



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

200173

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/26

(22) Přihlášeno 20 09 74

(21) (PV 6498-74)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 22 09 73
(P 23 47 782.9)

Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 30 11 79

(45) Vydáno 15 07 83

(72)

Autor vynálezu

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

(73)

Majitel patentu

BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT, LEVERKUSEN (NSR)

(54) Způsob výroby derivátů aminocukrů

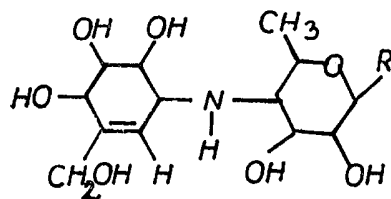
1

Vynález se týká způsobu výroby nových derivátů aminocukrů, které se užívají v lékařství zejména při cukrovce a proti otýlosti.

Je známo, že řada Actionomycet, především z čeledi Actionoplanaceae tvoří inhibitory hydroláz glykosidů, zejména těch, které štěpí uhlohydráty v zažívací soustavě. Jedna skupina těchto inhibitorů je poměrně stálá proti teplu a při teplotě místnosti stálá také proti kyselinám a zásadám. Tyto inhibitory náleží chemicky do skupiny oligosacharidů nebo polysacharidů a jejich derivátů.

Většina inhibitorů této skupiny jsou vysoce účinné inhibitory amylázy, avšak pouze středně účinné nebo slabé inhibitory sacharázy. (NSR vykládací spis č. 2 064 092).

Nyní bylo zjištěno, že je možno získat nové deriváty aminocukrů obecného vzorce



kde

R znamená oligosacharidový řetězec s 1

2

až 7 hexózovými jednotkami, vyznačující se tím, že se pěstují mikroorganismy čeledi Actinoplánaceae kmen SE 50/110 — CBS 674.73 ve vodném živném prostředí s obsahem zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí při pH 5,0 až 8,5 a teplotě 15 až 45 °C za aerobních podmínek a derivát aminocukru se po skončené fermentaci izoluje, a popřípadě se při výrobě sloučenin, v nichž R znamená 1 nebo 2 monosacharidové jednotky odbourávají sloučeniny, v nichž R znamená více než 2 monosacharidové jednotky enzymatickým způsobem inkubací s hydrolázami nebo hydrolýzou v kyselém prostředí za použití vodných roztoků anorganických kyselin.

Dále bylo zjištěno, že nové deriváty aminocukrů jsou silnými inhibitory hydroláz glykosidů v trávicí soustavě. Nižší členy této řady v nichž R znamená oligosacharidový řetězec s 1 nebo 2 hexózovými jednotkami inhibují zejména sacharázu, vyšší členy inhibují především amylázu.

Je překvapující, že nové deriváty aminocukrů podle vynálezu mají vyšší specifickou účinnost proti sacharáze a amyláze než dosud známé inhibitory. Je zvláště pozoruhodné, že některé z nových derivátů aminocukrů mají in vivo několikrát vyšší účinnost než in vitro.

Je zvláště překvapující, že nižší členy homologní řady podle vynálezu působí inhibiči resorpce glukózy in vivo. Vzhledem k těmto svým překvapujícím vlastnostem jsou nové deriváty aminocukrů podle vynálezu významným obohacením v lékařství.

K provádění způsobu podle vynálezu se užívají mikroorganismy řádu Actinomycetales, z čeledi Actinoplanaceae, a to zejména kmeny Actinoplanes. Jako příklady je možno uvést kmeny Actinoplanes SE 50 (CBS 961.70), SB 18 (CBS 957.70) a SE 82 (CBS 615.71). Tyto mikroorganismy jsou popsány již v jihoafrickém patentu č. 71/8677 a jsou uloženy pod čísly, která byla uvedena v závorkách v Centralbureau voor Schimmelcultures v Baarnu v Holandsku.

K provádění způsobu podle vynálezu je možno dále užít, jak je rovněž popsáno již v jihoafrickém patentu č. 71/8677 mutanty nebo varianty svrchu uvedených kmenů. Zvláště výhodné jsou z hlediska celkových výtěžků nových derivátů aminocukrů podle vynálezu a/nebo z hlediska velikosti zbytku R ve směsi derivátů aminocukrů, vytvořených v průběhu fermentace kmeny SE 50/13 (CBS 614.71) a SE 50/110 (CBS 674.73). Oba kmeny odpovídají vlastnostmi do značné míry původnímu kmenu SE 50. Tyto kmeny byly získány přirozeným výběrem z kmeny SE 50 bez použití mutagenů.

K provádění způsobu podle vynálezu je možno užít pevné nebo kapalné, zejména kapalné vodné živné prostředí, které obsahuje zdroje uhlíku, zdroje dusíku, anorganické soli a protipěnové činidlo ve vhodných koncentracích. Tyto koncentrace se mohou pohybovat v širokém rozmezí.

Jako zdroje uhlíku se užijí především uhlohydráty, zejména škroby, maltóza, glukóza nebo směsi dvou nebo tří těchto látek, nebo tyto komplexní směsi jako sladový extrakt.

Ze zdrojů dusíku je možno užít v mikrobiologii běžně užívané komplexní směsi jako například hydrolyzát kaseinu, extrakt z kvasnic, pepton, rybí moučka, extrakt z kuřice, extrakt z masa, rozpustný podíl z rybí moučky nebo směsi těchto látek i aminoskupiny a/nebo amonné soli.

Při provádění způsobu podle vynálezu se užije aerobní třepací kultury při stálém provzdušňování. Je možno užít také kultury v pevném fermentoru. Druh a koncentrace zdroje uhlíku závisí na použitém kmenu a na žádaném výsledném produktu, zejména pokud jde o požadovanou velikost zbytku R, a to do té míry, že volbou tohoto zdroje je možno získat v téměř čisté formě jednotlivé členy homologní řady. Mimoto bylo zjištěno, že v živných prostředích, která mají vyšší obsah škrobu než 2 % se tvoří především deriváty aminocukrů s 4 až 7 hexózovými jednotkami, přičemž pro tento typ fermentace je vhodný zejména kmen SE 50/13 (CBS 614.71). Obvykle stačí přidat k živnému prostředí, které již obsahuje například 3,5 % glukózy nebo základního zdro-

je uhlíku 0,1 až 3, s výhodou 0,5 až 2 % škrobu k získání směsi derivátů aminocukrů s obsahem 4 až 7 hexózových jednotek. Dále bylo zjištěno, že v živném prostředí, které je prosté škrobu a zejména po přidání maltózy a zejména při použití kmeny SE 50 (CBS 961.70) se tvoří zejména deriváty aminocukrů s obsahem 2 až 3 hexózových jednotek. Pro výrobu derivátů aminocukrů podle vynálezu, v nichž R = glukóza jsou zvláště vhodné takové živné roztoky, které obsahují glukózu jako jediný zdroj uhlíku. V případě, že živný roztok obsahuje glukózu v přebytku, tvoří se při další době fermentace také deriváty aminocukrů s delším řetězcem. Jde zřejmě o to, že v průběhu fermentace dochází k vyčerpání zdrojů dusíku současně s vyčerpáním glukózy. V případě, že se ze živného roztoku úplně vyloučí glukóza a jako zdroj uhlíku se užije maltóza, získá se převážně derivát aminocukrů s 2 hexózovými jednotkami. Čistou maltózu je v tomto případě možno nahradit levnější směsí, například přípravkem Maltzin, což je přírodní sladový extrakt firmy Diamalt AG, v Mnichově. Protože tento přípravek obsahuje větší množství maltotriózy, tvoří se v tomto případě současně i vyšší homology. Zvláště vhodným pro výrobu nižších homologů je kmen SE 50/110, s jehož použitím je možno při optimálním složení živného roztoku získat přibližně dvojnásobný výtěžek nižších homologů než při použití kmeny SE 50/13.

