

Warszawa, 8 lutego 1934 r.

COTC 173/02

URZĄD PATENTOWY



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 19284.

Kl. 12 o, 26/01.

Chemische Fabrik vormals Sandoz
(Bazylea, Szwajcaria).

Sposób otrzymywania krystalicznych glukozydów naparstnicy.

Zgłoszono 6 kwietnia 1932 r.

Udzielono 28 października 1933 r.

Pierwszeństwo: 13 kwietnia 1931 r. (Niemcy).

W patencie francuskim Nr 712282 opisano sposób, zapomocą którego z naparstnicy (*Digitalis lanata*) otrzymuje się jednorodnie krystalizujący glukozydowy preparat naparstnicowy, którego własności nie ulegają zmianie przy powtórnej krystalizacji i wytrącaniu z rozmaitych rozpuszczalników, wskutek czego ciało to uważano za produkt jednorodny. Jednakże dokładniejsze badania, przeprowadzone od tego czasu nad tym preparatem, wykazały nieoczekiwane, że stanowi on mieszaninę, którą zapomocą procesu frakcjonowania można rozłożyć na 3 dotychczas nieznane, izomorficznie krystalizujące glukozydy nasercowe. Glukozydy te w dalszym ciągu opisu oznaczane będą literami

A, B, C, zaś krystaliczna ich mieszanina wyjściowa zwana będzie krystaliczną mieszaniną glukozydów.

Sposób otrzymywania 3-ch krystalicznych glukozydów A, B, C polega na tem, że roztwór krystalicznej mieszaniny glukozydów w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, nie mieszającym się z wodą, a więc w chloroformie lub estrze octowym, do którego w celu zwiększenia stężenia roztworów dodano organicznego rozpuszczalnika, mieszającego się z wodą, a więc alkoholu, metanolu albo acetonu, wytrząsa się z wodą, poczem, oddzielwszy wytwarzające się warstwy frakcji glukozydowych, dobiera się odpowiednie warunki stężeń i powtarza wytrząsanie,

prowadząc to frakcjonowanie aż do otrzymania frakcji, nie zmieniających swych właściwości przy dalszem powtarzaniu procesu. A zatem proces polega na wyzymskaniu rozmaitego podziału 3 glukozydów *A*, *B*, *C* między dwa nie mieszające się ze sobą rozpuszczalniki, z których jeden jest rozpuszczalnikiem organicznym, nie mieszającym się z wodą, drugi zaś stanowi przeważnie środowisko wodniste.

Rozdzielanie mieszaniny glukozydów naparstnicy na różne frakcje zapomocą podziału między 2 nie mieszające się ze sobą rozpuszczalniki nie jest nowe. Np. w patencie niemieckim Nr 514 096 alkoholowo-wodny roztwór mieszaniny naturalnych glukozydów naparstnicy wytrząsa się z chloroformem, otrzymując rozmaite frakcje. Rozfrakcjonowaniu poddaje się jednak surowy niekrystaliczny wyciąg z naparstnicy. Natomiast wynalazek niniejszy ma na celu rozfrakcjonowanie już krystalicznego i jednorodnie wyglądającego produktu, aż do osiągnięcia niezmiennych właściwości poszczególnych frakcji. Dotychczas nie próbowano rozkładania jednorodnie krystalizującego preparatu naparstnicy na dalsze frakcje drogą podziału między 2 nie mieszające się rozpuszczalniki.

W celu wykonania sposobu według wynalazku roztwór krystalicznej mieszaniny glukozydowej w chloroformie, zawierającym alkohol metylowy, wytrząsa się z wodą i pozostawia przez pewien czas w spokoju. Tworzą się 3 warstwy, z których dolna *Chl* złożona jest z roztworu chloroformowego, górna *W* składa się z roztworu wodnego, zawierającego metanol, środkowa zaś *Z* składa się z substancji nierozpuszczonej. Dolna warstwa *Chl* jest wzbogacona w glukozyd *A*, co można poznać po tem, iż przy wykonaniu reakcji barwnej Kellera strefa barwna, tworząca się pod powierzchnią rozdziału, jest zabarwiona o wiele słabiej na czerwono, niż w

materiale wyjściowym. Jeśli dla frakcji, otrzymanej z roztworu chloroformowego, powtórzyć wytrząsanie jeszcze 3 do 4 razy, przerabiając stale dalej tylko dolną warstwę złożoną z roztworu chloroformowego, to ostatecznie otrzymuje się ciało, które przy reakcji Kellera wykazuje pod powierzchnią rozdziału strefę czysto brunatną, wolną zupełnie od odcienia czerwonego i nie zmieniającą swych właściwości przy dalszem potwarzaniu frakcjonowania. Własności tak otrzymanego glukozydu *A* podane są nieco niżej.

