotowy preparat enzymatyczny w postaci wodnej zawiesiny, nadający się do bezpośredniego zastosowania w procesie hydrolizy enzymatycznej digilanidów. Można również otrzymać według wynalazku preparat enzymatyczny w postaci stałej. W tym celu mętną ciecz po maceracji posiekanych odpadów poubojowych odwirowuje się, a otrzymany osad osusza w acetonie.

W dalszym toku postępowania według wynalazku mieszaninę digilanidów A, B i C lub ich poszczególne składniki albo też ich dezacetylopowiedniki w roztworze wodno-metanolowym wprowadza się do przygotowanej uprzednio wodnej zawiesiny preparatu enzymatycznego o wartości $\text{pH} = 5-6$ i miesza w temperaturze $38-45^\circ\text{C}$ w ciągu 24 godzin. Po tym czasie masę poreakcyjną przesącza się i ewentualnie alkalizuje w celu przeprowadzenia hydrolizy alkalicznej znajdującego się w roztworze

produktu i przesącza, po czym przesącz wysala solą kuchenną, a wydzielony osad odsącza, oczyszcza i ewentualnie rozdziela na poszczególne składniki.

Niżej podane przykłady wykonania sposobu według wynalazku wyjaśniają bliżej jego istotę, nie ograniczając zakresu wynalazku.

Przykład I. 1,5 kg świeżych odpadów poubojowych zwierząt rzeźnych, stanowiących górny odcinek przewodu trawienego z jego treścią, sieka się i miesza z 1,5 litra wody w ciągu 2 godzin w temperaturze pokojowej, a następnie odciska na prasie i do otrzymanej mętnej cieczy dodaje buforu octanowego i mieszaninę zakwasza kwasem octowym do uzyskania wartości $\text{pH} = 5,2$. Uzyskuje się gotowy preparat enzymatyczny w postaci wodnej zawiesiny nadający się do bezpośredniego przeprowadzenia enzymatycznej hydrolizy cząsteczki glikozy w cząsteczkach digilanidów lub ich dezacetylopowiedników.

Przykład II. 10 kg świeżych odpadów poubojowych zwierzęcych z górnego odcinka przewodu trawienego wraz z treścią sieka się i maceruje za pomocą 5 litrów wody w temperaturze pokojowej w ciągu 2 godzin po czym odciska na prasie lub odwirowuje na wirówce z perforowanym bęb-
nem. Uzyskaną mętną ciecz przenosi się na szybkoobrotową wirówkę i zawieszę odwirowuje. Osad z wirówki miesza się z 300 ml wody destylowanej i powstałą papkę wprowadza do 3 litrów oziębionego acetonu, dokładnie miesza i osad odsącza, przemywa acetonem i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 30 g preparatu w stanie suchym, który nadaje się do dłuższego przechowywania w temperaturze $0-5^\circ\text{C}$.

Przykład III. Postępuje się jak w przykładzie II z tym, że świeżo otrzymany preparat enzymatyczny w postaci wodnej zawiesiny mętnej zadaje się siarczanem amonu, a wydzielony osad preparatu enzymatycznego odsącza się, osusza acetonem i suszy.

Przykład IV. Do świeżo przygotowanego preparatu enzymatycznego w postaci wodnej zawiesiny, otrzymanego według przykładu I, wprowadza się roztwór wodno-metanolowy 1 g mieszaniny digilanidów A i B, zawierającego 60% digilanidu A i około 30 procent digilanidu B. Masę reakcyjną miesza się i utrzymuje w temperaturze $38-45^\circ\text{C}$ w ciągu 24 godzin. Po tym czasie masę poreakcyjną alkalizuje się w celu przeprowadzenia hydrolizy grupy acetylowej w powstałych cząsteczkach acetylodigitoksyny i acetylogitoksyny, a następnie produkt poreakcyjny zakwasza się kwasem octowym do uzyskania wartości $\text{pH} = 5,5$, dodaje 150 g soli kuchennej i ogrzewa do temperatury 80°C w ciągu pół godziny. Wydzielony osad odsącza się, przemywa wodą i suszy. Otrzymany osad ekstrahuje się 3 razy po 50 ml suchego chloroformu. Z zebranych ekstraktów oddestylowuje się chloroform do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskuje się 0,6 g czystego produktu o zawartości 80 procent digitoksyny i 10 procent gitoksyny.