V průběhu fermentace se jinak může složení živného roztoku, zejména koncentrace zdrojů dusíku a složení anorganických solí, pohybovat v širokém rozmezí.

Živné prostředí se sterilizuje běžným způsobem. Živný roztok má nyní pH v rozmezí 5,0 až 8,5, s výhodou rozmezí 6,0 až 7,8. Teplota při fermentaci se pohybuje v rozmezí 15 až 45 °C, s výhodou v rozmezí 24 až 32 °C. Pro výrobu vyšších homologů při použití kmenů SE 50 a SE 50/13 je nejpříznivější užití vyšší teploty, například 28 °C, pro výrobu nižších homologů při použití kmenů SE 50 a SE 50/110 teplota nižší, například 24 °C. Fermentace trvá 1 až 8 dní, s výhodou 2 až 6 dní. Delší doba fermentace, zejména při použití přebytku uhlohydrátů vede k tvorbě vyšších homologů. Skončení fermentace se stanoví stanovením obsahu a účinnosti získaných produktů v enzymatických testech a chromatografií na tenké vrstvě, kterou se stanoví složení živného prostředí.

Nižší homology derivátů aminocukrů podle vynálezu je možno získat také odštěpením hexózových jednotek z vyšších homologů. Toto štěpení je možno provádět buď vodným roztokem kyselin, zejména 1 až 5 N anorganickými kyselinami při teplotách 50 až 100 °C, s výhodou při teplotním rozmezí 90 až 100 °C, reakce trvá 10 až 180 minut. Stejně homology je možno získat také inkubací s enzymy (hydrolázy), zejména s β -amylázami nebo α -amylázami, které nejsou

inhibovány nebo s amyloglukosidázami mikrobiálního původu, jako je například α -amyláza z *Bacillus subtilis* nebo inkubací s mikroorganismy, které jsou schopné růst v prostředcích, v nichž se získávají deriváty aminocukrů podle vynálezu v koncentraci 1 až 10 %, s výhodou 2 až 5 %, jako například *Aspergillus niger* (ATCC 11.394).

Izolace a čištění derivátů aminocukrů podle vynálezu buď z mikrobiálního živného prostředí nebo s kyselého hydrolyzátu, popřípadě z inkubačních směsí, v nichž se provádělo enzymatické a/nebo mikrobiální štěpení vyšších homologů derivátů aminocukrů se provádí obecně známými způsoby.

Způsoby zpracování se většinou řídí oblastí molekulové hmotnosti, do níž spadají látky, které mají být izolovány. U vyšších homologů je možno provádět srážení po předchozím odbarvení a odpaření roztoků.

Homology s nižší molekulovou hmotností je oproti tomu možno s výhodou izolovat adsorbci na aktivní uhlí při neutrálním pH s následnou desorbci, která se provádí směsí vody a alkoholu nebo acetonu, s výhodou o koncentraci 50 až 80 % acetonu. Úplně je možno dosáhnout desorpce při pH v oblasti 1,5 až 4, s výhodou 2 až 3.

V případě, že výchozí roztoky mají velmi tmavou barvu, je nutno je nejprve odbarvit před adsorbci sloučenin podle vynálezu, a to aktivním uhlím při kyselém pH v rozmezí 1 až 3 nebo pomocí nespecifických pryskyřic, například pryskyřice Lewapol R Ca 9221/0,35 mm průměru zrn (Bayer AG), v rozmezí pH 2 až 7, s výhodou 2 až 3. Aktivní uhlí váže v kyselém prostředí především barviva, kdežto Lewapol adsorbuje barviva bez adsorpce derivátů aminocukrů podle vynálezu při alkalickém pH.

K oddělení derivátů aminocukrů podle vynálezu od neaktivních sacharidů a dalších neaktivních sloučenin se využívá slabě zásadité povahy těchto složek. Homologní deriváty aminocukrů je možno vázat za vhodných podmínek, a to při pH 1 až 8, s výhodou 2 až 4, při nižší iontové síle roztoku, která odpovídá vodivosti nižší než 10 mS, s výhodou nižší než 2 mS na silně kyselé kationtoměniče, například na Dowex[®] 50 W (Dow Chemicals), v H⁺-formě. Zvláště dobře je možno vázat deriváty aminocukrů podle vynálezu z acetonového roztoku s obsahem 50 až 80 % acetonu při pH 1 až 5, s výhodou 2 až 4 na kationtoměniče, které za těchto podmínek mají pro tyto látky dostatečně vyšší kapacitu. S výjimkou případu, že roztok obsahuje méně než 50 % acetonu se sloučeniny váží také na slabě kyselé iontoměniče, například Amberlite IRC-50 v H⁺-formě.

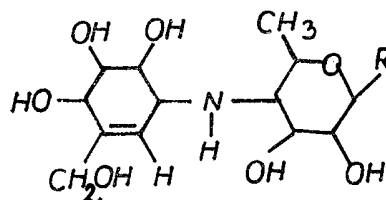
K desorbci derivátů aminocukrů podle vynálezu z kationtoměničů se užívá vodných roztoků zásad nebo kyselin, s výhodou amoniaku nebo kyseliny solné v koncentraci

0,01 až 1 N. Z desorbátu se získá derivát aminocukrů po neutralizaci odpovídajícím slabě kyselým nebo slabě zásaditým iontoměničem nebo odstraněním zásady nebo kyseliny odpařením ve vakuu v případě těkavé zásady nebo kyseliny, nebo odpařením roztoku lyofilizací, popřípadě vysrážením organickým rozpustidlem, s výhodou 10 až 20 objemy acetonu.

Dále je možno od sebe oddělit nízkomolekulární deriváty aminocukrů podle vynálezu od inertních sacharidů chromatografií na iontoměničích na podkladě celulózy, s výhodou fosfocelulózy (firma Serva, Heidelberg). K eluci se užívá pufrů, s výhodou fosforečných pufrů s nízkou iontovou silou, s výhodou 2 až 100 mM, zejména 5 až 10 mM v oblasti pH 2,5 až 8, s výhodou 5 až 6. Předpokladem pro účinnou frakcionaci je co nejnižší obsah soli v preparátu, který má být frakcionován, kdežto barviva jsou daleko méně na závalu frakcionace.