Środkowa nierozpuszczalna warstwa *Z* zostaje wzbogacona w glukozyd *B*, który przy próbie Kellera można rozpoznać po silnem zabarwieniu czerwonym poniżej powierzchni rozdziału. Jeśli ten sam proces wytrząsania powtórzyć dla tej frakcji 3 do 4 razy, używając stale do dalszej przeróbki jedynie nierozpuszczonej warstwy pośredniej, to otrzymuje się ostatecznie ciało, którego własności przy dalszem frakcjonowaniu nie ulegają zmianie, a badane na reakcję Kellera wykazują pod powierzchnią rozdziału jasno czerwony pierścień. Własności tak otrzymanego glukozydu *B* podano nieco poniżej.

Górna warstwa wodna *W*, zawierająca metanol, zawiera główną ilość glukozydu *C* obok niewielkich ilości glukozydu *A* i nieco większej ilości glukozydu *B*. Oba glukozydy *A* i *B* można usunąć zapomocą kilkakrotnego wytrząsania z chloroformem, przyczem glukozyd *A* przechodzi do chloroformu znacznie łatwiej niż glukozyd *B*. Wytrząsanie prowadzi się dopóty, aż stwierdzony zostanie zanik strefy czerwonej, spowodowanej przy reakcji Kellera obecnością glukozydu *B*; w ten sposób otrzymuje się czysty glukozyd *C*, który przy dalszem frakcjonowaniu nie zmienia swych właściwości, a przy reakcji Kellera słabo różni się od glukozydu *A*, a więc poniżej powierzchni rozdziału wykazuje strefę brunatną bez odcienia czer-

wonego. Własności tak otrzymanego glukozydu C opisano nieco poniżej.

Sposób według wynalazku można również wykonać inaczej. Roztwór krystalicznej mieszaniny glukozydów w estrze octowym wytrząsa się z wodą w obecności metanolu dopóty, aż roztwór estrowy będzie zawierał jedynie tylko glukozyd A, co można rozpoznać po braku strefy czerwonej przy próbie Kellera. Wodne wyciągi, zawierające dodatek alkoholu metylowego oraz glukozydy B i C obok resztek glukozydu A, wytrząsa się z chloroformem aż do uwolnienia ich od glukozydu A i B, co można rozpoznać po braku strefy czerwonej przy próbie Kellera; wyciągi zawierają wtedy tylko czysty glukozyd C. Mieszaninę glukozydów A i B, otrzymaną z roztworów chloroformowych, można dalej rozdzielać, stosując ester octowy oraz sprawdzając zapomocą reakcji Kellera.

W podobny sposób do wykonania procesu według wynalazku można stosować również inne kombinacje rozpuszczalników. Oczywiście sposób według wynalazku można również stosować do krystalicznego materiału wyjściowego, otrzymanego z *Digitalis lanata* inaczej, niż to opisano w patencie francuskim Nr 712282, o ile tylko materiał ten zawiera 3 glukozydy A, B i C. Dalej użyty materiał wyjściowy nie musi być bardzo czysty, jak to ma miejsce w przypadku materiału otrzymanego według patentu franc. Nr 712282, lecz może również zawierać materiały balastowe w takiej ilości, któraby nie zakłócała stosunków podziału glukozydów między rozpu-

szczalniki. Otrzymane frakcje wymagają wtedy dalszego oczyszczania przez krystalizację, np. z metanolu albo alkoholu.

Opis 3 nowych glukozydów A, B i C.

