



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

254050
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 19/44

(22) Prihlášené 26 05 86

(21) (PV 3839-86.Y)

(40) Zverejnené 16 04 87

(45) Vydané 15 11 88

(75)

Autor vynálezu

FUSKA JÁN ing. DrSc., BRATISLAVA, PROKSA BOHUMIL ing. CSc.,
HLOHOVEC, KHANDLOVÁ ALŽBETA, JUR pri Bratislave

(54) Spôsob prípravy acetyldigoxinu

1

2

Riešenie sa týka spôsobu prípravy acetyldigoxinu tak, že sa do tekutého média obsahujúceho zdroj uhlíka a dusíka naočkuje kultúra *Penicillium vermiculatum* Dang. CCM F-276 alebo *Aspergillus niger* CCM F-330, potom sa pridá 10–60 mg lanatozidu C na 100 ml pôdy a nechá sa kultivovať pri 26 až 30 °C po dobu 8 až 24 hodín. Filtrát vyfermentovanej pôdy sa extrahuje chlorovanými uhľovodíkmi, s výhodou chloroformom, extrakt sa zahustí a získaný pevný produkt sa prečistí rekryštalizáciou zo zmesi rozpúšťadiel chloroform : benzén. Filtrát pôdy možno extrahovať tiež esterami kyseliny octovej s výhodou octanom etylnatým.

Vynález sa týka spôsobu prípravy acetyldigoxinu selektívnou mikrobiálnou deglukozidáciou lanatozidu C pomocou mikroorganizmov *Penicillium vermiculatum* Dang. CCM F-276 alebo *Aspergillus niger* CCM F-330.

V predkladanom riešení sa uvádza spôsob prípravy acetyldigoxinu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa do živnej pôdy obsahujúcej zdroj uhlíka, organického a anorganického dusíka, naočkovanej kultúrou *P. vermiculatum* pridá lanatozid C (100 až 500 mg · L⁻¹) rozpustený v polárnom rozpúšťadle, s výhodou v dimetylformamide a kultivuje sa 8–24 hodín pri teplote 26–30 stupňov Celzia za stáleho miešania a prevzdušňovania. Po transformácii sa filtrát pôdy, ktorá obsahuje acetyldigoxin extrahuje chloroformom, získaný extrakt sa po vysušení, za zníženého tlaku zbaví rozpúšťadla a surový produkt sa rekryštalizuje zo zmesi rozpúšťadiel benzén : etanol (3 : 1). Na extrakciu látky z filtrátu možno takisto použiť ďalšie chlorované uhľovodíky s počtom uhlíkov 1–5 s výhodou dichlórmetán alebo estery kyseliny octovej s výhodou octan etylnatý.

Acetyldigoxin je biela kryštalická látka, u ktorej boli namerané nasledujúce hodnoty: t. t. 203–206 °C (rozklad), pre sumárny vzorec C₄₃H₆₆O₁₅ 823,0, vypočítané: C 62,75 perc. H 8,08 %, nájdené C 62,59 %, H 7,96 %. IČ (KBr) ν cm⁻¹: 3 410, 2 966, 2 943, 1 741, 1 720, 1 631, 1 457, 1 347. Kryštalická látka poskytla pri tenkovrstvej chromatografii na Silufole v sústavách benzén : etanol : voda (30 : 10 : 0,3) jednu škvrnu s hodnotami R_f 0,41 a v sústave octan etylnatý : metanol : voda (79 : 19 : 11) škvrnu s R_f 0,85. Dôkaz aglykonu sa robil po hydrolýze získanej látky s kyselinou sírovou. Pri tenkovrstvej chromatografii na Silufole^R v sústave benzén : octan etylnatý (1 : 1) poskytla látka jednu škvrnu s R_f 0,28 a v sústave octan etylnatý taktiež jednu škvrnu s R_f 0,11, ktoré boli identické so škvrnami získanými rovnakým postupom zo štandardu acetyldigoxinu.

V pokusoch použité kmene *P. vermiculatum* aj *A. niger* transformujú pridávaný lanatozid C veľmi selektívne, bez ďalších sprievodných metabolitov takmer kvantitatívne za 8–24 hodín.

V nasledujúcich príkladoch sú uvedené spôsoby transformácie lanatozidu C na acetyldigoxin.