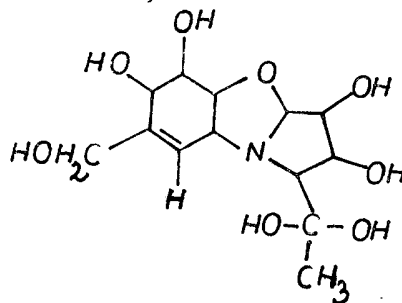
Jednotlivé členy homologní řady derivátů aminocukrů podle vynálezu je možno čistit například chromatografií částečně čistěných preparátů na vhodném molekulárním sítu, například při použití přípravku Bio-Gel R P-2, firma Bio-Rad, Mnichov, přičemž jednotlivé frakce eluátů se sledují chromatografií na tenké vrstvě. Frakce, které obsahují čisté deriváty aminocukrů se slíjí, znovu se chromatografují a po odpaření se lyofilizují nebo se srážejí pomocí organických rozpustidel, jak bylo svrchu popsáno.

Nové sloučeniny podle vynálezu náleží svou chemickou povahou do třídy uhlohydrátů. Tvoří homologní řady, jejichž základním členem je následující derivát aminocukru (C₁₉H₃₃O₁₃N), v němž R = hexóza.



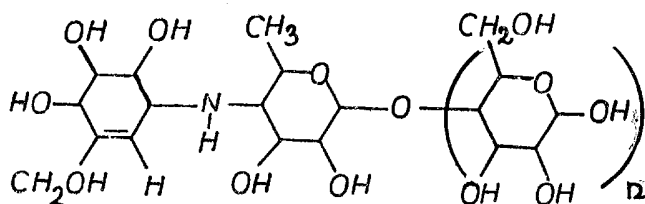
Vyšší členy homologní řady je možno od základního členu odvodit tak, že mimoto obsahují ještě jednotky monosacharidu, s výhodou hexózy, zvláště glukózy.

Všechny členy této homologní řady se dále vyznačují také tím, že při úplné kyselé hydrolýze vzniká složka I (C₁₃H₁₉O₇N) a odpovídající monosacharid. Pro složku I bylo odvozen následující vzorec.



Příkladem principu struktury homologní řady může být příklad, v němž oligosacharidový řetězec sestává z 1 až 7 glukózových

jednotek. V následujícím vzorci je uveden řetězec s $n = 1$ až 7 glukózových jednotek.



Základní člen řady se získá v případě, že $n = 1$ a označuje se jako složka II. Každý člen řady se liší od nejbližšího nižšího nebo od nejbližšího vyššího chybějící nebo přebývající glukózovou jednotkou.

Ve srovnání se složkou II je o jednu glukózovou jednotku vyšší člen řady označován jako složka III, o dvě glukózové jednotky vyšší člen jako složka IV atd.

Všechny tyto složky mají tu společnou vlastnost, že při úplné kyselé hydrolýze poskytují složku I a glukózu.

Složku II je možno popsat vzhledem k jejím fyzikálně chemickým vlastnostem, její struktuře a reaktivitě, následujícím způsobem:

Složka II je bezbarvá, amorfni pevná látka, která je dobře rozpustná, ve vodě, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu a v hydroxidech kovů. Za tepla je rozpustná také v ethanolech.

a) Chromatografie na tenké vrstvě

Rozpustidlo: ethylester kyseliny octové, hydroxid kovu a voda v poměru 10 : 6 : 4.

Užívá se běžně dodávaných fólií k provádění chromatografie na tenké vrstvě:

I. Silikagelové fólie F 1500 firmy Schleicher + Schüll

Hodnoty R _f : II	0,46
maltóza	0,50
glukóza	0,65

II. Silikagelové plotny F 254 firmy Merck

Hodnoty R _f : II	0,47
maltóza	0,54
glukóza	0,66

Složka II se na silikagelových plotnách nejlépe barví směsí dusičnanu stříbrného a hydroxidu sodného. Hnědočerné zbarvení vzniká již při teplotě místnosti nebo po slabém zahřátí.

b) Plynová chromatografie

K provádění plynové chromatografie se

složka II silyluje spolu s α - a β -D-glukózou nebo se sacharózou jako vnitřním standardem ve směsi pyridinu, trimethylchlorsilanu a N-methyl-trimethylsilyltrifluoracetamidu v poměru 1 : 0,5 : 1.

Sloupec:

skleněný sloupec o délce 6 stop plněný 3 % SE 30 na chromasorbu WAW

Teploty:

vstřikovací blok	300 °C
detektor	300 °C
pec 220 °C až do eluce vrcholu α - a β -D-glukózy, pak teplotní program 15 °C/min až do 300 °C.	

Detektor:

FIG (plamenový ionizační detektor)

Plyny:

nosný plyn: N ₂	40 ml/min
spalný plyn: vzduch	80 ml/min
H ₂	20 ml/min

Doba retence:

α -D-glukóza	3 min
β -D-glukóza	4 min
sacharóza	12 až 13 min
II	16 až 17 min

c) Úhel otáčení

Vzorek složky II, získaný odpařením methanolového roztoku složky II v nekrystalickém stavu se rozpustí ve vodě a stanoví se specifická otáčivost $[\alpha]_D = +134,3^\circ$.

d) Spektrum v infračerveném světle:

Spektrum ve formě KBr pelet je špatně rozlišitelné, hlavní absorpční pruhy jsou v oblasti skupiny O—H a C—O při pohybu valencí.

e) NMR-spektrum v CD_3OD při 220 MHz: (obr. 1)

ν ppm	Multiplicita	Relativní intenzita
1,3	dublety, $J = 6, 5\text{Hz}$	3 H
2,3	triplety, J_1 a J_2 8–10Hz	1 H
3,15	triplety, J_1 a J_2 7–9Hz	1 H
3,3 – 3,9	signály nelze jednotlivě přiřadit	12 H
4,13	AB-systém, $J = 12\text{Hz}$	2 H
4,48	dublety, $J = 7\text{Hz}$	1 H
5,1	dublety, $J = 2,5\text{Hz}$	
4,9	singlet	11 H protony, vyměněné za deuterium
5,0	dublety, $J = 2–3\text{Hz}$ (špatně rozlišitelné)	1 H
5,8	dublety, $J = 3–4\text{Hz}$ (špatně rozlišitelné)	1 H
		33 H

f) Acetylce složky II:

Složka II se převede ve směsi acetanhydridu a pyridinu v poměru 1 : 1 při teplotě místnosti na dekaacetylderivát o molekulové hmotnosti 903. V případě, že se reakce provádí ve směsi ethylesteru kyseliny octové a anhydridu kyseliny octové v poměru 1 : 1, za přítomnosti katalytických množství H_2SO_4 je možno zjistit kromě dekaacetylderivátu také tvorbu undekaacetylderivátu s molekulovou hmotností 945 při provádění hmotnostní spektroskopie.