Glukozyd A krystalizuje z metanolu i alkoholu w jednorodnych bezbarwnych, wąskich, cienkich płytkach o długości do 10 mm, wietrzących podczas suszenia na powietrzu albo w próżni. Jedna część tej substancji rozpuszcza się w zwykłej temperaturze w około 20 cz. metanolu, 40 cz. absolutnego alkoholu etylowego, 200 cz. octanu etylowego, 225 cz. chloroformu i 16000 cz. wody; właściwa skręcalność optyczna wynosi w roztworze dioksanowym

$$\left[\alpha \right]_D^{20^\circ\text{C}} = +24.5^\circ \text{ (c = 4)}, \text{ w } 95\% \text{ al-}$$

$$\text{koholu } \left[\alpha \right]_D^{20^\circ\text{C}} = +38.7^\circ \text{ (c = 1.88)}, \text{ wy-}$$

liczona w stosunku do substancji suszonej w 100° w bardzo wysokiej próżni. Przy reakcji barwnej Kellera glukozyd A wykazuje poniżej powierzchni rozdziału strefę brunatną bez odcienia czerwonego, zaś w octowym kwasie lodowatym barwi się niebiesko lub niebiesko-zielono. Hydroliza zapomocą rozcieńczonych kwasów mineralnych w roztworze wodno-alkoholowym daje jako aglukon wyłącznie digitoksygeninę.

Dotychczas znano tylko jeden krystaliczny glukozyd naparstnicy, zawierający jako aglukon wyłącznie digitoksygeninę; glukozydem tym była digitoksyna. Jednakże glukozyd A różni się od niej wyraźnie, jak to wynika z poniższego zestawienia.

	Digitoksyna	Glukozyd A
rozpuszczalność w chloroformie	w mniej niż 20 cz.	w około 225 cz.
rozpuszczalność w wodzie	w około 100 000 cz.	w około 16 000 cz.
właściwa skręcalność optyczna w roztworze dioksanowym (C = 4)	$\left[\alpha \right]_D^{20^\circ\text{C}} = + 8^\circ$	$\left[\alpha \right]_D^{20^\circ\text{C}} = + 24,5^\circ$
zawartość aglukonu	47,9% aglukonu (Cloetta)	37 — 38% aglukonu

Glukozyd *B* krystalizuje z metanolu i alkoholu w jednorodnych bezbarwnych wąskich blaszkach o długości do 10 mm, które podczas suszenia na powietrzu albo w próżni wietrzeją. Jedna część tej substancji rozpuszcza się w zwykłej temperaturze w około 15 cz. metanolu, w 40 cz. absolutnego alkoholu etylowego, 3500 cz. estru octowego, 550 cz. chloroformu. Właściwa skręcalność optyczna wynosi w 95% alkoholu $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = +34,8^\circ$ ($c = 1,91$) w stosunku do substancji wysuszonej w wysokiej próżni w temperaturze 100°.

Przy reakcji Kellera glukozyd *B* poniżej powierzchni rozdziału wykazuje jasno czerwony pierścień, a w kwasie lodowatym octowym barwi się niebiesko lub niebiesko-zielono. Hydroliza rozcieńczonemi kwasami mineralnemi w roztworze wodno-alkoholowym daje, jako aglukon, wyłącznie gitoksygeninę.

Dotychczas znano jeden glukozyd naparstnicy, zawierający jako aglukon wyłącznie gitoksygeninę, a mianowicie jest nim gitoksyna (bigitalina). Od niej jednakże glukozyd *B* różni się wybitnie, jak wynika z poniższego zestawienia.

	Gitoksyna (Bigitalina)	Glukozyd B
rozpuszczalność w metalonu	1 cz. w około 4500 cz.	1 cz. w około 15 cz.
właściwa skręcalność optyczna	nieczynna (Cloetta, Arch. exp. Pathol. und Pharmacol, 112, 273, 1926)	$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = + 34,8^\circ$
zawartość aglukonu	46,8% aglukonu	37—38% aglukonu.