Przykład V. Do zawiesiny 6 g suchego preparatu enzymatycznego, otrzymanego według przykładu II, w 900 ml destylowanej wody o wartości

pH = 5,2, nastawionej za pomocą buforu fosforanowego wprowadza się roztwór wodno-metanolowy dezacetylodigilanidu C, otrzymany z 1,5 g digilanidu C na drodze hydrolizy alkalicznej, o wartości pH = 5,0. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w temperaturze 38–45°C przy silnym mieszaniu w ciągu 24 godzin. Po tym czasie do mieszaniny poreakcyjnej dodaje się 300 g soli kuchennej, a po jej rozpuszczeniu 2 litry metanolu i po dokładnym wymieszaniu przesącza. Z przesącza oddestylowuje się metanol, a z pozostałości wyodrębnia otrzymaną digoksynę i oczyszcza na drodze krystalizacji. Uzyskuje się 0,65 g czystego produktu o zawartości 95 procent digoksyny.

Przykład. VI. Do świeżo przygotowanego preparatu enzymatycznego w postaci mętnej zawiesiny wodnej, otrzymanego według przykładu I, wprowadza się wodno-metanolowy roztwór 2,5 g dezacetylodigilanidu C. Mieszaninę reakcyjną utrzymuje się w temperaturze 38–45°C w ciągu 24 godzin przy ciągłym mieszaniu. Po tym czasie dodaje się 1 kg soli kuchennej, miesza do rozpuszczenia się soli i do powstałej mieszaniny wprowadza 5 litrów metanolu, dokładnie miesza, po czym przesącza. Z przesącza oddestylowuje się metanol pod zmniejszonym ciśnieniem, wydzielony osad odsącza i oczyszcza na drodze krystalizacji. Otrzymuje się 1,8 g czystej digoksyny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania produktów odbudowy digilanidów, takich jak digitoksyna, gitoksyna, di-

goksyna i/lub ich mieszaniny, z digilanidów A, B i C na drodze ich dezacetylowania za pomocą hydrolizy alkalicznej oraz odszczepiania cząsteczki glikozy za pomocą hydrolizy enzymatycznej, **znamienny tym**, że mieszaninę digilanidów lub dezacetylodigilanidów A, B i C lub poszczególne digilanidy albo dezacetylodigilanidy poddaje się hydrolizie enzymatycznej w środowisku wodno-metanolowym o wartości pH = 5–6, do którego dodano preparat enzymatyczny, otrzymany z górnego odcinka przewodu trawiennego wraz z jego treścią, stanowiący odpad poubojowy zwierząt rzeźnych, w temperaturze 38–45°C w ciągu 24 godzin przy ciągłym mieszaniu, po czym w przypadku stosowania jako substratu digilanidów, zawierających grupę acetylową, masę poreakcyjną poddaje się w znany sposób reakcji hydrolizy alkalicznej, a następnie z mieszaniny poreakcyjnej wyodrębnia końcowe produkty, oczyszcza je i ewentualnie rozdziela na poszczególne składniki.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się preparat enzymatyczny, otrzymany przez posiekanie górnego odcinka przewodu trawiennego zwierząt rzeźnych wraz z jego treścią, zmacerowanie go wodą w temperaturze pokojowej i odcisnięcie maceratu na prasie i następnie albo przez dodanie do odcieku substancji buforującej typu fosforanowego, octanowego lub cytrynianowego i zakwaszenie uzyskanego produktu do wartości pH = 5–6 albo przez wyodrębnienie osadu z odcieku za pomocą odwirowania, zawieszenie uzyskanego osadu w acetonie i wysuszenie.