NMR-spektrum dekaacetylderivátu: (obr. 2)

Hmotnostní spektrum dekaacetylderivátu:

vrchol pro molekulu
vrchol pro zásadu

903 (2,5 % relativní intenzity)
843

Důležité vrcholy pro fragmenty v uvedené oblasti hmotnostního spektra:

844 (55 % relativní intenzity)

784 (36 % relativní intenzity)
783 (34 % relativní intenzity)
759 (35 % relativní intenzity)
556 (36 % relativní intenzity)
496 (37 % relativní intenzity)
436 (29 % relativní intenzity)

g) Methylace složky II:

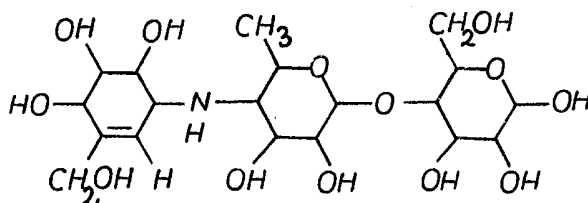
Methylací složky II směsí methyljodidu a hydridu sodíku v dimethylsulfoxidu způsobem podle Hakomoriho se získá jako hlavní produkt dekamethylderivát složky II, v malém množství také undekamethylderivát.

Hmotnostní spektrum:

vrchol pro molekulu
vrchol pro zásadu
2. vrchol pro molekulu

623 (6,1 % relativní intenzity)
535
637 (0,2 % relativní intenzity)

Podle spektroskopických údajů a chemických vlastností má složka II následující vzorec:



Složka II je směsí α - a β -formy, jak je možno prokázat zejména NMR-spektrém.

Dalším členem homologní řady je složka III ($\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{O}_{18}\text{N}$), kterou je možno podle jejích fyzikálně chemických vlastností, její struktury a reaktivity charakterizovat následujícím způsobem:

Složka II je amorfni pevná látka, dobře rozpustná ve vodě.

a) Chromatografie na tenké vrstvě:

Rozpustidlo:

ethylester kyseliny octové, hydroxid kovu a voda v poměru 10 : 6 : 4.

I. Silikagelové fólie F 1500 (Schleicher a Schüll):

Hodnoty Rf: složka III: 0,35
maltóza 0,50

II. Silikagelové plotny F 254 (Merck):

Rf-hodnoty: složka III 0,33
maltóza 0,54

III. se barví černohnědě směsí dusičnanu stříbrného a hydroxidu sodného již při teplotě místnosti nebo slabém zahřátí.

b) Spektrum v infračerveném světle:

Spektrum v infračerveném světle ve formě KBr-pelet je velmi špatně zřetelné a nesnadno se odečítá. Hlavní absorpční pruhy jsou v oblasti pohybu valencí O—H a C—O. (3700—3100 cm⁻¹ a 1180—950 cm⁻¹).

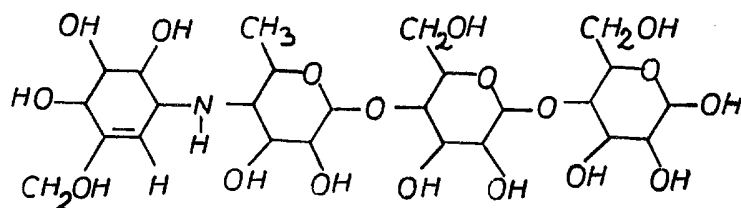
c) Úhel otáčení:

$[\alpha]_D$ ve vodě: + 147,2°

d) NMR-spektrum složky III v D₂O při 220 MHz je znázorněno na obr. 3.

e) Methylace podle Hakomoriho:

Methylací složky III methyljodidem a hyd-



Složka IV je dalším vyšším členem homologní řady. Tuto sloučeninu je možno parciální kyselou hydrolýzou rozštěpit na složku II a glukózu v poměru 1 : 2.

Chromatografie na tenké vrstvě:

Rozpustidlo:

n-butanol, ethanol a voda v poměru 50 : 30 : 20

K provádění chromatografie se užije silikagelových ploten F 1500 (Schleicher + Schüll):

Hodnota Rf pro glukózu: složka IV: 0,41 až 0,46.

Vyšší homology, zejména složky V až VIII inhibují sacharózu daleko méně a α -amylázu ze slinivky břišní daleko silněji než nižší členy řady (složky II až IV).

Při kyselé hydrolýze vyšších složek homologní řady je možno zjistit vždy nižší členy řady jako meziprodukty a mimoto glukózu a maltózu jako štěpné produkty.

ridem sodíku v dimethylsulfoxidu se získá jako hlavní produkt složka III, methylovaná 13.methylovými skupinami, v malém množství také 14.methylovými skupinami.

f) Hmotnostní spektrum methylovaného produktu:

Vrchol pro molekulu při 827 (1,5 % relativní intenzity) odpovídá sumárnímu vzorci C₃₈H₆₈NO₁₈. Při 841 se nachází druhý vrchol s 0,1 % relativní intenzity.

Nejdůležitější vrcholy pro fragmenty jsou:

739 (27 % relativní intenzity)
592 (3,7 % relativní intenzity)
535 (30 % relativní intenzity)
388 (9 % relativní intenzity)
386 (13 % relativní intenzity)
284 (13 % relativní intenzity)
187 (12 % relativní intenzity)
171 (40 % relativní intenzity)
101 (34 % relativní intenzity)
88 (25 % relativní intenzity)
75 vrchol pro zásadu

Pro složku III je s chemickými a spektroskopickými vlastnostmi ve shodě následující vzorec:

Chromatografie na tenké vrstvě:

Rozpustidlo:

n-butanol, ethanol, voda v objemovém poměru 50 : 30 : 20

Chromatografie se provádí na silikagelových plotnách F 1500 (Schleicher + Schüll):

^Rglukóza:

složka V: 0,30 až 0,34
složka VI: 0,21 až 0,23
složka VII: 0,14 až 0,16
složka VIII: 0,09 až 0,11

Specifické inhibiční účinky derivátů aminocukrů podle vynálezu je možno zjistit enzymatickými zkouškami, prováděnými in vitro.