Glukozyd *C* krystalizuje w metanolu i alkoholu w jednorodnych bezbarwnych wąskich cienkich blaszkach o długości do 10 mm, które podczas suszenia na powietrzu albo w próżni wietrzeją. Jedna część substancji rozpuszcza się w zwykłej temperaturze w około 20 cz. metanolu, w 45 cz. absolutnego alkoholu etylowego, w 3300 cz. estru octowego, 1500 cz. chloroformu i 17 cz. wody. Właściwa skręcalność optyczna w 95% alkoholu wynosi $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = 33,4^\circ$ ($c = 1,93\%$) w stosunku do substancji suszonej w wysokiej próżni w temperaturze 100°. Przy reakcji barwej Kellera glukozyd *C* daje pod powierzchnią rozdziału strefę brunatną bez

odcienia czerwonego, a w lodowatym kwasie octowym — zabarwienie błękitne lub błękitno-zielone. Hydroliza rozcieńczonemi kwasami mineralnemi w roztworze wodno-alkoholowym daje, jako aglukon, wyłącznie lanadigeninę (digoksygeninę).

Dotychczas znano tylko 2 krystaliczne glukozydy naparstnicy, zawierające jako aglukon wyłącznie lanadigeninę (digoksygeninę). Są to mianowicie lanadigina (C. Mannich Arch. der Pharmazie u. Ber d. deutschen pharmazeutischen Gesellschaft 268,453) i digoksyna (Smith Journal of the Chemical Society, marzec 1930, str. 508). Glukozyd *C* różni się jednakże od obu tych substancyj, jak wynika z poniższego zestawienia.

	Lanadigina	Digoksyna	Glukozyd C
rozpuszczalność w chloroformie	1 cz. w 300 cz.	prawie nierozp.	1 cz. w 1500 cz.
rozpuszczalność w wodzie	1 cz. w 600 cz.	—	1 cz. w 17000 cz.
zawartość aglukonu	około 45%	49,2%	37 — 38%

Jak już wspomniano w patencie franc. Nr 712282, metoda prób na żabach, opracowana przez Houghthon-Strauba nie nadaje się do dokładnego oznaczenia toksyczności bardzo czystych substancji na-

parstnicowych, ponieważ wartości otrzymane dla jednego i tego samego preparatu zbyt mocno się różnią. Metodą tą otrzymano następujące wartości działania:

dla nowego glukozydu A	250 tys. do 550 tys. j. żab. na 1 g,
" " "	B 200 tys. " 500 tys. j. żab. na 1 g,
" " "	C 200 tys. " 500 tys. j. żab. na 1 g.

Zgodniejsze wyniki dało oznaczenie toksyczności dla kota. Jako minimalne dawki śmiertelne znaleziono:

dla nowego glukozydu A	0,37 mg na 1 kg kota,
" " "	B 0,35 mg na 1 kg kota,
" " "	C 0,26 mg na 1 kg kota,
" digitoksyny	0,42 mg na 1 kg kota,

Przykład I. Roztwór 16 cz. krystalicznej mieszaniny glukozydów w mieszaninie 800 cz. metanolu i 4000 cz. chloroformu wytrząsa się mocno z 4000 cz. wody i pozostawia w spokoju przez pewien czas, przyczem tworzą się 3 warstwy: dolna — roztwór chloroformowy Chl_1 , środkowa Z_1 — nierozpuszczona substancja, nieco się rozplywająca, oraz górna — wodna W_1 , zawierająca metanol. Warstwę dolną Chl_1 zagęszcza się w próżni aż do połowy jej objętości, następnie miesza z 400 cz. metanolu i wytrząsa z 2000 cz. wody. Z pośród 3 warstw, tworzących się znowu podczas stania, warstwę dolną Chl_2 zateża się do połowy, miesza z 200 cz. metanolu i wytrząsa z 1000 cz. wody. Powtarza się ten zabieg jeszcze dwukrotnie, traktując za każdym razem dolną warstwę chloroformową Chl_3 i Chl_4 w podobny sposób, poczem z otrzymanego roztworu chloroformowego Chl_5 zapomocą stężenia w próżni wyosabia się glukozyd A, wolny od obu innych glukozydów B i C i wykazujący własności glukozydu A opisane powyżej.