Príklad 1

Do 25 varných baniek o objeme 500 ml pripraví sa pôda nasledujúceho zloženia: (g · L⁻¹) glukóza 20, kvasničný extrakt 5, sójová múka 5, NaCl 5, KH₂PO₄ 5, vodovodná voda 1 liter, pH 6,5–7,0. Pôda sa sterilizovala 15 minút pri 120 °C a po ochladení sa naočkovala 15 ml vegetatívneho inokula *Pe-*

nicillium vermiculatum. Kultivácia pri teplote 28 °C na rotačnej trepačke s 220 ot · min⁻¹. Po 24 hodinovej kultivácii sa do každej banky pridalo 30 mg lanatozidu C rozpusteného v 0,3 ml dimetylformamidu. Celkom sa v pokuse použilo 720 mg lanatozidu C. Transformácia sa ukončila v 20. hodine kultivácie, kedy bol pridávaný substrát takmer kvantitatívne transformovaný. Mycélium použitého mikroorganizmu sa oddelilo filtráciou, získaný filtrát (1,900 ml, pH 6,1), sa extrahoval trikrát za sebou chloroformom (v pomere 2 : 1), za neustáleho miešania po dobu 15–20 minút, pri laboratórnej teplote. Získané extrakty sa spojili, bezvodým síranom sodným vysušili a za zníženého tlaku zahustili. Po zahustení a ochladení na +4 °C sa vylúčil acetyldigoxin, ktorý sa oddelil filtráciou a premyl dietyléterom. Po pridaní dietyléru, ktorý sa získal po premytí prvého podielu surového produktu k matečným lúhom, vypadla ďalšia časť acetyldigoxinu. Získané surové produkty sa spojili a rekryštalizovali zo zmesi rozpúšťadiel chloroform : benzén (1 : 3). Celkom sa získalo 420 mg čistého acetyldigoxinu, čo predstavuje výťažok 62 % vzhľadom na použitý substrát.

Príklad 2

V pokuse sa použila pôda rovnakého zloženia ako v pokuse 1. Po 24 hodinovej kultivácii sa do pôdy pridalo 60 mg lanatozidu C na 100 ml pôdy. Transformácia sa ukončila v 24 hodine. Čirý filtrát (1,800 ml, pH 6,2) sa trikrát za sebou extrahoval octanom etylnatým (v pomere 2 : 1). Spojené extrakty po vysušení bezvodým síranom sodným sa zahustili a po ochladení na +4 °C sa vylúčil acetyldigoxin. K matečným lúhom sa pridal dvojnásobný objem dietyléru, čím sa získal ďalší podiel acetyldigoxinu. Surové produkty sa rekryštalizovali zo zmesi octan etylnatý : benzén (3 : 1). Celkom sa získalo 510 mg čistého acetyldigoxinu, čo predstavuje 63,7 % výťažok, vzhľadom k použitému substrátu.

Príklad 3

Postup biotransformácie lanatozidu C bol rovnaký ako je uvedený v príklade 1, ale vytvorený acetyldigoxin sa extrahoval dichlórmetánom. Výťažok vzhľadom k použitému substrátu bol 57,2 %.

Príklad 4

Postup biotransformácie bol rovnaký ako je uvedený v príklade 1, ale ako mikroorganizmus sa použil kmeň *Aspergillus niger* CCM F-330. Výťažok acetyldigoxinu vzhľadom k použitému substrátu bol 48,7 %.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob prípravy acetyldigoxinu vyznačujúci sa tým, že sa do tekutého média obsahujúceho zdroj uhlíka, organického a anorganického dusíka naočkuje kultúra *Penicillium vermiculatum* Dang. CCM F-276 alebo *Aspergillus niger* CCM F-330, pridá sa 10 až 60 mg lanatozidu C rozpusteného v polárnom rozpúšťadle na 100 ml pôdy, zmes sa kultivuje pri teplote 26 až 30 °C za stáleho miešania a vzdušenia po dobu 12 až 24 h, prefiltruje sa, získaný filtrát sa extrahuje organickými rozpúšťadlami, extrakt sa po vysušení zahustí a zvyšok sa kryštalizuje.

2. Spôsob podľa bodu 1 vyznačujúci sa

tým, že ako polárne rozpúšťadlo na rozpustenie lanatozidu C sa použije dimetylformamid.

3. Spôsob podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že filtrát po kultivácii sa extrahuje chlorovanými uhľovodíkmi s počtom uhlíkov 1 až 4, s výhodou chloroformom, alebo esterami kyseliny octovej s alkoholmi s počtom uhlíkov 1 až 3, s výhodou octanom etylnatým.

4. Spôsob podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že zvyšok po odparení extrahovadla sa kryštalizuje zo zmesi chloroform — benzén, alebo octan etylnatý — benzén.