Amylázový test

Amylázová inhibiční jednotka (1 AIE) je definována jako to množství inhibitoru, které inhibuje na 50 % dvě jednotky amylázy. Jedna amylázová jednotka (AE) je to množ-

ství enzymu, které rozštěpí za minutu za uvedených podmínek jeden mikroekvivalent glykosidické vazby škrobu. Mikroekvivalent rozštěpené sloučeniny se stanoví polarimetricky jako jeden mikroekvivalent vytvořeného redukujícího cukru pomocí kyseliny dinitrosalicylové a udává se pomocí maltózové cejchovací křivky jako ekvivalent mikroekvivalentu maltózy. K provádění testu se smísí 0,1 ml roztoku amylázy o koncentraci 20 až 22 AE/ml s 0 až 10 μ g inhibitoru nebo 0 až 20 μ l zkoumaného roztoku v 0,4 ml 0,02 M pufru s glycerofosfátem sodným/0,001 M CaCl_2 o pH 6,9 a směs se nechá dosáhnout rovnovážného stavu 10 až 20 minut ve vodní lázni o teplotě 35 °C. Pak se směs inkubuje 5 minut s 0,5 ml na 35 °C přehřátého 1% roztoku škrobu (rozpuštěný škrob firmy Merck, Darmstadt č. 1252) při teplotě 35 °C, načež se smísí s 1 ml kyseliny dinitrosalicylové (P. Benfeld v Colowick-Kaplan, Meth. Enzymol., sv. 1, str. 149). Ke vzniku zabarvení se zkouška zahřívá 5 minut na vroucí vodní lázni, pak se zchladí a smísí s 10 ml destilované vody. Extinkce při 540 nm se měří proti slepé zkoušce bez amylázy. Vyhodnocení se provádí podle předem stanovené amylázové cejchovací křivky tak, že se odečte na této křivce účinnost amylázy, která ještě zbývá po přidání inhibitoru a z výsledku se vypočítá procentuální inhibice užité amylázy. Tato inhibice se nanáší jako funkce kvocientu

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

⁺ vztaženo na sušinu

⁺⁺ AE ve vzorku bez inhibitoru stejné série

Z křivky se odečte bod pro 50 % inhibice a výsledek se přepočítá na AIE/mg inhibitoru.

Sacharázový test

Sacharázová inhibiční jednotka (SIE) je definována jako to množství inhibitoru, které inhibuje dvě sacharázové jednotky na 50 %. Sacharázová jednotka (SE) je to množství enzymu, které za 1 minutu za uvedených podmínek rozštěpí 1 μ mol sacharózy na glukózu a fruktózu. Mikromoly vytvořené glukózy se kvantitativně stanoví pomocí glukózooxidázové reakce za podmínek, při nichž již nemůže dojít působením sacharázy k dalšímu štěpení sacharázy. Zkouška se provádí tak, že se smísí 0,05 ml na 0,12 SE upraveného roztoku sacharázy s 0 až 20 mikrogramy inhibitoru nebo 0 až 20 mikrolitry zkoumaného roztoku a doplní se na 0,1 ml 0,1 M pufrém s maleinanem sodným o pH 6,0. [Užije se rozpustná sacharáza ze sliznice tenkého střeva vepře, připravená podle publikace B. Brogström, A. Dahlquist, Acta Chem. Scand. 12, (1958), str. 1997. Tato

sacharáza se ředí na odpovídající obsah SE 0,1 M pufrém s maleinanem sodným o pH 6,0.]. Zkouška se nechá dosáhnout rovnovážného stavu 10 minut při teplotě 35 °C a pak se smísí s 0,1 ml na 35 °C přehřátého roztoku sacharózy o koncentraci 0,05 M v 0,1 M pufru s maleinanem sodným o pH 6,0. Směs se inkubuje 20 minut při 35 °C a pak se sacharázová reakce zastaví přidáním 1 ml glukózooxidázového činidla a směs se dále inkubuje 30 minut při 35 °C. [Glukózooxidázové činidlo se připraví rozpuštěním 2 mg glukózooxidázy [Boehringer č. 15 423] ve 100 ml 0,565 M tris-HCl-pufru o pH 7,0 a pak se přidá 1 ml roztoku detergentia [2 g tritonu X 100 + 8 g 95% analyticky čistého ethanolu], 1 ml roztoku dianisidinu s obsahem 260 mg o-dianisidinu X 2 HCl ve 20 ml vody a 0,5 ml 0,1% vodného roztoku peroxidázy firmy Boehringer č. 15 302]. Pak se přidá 1 ml 50% kyseliny sírové a při 545 nm se měří extinkce proti odpovídající slepé zkoušce. Při vyhodnocení se vypočítá procentuální inhibice použité sacharázy a pomocí cejchovací křivky se propočítá SIE/g, popřípadě SIE/litr.

Maltázový test

Maltázová inhibiční jednotka (MIE) je definována jako to množství inhibitoru, které inhibuje dvě maltázové jednotky na 50 %. Maltázová jednotka (ME) je to množství enzymu, které za 1 minutu za uvedených podmínek rozštěpí 1 mikromol maltózy na 2 mikromoly glukózy. Mikromoly vytvořené glukózy se stanoví kvantitativně pomocí glukózooxidázové reakce za podmínek, při nichž již nemůže dojít k dalšímu štěpení maltózy maltázou. Tato zkouška se provádí tak, že se spolu smísí 0,05 ml roztoku maltázy, upraveného na obsah 0,060 až 0,070 ME s 0 až 20 mikrogramy inhibitoru nebo s 0, až 20 mikrolitry zkoumaného roztoku a zkouška se doplní na objem 0,1 ml 0,1 M pufrém s maleinanem sodným o pH 6,0. Zkouška se nechá stát k dosažení rovnovážného stavu při teplotě 35 °C a pak se smísí s 0,1 ml na 35 °C přehřátého 0,05 M roztoku maltózy v 0,1 M pufru s maleinanem sodným o pH 6,0. [Užije se solubilizovaná maltáza ze sliznice tenkého střeva vepře podle publikace B. Borgström, A. Dahlquist, Acta Chem. Scand. 12, (1958), str. 1997. Tato maltáza se ředí 0,1 M pufrém s maleinanem sodným o pH 6,0 na odpovídající obsah ME]. Směs se pak inkubuje dalších 20 minut při teplotě 35 °C, načež se maltázová reakce zastaví přidáním 1 ml glukózooxidázového činidla a směs se inkubuje dalších 30 minut při teplotě 35 °C. [Příprava glukózooxidázového reagensu se provádí tak, jak bylo uvedeno při popisu sacharázového testu.]. Pak se přidá 1 ml 50% kyseliny sírové a extinkce se měří při 545 nm proti odpovídající slepé zkoušce.

K vyhodnocení se vypočítá procentuální inhibice použité maltázy a pomocí glukózové cejchovací křivky se vypočítá množství, které inhibuje 50 % a toto množství se přepočítá na MIE/g, popřípadě na MIE/litr.

Výsledky inhibičních enzymatických testů

n = počet hexóзовých jednotek	AIE/g	SIE/g	MIE/g
derivát aminocukru o			
n = 1	300 000	30 000	5 000
n = 2	300 000	68 000	15 000
n = 3	1 400 000	21 000	5 000
n = 4–6	17 500 000	8 500	—
n = 5–7	30 000 000	2 500	—

Jak je z tabulky zřejmé, stoupá specifická účinnost proti α -amyláze ze slinivky břišní se stoupající molekulovou hmotností v homologní řadě velmi prudce. V oblasti $n = 5$ až 7 je možno pozorovat 100násobné zvýšení účinnosti in vitro oproti účinnosti derivátu aminocukru, v němž $n = 1$ nebo $n = 2$. Na druhé straně je inhibice sacharázy u derivátu o $n = 2$ nejsilněji vyjádřena, derivát, v němž $n = 1$ inhibuje tuto účinnost pouze z polovice a u vyšších derivátů dochází k poklesu specifické účinnosti proti sacharáze.