Otrzymane wodne warstwy z zawartością metanolu łączy się z otrzymaną za

pierwszym razem górną warstwą W_1 i wytrząsa się 5 do 6 razy z tą samą objętością chloroformu, dzięki czemu usunięte zostają glukozidy A i B. Zapomocą zagęszczenia wodnego roztworu w próżni otrzymuje się glukozyd C o własnościach wskazanych powyżej.

Wyciągi chloroformowe zagęszcza się w próżni do sucha i otrzymaną stąd pozostałość łączy się z otrzymaną za pierwszym razem nierozpuszczoną warstwą pośrednią Z_1 .

Tak otrzymany preparat w sposób, opisany na początku tego przykładu, dzieli się między chloroform a wodę z metanolem, zaś występującą przytem nierozpuszczoną warstwę Z_2 traktuje się jeszcze 3 do 4 razy w zupełnie podobny sposób, obrabiając przytem warstwy pośrednie Z_3 , Z_4 i Z_5 zupełnie osobno dalej. W otrzymanej w ten sposób warstwie Z_6 , względnie Z_6 , znajduje się glukozyd B, uwolniony od glukozydów A i C i wykazujący własności opisane powyżej.

Pozostałe frakcje, będące jeszcze mieszaninami glukozydów, suszy się w próżni i ponownie poddaje obróbce według wy-

Przykład II. Roztwór 10 cz. krystalicznej mieszaniny glukozydów w mieszaninie 250 cz. metanolu i 5000 części estru octowego wytrząsa się z 5000 cz. wody. Po rozdzieleniu warstw warstwę estrową E_1 zatęża się w próżni w przybliżeniu do 3000 cz., następnie miesza się ze 150 cz. metanolu i wytrząsa z 3000 cz. wody. Po rozdzieleniu warstw warstwę estrową E_2 zagęszcza się znowu w przybliżeniu do 60% objętości, miesza z odpowiednią ilością metanolu i wytrząsa z wodą. W zupełnie podobny sposób frakcjonuje się dalej. Po dojściu do roztworu estrowego E_n , otrzymuje się po jego odparowaniu w próżni glukozyd A, wolny od glukozydów B i C, wykazujący własności zgodne z podanymi powyżej. Połączone wodne roztwory wytrząsa się, jak w przykładzie I, z chloroformem dotąd, aż będą zawierały glukozyd C, a następnie zatęża się w próżni. Tak otrzymany glukozyd C wykazuje własności zgodne z podanymi powyżej. Połączone roztwory chloroformowe zatęża się w próżni, a pozostałość frakcjonuje się dalej według przykładu I zapomocą chloroformu i mieszaniny wodno-metanolowej, przyczem stale przerabia się dalej tylko nierozpuszczalną warstwę pośrednią Z_1 do Z_4 . Otrzymana ostatecznie nierozpuszczalna warstwa pośrednia Z_n składa się z glukozydu B, wolnego od glukozydu A i C, i posiada własności zgodne z podaniami.

Pozostałe frakcje zatęża się w próżni i przerabia dalej według przykładu I lub II.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób otrzymywania krystalicznych glukozydów naparstnicy przez rozkład krystalizującej izomorficznie mieszaniny glukozydów między dwoma niedającymi się ze sobą mieszać rozpuszczalnikami, znamienny tem, że otrzymany z *Digitalis lanata* według patentu franc. Nr 712282, krystalizujący izomorficznie glukozyd naparstnicy rozpuszcza się w niedającym się mieszać z wodą chloroformie lub eterze octowym przy dodaniu metanolu, otrzymany roztwór wstrząsa z wodą i powstające 3 warstwy, z których każda zawiera przeważnie po jednym z nowych glukozydów w zwiększonej ilości, poddaje osobno na nowo temu samemu procesowi, aż wyosobnione glukozydy wykażą własności różne, dla każdego z nich odrębne i niezmiennie.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tem, że zamiast materiałów, otrzymanych według patentu franc. Nr 712282, stosuje się krystaliczne materiały, otrzymane z *Digitalis lanata* innemi sposobami i zawierające te same glukozydy oraz, ewentualnie, domieszki (materiały balastowe) w ilościach niezakłócających stosunku podziału glukozydów między rozpuszczalniki.

Chemische Fabrik
vormals Sandoz.

Zastępca: Inż. dypl. M. Zoch,
rzecznik patentowy.