In vivo probíhá účinnost derivátů podle vynálezu proti sacharáze při testu se zatížením sacharázou přibližně souběžně s průběhem specifické účinnosti in vitro. Při zatížení organismu škrobem in vivo bylo zjištěno, že deriváty aminocukrů, v nichž $n = 1, 2$ a 3 mají 10 až 40násobně vyšší účinnost ve srovnání s účinkem proti amyláze in vitro. (Tyto skutečnosti jsou podrobněji uvedeny v příkladu 18, tabulky 1, 3, 4 a 5.)

Je známo, že u zvířat i u lidí dochází po použití potravin, které obsahují uhlohydráty, například po požití obilovin, bramborového škrobu, zeleniny, ovocné šťávy, piva nebo čokolády ke zvýšení hladiny krevního cukru, která je způsobena rychlým odbouráváním uhlohydrátu hydrolázou glykosidů, například amylázami z tenkého střeva a slinivky břišní, maltázami a sacharázami podle schématu

amyláza maltáza
škrob nebo glykogen → maltóza → glukóza

sacharáza
sacharóza → glukóza + fruktóza

Toto zvýšení hladiny krevního cukru je u diabetiků zvláště silné a trvá velmi dlouho. U otlých působí zvýšení hladiny krevního cukru po jídle zvláště silné vyměšování inzulínu, což opět vede ke zvýšené tvorbě tuku a sníženému odbourávání tuku. Po tomto zvýšení hladiny krevního cukru dochází jak u normálních osob, tak u osob otlých v důsledku sekrece inzulínu často k násled-

in vitro pro jednotlivé homology svrchu uvedené homologní řady a účinnosti jednotlivých homologů řady derivátů aminocukrů podle vynálezu jsou uvedeny v následující tabulce, v níž hexóзовé jednotky znamenají glukózové jednotky.

němu snížení hladiny krevního cukru. Je známo, že tato hypoglykemie podporuje výrobu žaludeční šťávy, která může vyvolat zánět žaludeční sliznice, žaludeční vřed nebo dvanáctníkový vřed nebo zhoršovat tyto choroby v případě, že již vznikly.

Nyní bylo zjištěno, že inhibitory hydroláz glykosidů, vyrobené a izolované způsobem podle vynálezu snižují zvýšenou hladinu krevního cukru po zatížení krys/lidí pšeničtiny inzulínu i následné snížení hladiny krevního cukru po zatížení krys/lidí pšeničným škrobem, sacharózou nebo maltózou, přičemž podporují průchod těchto uhlohydrátů žaludkem. Mimoto snižují vstřebávání glukózy ve střevě. Dále dochází i ke snížení nebo zhoršení přeměny uhlohydrátů na lipidy tukové tkáně a ke zhoršenému včlenění tuku, přijatého v potravě do zásobní tukové tkáně.

Dále je známo, že uhlohydráty v dutině ústní, zvláště sacharóza se štěpí působením mikroorganismů, čímž dochází ke vzniku zubního kazu.

Inhibitory hydroláz glykosidů jsou tedy vhodné pro použití k léčebným účelům v následujících indikacích:

Otylost, zvýšená hladina lipidů v krvi (arterioskleróza), cukrovka, předdiabetes, zánět žaludeční sliznice, žaludeční vřed, dvanáctníkový vřed a zubní kaz.

Dávky

Podává se 30 až 300 000 AIE/kg nebo 1 až 10 000 SIE/kg jednou nebo několikrát denně před a/nebo mezi a/nebo po jídle nebo pití perorálně.

Lékové formy

Dražé, tablety, kapsle, roztoky, suspenze, granuláty, žvýkačka, zubní pasta nebo jako přísada k potravinám a/nebo poživatinám s obsahem uhlohydrátů.

Toxicita inhibitorů hydroláz glykosidů podle vynálezu a látek, brzdících vstřebávání glukózy je velmi malá. Účinná látka z příkladu 9 jako surový inhibitor o 26 000 SIE/g

byla snášena stejně jako účinné látky z dalších příkladů v dávce 340 000 SIE/kg u myši i u krysy při perorálním podání bez jakýchkoli příznaků. Při nitrožilních injekcích u myši byla snášena dávka 10 000 SIE/kg bez příznaků.

Velmi výhodné jsou kombinace inhibitorů podle vynálezu se známými perorálními antidiabetiky (β -cytotropními deriváty sulfonylmočoviny a/nebo biguanidy, které ovlivňují hladinu krevního cukru).

Dále uvádíme podrobnější vysvětlení použitých reakčních činidel a pomocných látek:

Z iontoměníčů je možno užít například běžně dodávaných produktů, jako jsou Amberlite IRA 410 Cl^- (aniontoměníč), Amberlite IRC 120 v H^+ -formě (silně kyselý kationtoměníč), Amberlite (HCO_3^- -formě) (aniontoměníč), Amberlite IRA 410 OH^- (silně zásaditý aniontoměníč), Amberlite IRC 50 v H^+ -formě (slabě kyselý kationtoměníč), všechno výrobky firmy Rohm a Haas, dále Dowex 50 WX 4H^+ (silně kyselý kationtoměníč), výrobek firmy Dow Chemical Co. Midland, Michigan, USA.

Z aniontoměníčů na podkladě celulózy je možno užít například DE AE-celulózu firmy Schleicher a Schüll.

Jako polyakrylamidového gelu je možno užít například přípravku Biogel-P-2 (firma Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA).

Přípravek Maltzin je přírodní sladový extrakt firmy Diamalt AG, Mnichov (NSR).

Lewapol[®] je nespecifická adsorpční pryskyřice firmy Bayer AG, Leverkusen (NSR).

Clarcel je pomocný prostředek pro filtraci firmy CECA, Velizy-Villacoublay (Francie).

SE 30 je silikonový elastomer firmy Hewlett Packard.

V následujících příkladech představují hexózové jednotky glukózové jednotky.

Příklad 1

V jednotlivých příkladech se užívá jako výchozí látku přípravek, který je možno vyrobit následujícím způsobem:

Ve skleněném fermentoru se očkuje 8 litrů živného roztoku o složení 5,0 % škrobu, 1,0 % extraktu z kvasnic, 0,2 % K_2HPO_4 3 dny starou třepací kulturou kmene SE 50/13 (CBS 614.71) a fermentor se pak provzdušňuje 3 dny při teplotě 28 °C za současného intenzivního míchání, čímž se získá fermentační prostředí o koncentraci 105 000 AIE/ml.

6 litrů tohoto fermentačního prostředí se po zchlazení na teplotu 20 °C upraví na pH 2,5 použitím kyseliny dusičné o koncentraci 50 %, k živnému prostředí se přimísí 30 g aktivního uhlí (Carboraffin) a směs se míchá 10 minut, načež se odstřeďuje 15 minut při 10 000 otáčkách za minutu a čirý, světle žlutý supernatant se po neutralizaci amoni-

kem odpaří na objem 500 ml. 500 ml tohoto koncentráту se míchá 45 minut s 200 g přípravku Amberlite IRA 410 Cl^- , směs se zfiltruje za současného odsávání a pak se smísí se 4/5 svého objemu = 400 ml methanolu za účelem vysrážení převážné části vysokomolekulárních produktů odbouráváním škrobů a zbytky aktivního uhlí. Pak se směs odstřeďuje 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu a 850 ml takto získaného supernatantu se po kapkách přidá za intenzivního míchání do 4 litrů bezvodého ethanolu. Bílá, vločkovitá sraženina se zfiltruje za odsávání, promyje se 3X bezvodým ethanolem a 2X etherem a pak se usuší ve vakuu při teplotě 50 °C. Výtěžek je 36 g bílého prášku o koncentraci 10×10^6 AIE/g.

Příklad 2

K posouzení výsledného produktu fermentace a ke stanovení složení tohoto přípravku se provádí chromatografie na tenké vrstvě tak, že se nanese 1 mikrolitr fermentačního prostředí nebo 1 mikrogram preparátu na fólie ze silikagelu (firma Schleicher a Schüll, Dassel, typ F 1500) a fólie se vyvíjí 2X v soustavě n-butano/ethanol/voda v poměru 50 : 30 : 20.

K vybarvení sacharázy a ke stanovení její inhibice se postříká vyvinutá a dobře usušená plotna enzymatickým gelem (20 ml při použití plotny o rozměru 20 x 20 cm) a gel se nechá ztuhnout. Pak se 5 minut plotna předběžně inkubuje ve vlhké komoře při teplotě místnosti a nakonec se postříká substrátovým gelem. Po ztuhnutí této druhé vrstvy gelu se plotna přenesie do vlhké komory a inkubuje při teplotě 40 °C. Inhibice se projeví světlými skvrnami na červenohnědém pozadí, tyto skvrny se vyvinou po 60 až 90 minutách. Jakmile dojde k optimálnímu vybarvení inkubace se přeruší a plotna i s vrstvami agarů se usuší fénem teplým vzduchem.

Příprava gelu

Enzymatický gel: 1,5 g agarózy (L'Industrie Biologique Francie) se uvede v suspenzi ve 100 ml 0,2 M pufru s maleinanem sodným o pH 6,0 a rozpustí se povařením. Čirý agarový roztok se zchladí na teplotu 50 °C a smísí s 250 mikrolitry roztoku Tritonu X — 100 (2 g Tritonu X—100 + 8 g analytický čistého ethanolu) a 0,5 ml roztoku dianisidinu (20 mg dianisidin/1 ml acetonu) převrácením. Přímě před upotřebením gelu se přidá ještě 1 ml reakčního činidla GOD/POD (12,5 mg glukózooxidázy, stupeň čistoty I, firma Boehringer, č. 15423 a 2,5 mg peroxidázy, stupeň čistoty II, firma Boehringer, č. 15302, rozpuštěno v 5 ml maleinanového pufru) a 4 až 5 sacharázových jednotek z tenkého střeva vepře, vyrobených tak, jak je uvedeno svrchu u sacharázového testu. Gel je možno udržovat až do nastříkání na teplotě 50 °C, jinak tuhne již v trysce.

Substrátový gel: 0,5 g agarózy se uvede v suspenzi ve 100 ml pufru s maleinanem sodným o pH 6,0 a rozpustí se povařením. Pak se směs zchladí na teplotu 50 °C smísí se se 100 mikrolitry Tritonu (2 g Tritonu X-100 + 8 g analyticky čistého ethanolu) načež se přidá 1 g sacharózy (Seeva č. 35579). Po rozpuštění sacharózy je gel připraven k použití.

K vybarvení inhibice amylázy se postříká vyvinutá a usušená deska pro chromatografii na tenké vrstvě amylázovým gelem v množství 20 ml na plotnu o rozměru 20 X 20 cm a gel se nechá ztuhnout. Pak se deska předběžně inkubuje 5 minut při teplotě místnosti a přenesse do 0,5% roztoku škrobu (1 g škrobu Merck č. 1252 ve 200 ml 0,2 M glycerofosforečnanového pufru s 0,01 M CaCl_2 o pH 6,9, rozpustí se povařením], v tomto roztoku se ponechá 2 minuty při teplotě 40 °C. Pak se plotna dobře opláchne deslovanou vodou a k vybarvení neodbouraného škrobu se přenesse do zředěného roztoku jodu (4 ml základního roztoku jodu na 500 ml vody, základní roztok jodu sestává z 2,2 g I_2 + 4,4 g KI v 100 ml vody). Po 1 minutě je vybarvení optimální, deska se ihned vyfotografuje, protože modré skvrny rychle mizí.

Příprava amylázového gelu

1 g agarózy se rozpustí ve 100 ml 0,2 M pufru s glycerofosforečnanem sodným a 0,01 M CaCl_2 -pufru o pH 6,9 při teplotě 100 °C, po zchlazení na 50 °C se přidá 100 mikrolitrů Tritonu X-100 2 g Tritonu X-100 + 8 g analyticky čistého ethanolu]. Těsně před postříkáním se přidá 100 mikrolitrů suspenze krystalické amylázy (10 mg amylázy ze slinivky vepře/ml v roztoku síranu amonného firmy Boehringer č. 15017).

Příklad 3

Erlenmeyrova baňka o obsahu 1 liter s obsahem 120 ml živného roztoku, sestávajícího z 4 % škrobu, 2,4 % glukózy, 0,9 % hydrolyzátu kaseinu a 0,9 % extraktu z kvasnic o pH 7,8, nastavený hydroxidem sodným se smísí s 0,4 % uhličitanu vápenatého a sterilizuje se 30 minut při teplotě 121 °C, načež se očkuje 3 ml předběžné kultury kmene SE 82, který byl vypěstován v živném roztoku, který byl vyroben z 2 % škrobu, 1 % glukózy, 0,5 % hydrolyzátu kaseinu a 1 % extraktu z kvasnic, po smísení těchto složek bylo pH upraveno hydroxidem sodným na hodnotu 7,2 a pak bylo přidáno ještě 0,4 % uhličitanu vápenatého a prostředí pak bylo 30 minut sterilizováno při 121 °C, naočkováno a fermentace pak probíhala 5 dní při teplotě 28 °C na rotační třepačce, čímž bylo získáno fermentační prostředí s obsahem 122 tisíc AIE/ml. Mycelium se oddělilo od živného prostředí odstředěním při 12 000 otáčkách za minutu, pH 300 ml filtrátu kultury

se upraví kyselinou dusičnou o koncentraci 50 % na hodnotu 2,5 a směs se míchá 10 minut s 2,5 g aktivního uhlí. Po oddělení aktivního uhlí odstředěním při 12 000 otáčkách za minutu se roztok neutralizuje na pH 6 pomocí 10 N hydroxidu draselného a smísí se se 300 ml methanolu, nechá se krátkou dobu stát a vytvořená sraženina se pak oddělí odstředěním při 12 000 otáčkách za minutu. Supernatant se po kapkách přidá ke 3 litrům ethanolu, sraženina se izoluje po krátkém stání odstředěním při 12 000 otáčkách za minutu promyje se 2 X absolutním ethanolom a jednou etherem a pak se suší ve vakuu, čímž se získá 2,23 g produktu o koncentraci $1,45 \times 10^6$ AIE/g, produkt obsahuje i více než 95 % vyšších homologů derivátů aminocukrů o $n > 4$.

Příklad 4

Do Erlenmeyrovy baňky o obsahu 1 liter se vlije 120 ml živného roztoku o složení 3,5 % glukózy, 2 % škrobu, 0,5 % hydrolyzátu kaseinu, 1,3 % extraktu z kvasnic, 0,3 % CaCO_3 a 0,3 % K_2HPO_4 , pH se upraví před sterilizací na 7,8 a obsah baňky se pak sterilizuje 30 minut při teplotě 121 °C, načež se očkuje 6 ml předběžné kultury kmene SE 50/110 v živném prostředí, které obsahuje 3 % sójové mouky, 3 % glycerinu a 0,2 % CaCO_3 , fermentace se provádí 3 až 4 dny na rotační třepačce při teplotě 24 °C, čímž se získá fermentační prostředí s obsahem 153 tisíc AIE/ml a 1 220 SIE/litr.

1 liter tohoto fermentačního prostředí se upraví na pH 2,5 kyselinou dusičnou, nechá se s 5 g aktivního uhlí 10 minut a pak se 30 minut odstřeďuje při 5 000 otáčkách za minutu, načež se neutralizuje přidáním 25 g přípravku Amberlite IRA 410 v OH^- formě. Neutrální roztok se odpaří na objem 100 ml, smísí se se 100 ml methanolu a zfiltruje se. Filtrát se vmíchá do 2 litrů absolutního ethanolu, vytvořená sraženina se oddělí filtrací za odsávání, promyje se 3 X acetonem a etherem a usuší se ve vakuu.

Tímto způsobem se získá 14 g bílého prášku o koncentraci 5×10^6 AIE/g s obsahem převážně homologů o $n > 4$.

Příklad 5

Postupuje se stejně jako v příkladu 4, přidá se však ještě 0,5 % škrobu, čímž se po fermentaci trvající 4 dny získá fermentační prostředí s obsahem 40 000 AIE a 184 SIE/ml. Živné prostředí obsahuje homology, v nichž $n = 1$.

Příklad 6

Do Erlenmeyrovy baňky o obsahu 1 liter se vlije 120 ml živného roztoku o složení 3 % glukózy, 0,6 % hydrolyzátu kaseinu, 1,6 % extraktu z kvasnic, 0,3 % CaCO_3 , 0,3 procent K_2HPO_4 , pH se upraví před sterili-

zací hydroxidem draselným na 7,8 a baňka se očkuje předběžnou kulturou kmene SE 50/110 podle příkladu 4 a fermentace se provádí 4 dny při 24 °C na rotační třepačce, čímž se získá fermentační prostředí o 10 800 SIE/litr s obsahem převážně účinných látek $n = 1$.

5 litrů filtrátu kultury, odděleného od mycelia při 13 000 otáčkách za minutu se upraví na pH 2,5 50% kyselinou dusičnou a míchá se 15 minut s 55 g aktivního uhlí Merck a 200 g přípravku Clarcel. Směs se zfiltruje za odsávání, neutralizuje koncentrovaným amoniakem na pH 7, odpaří na objem 1,5 litru a vysráží 5násobným množstvím ethanolu. Vločkovitá sraženina se oddělí v průtokové odstředivce při 12 000 otáčkách za minutu, žlutavý supernatant se odpaří na 150 ml a opět odstředí. 50 ml roztoku se nanesou na sloupec Amberlitu IR-12 (30 × 300 mm, 30 ml vody za hodinu). Jakmile ze sloupce vyjde celkem 300 ml eluátu s obsahem inertních sacharidů a podílu neadsorbovaného inhibitoru převede se iontoměnič s 400 ml vody do kádinky a přidá se koncentrovaný amoniak do pH 11,5. Po 30 minutách dalšího míchání se iontoměnič oddělí, roztok se odpaří na 1/20 objemu, zfiltruje přes sloupec Amberlitu IRA 410 v HCO_3^- formě o rozměru 20 × 150 ml při průtokové rychlosti 30 ml za hodinu, shromáždí se 500 ml eluátu, který se odpaří, čímž se získá po lyofilizaci 1,3 g surového produktu.

K dalšímu čištění se podrobí preparát frakcionaci na přípravku Bio-gel P-2 100 až 200 mesh (firma Bio-Rad, Mnichov). Užije se sloupce 50 × 450 mm a vody při průtokové rychlosti 400 ml/hodina, odebírají se frakce po 10 ml. Všechny frakce se zkouší anthronovou metodou na uhlohydráty a sa-

charázovým testem na inhibitory. Frakce s obsahem inhibitoru sacharázy se zkoumají chromatografií na tenké vrstvě podle příkladu 2 na obsah jednotlivých složek. Frakce, obsahující derivát $n = 1$ se slíjí, odpaří a lyofilizují, čímž se získá 35 mg derivátu aminocukru $n = 1$ o koncentraci $0,3 \times 10^6$ AIE/g a 30 000 SIE/g.

Příklad 7

Do Erlenmeyerovy baňky o obsahu 1 litr se vlije 120 ml živného roztoku o složení 5 % škrobu, 1 % extraktu z kvasnic, 0,2 % K_2HPO_4 a baňka se očkuje 2 ml předběžné kultury z příkladu 4, čímž se po 3 dnech fermentace při 28 °C získá fermentační prostředí s následujícím obsahem inhibitoru amylázy:

Kmen	AIE/ml
SE 50	37 000
SE 50/13	109 000
SE 50/110	53 500

Inhibitory amylázy jsou převážně deriváty aminocukru $n \geq 4$.

Příklad 8

Do Erlenmeyerovy baňky o obsahu 1 litr se vlije 120 ml živného roztoku o složení 1,3 % maltózy, 3,5 % glukózy, 0,5 % hydrolyzátu kaseinu, 1,3 % extraktu z kvasnic, 0,3 % CaCO_3 , 0,3 % K_2HPO_4 a baňka se očkuje 2 ml předběžné kultury z příkladu 4, čímž se po 4 denní fermentaci na rotační třepačce při 24 °C a při použití různých kmenů získají následující výtěžky:

Kmen	SIE/ml	AIE/ml
SE 50	25	580
SE/50/13	14,8	1 460
SE 50/110	57,9	755

Inhibitorem je převážně derivát aminocukru $n \leq 4$.

Příklad 9

Fermentor s obsahem 100 litrů živného roztoku o složení 3,5 % glukózy, 2,5 % sušeného sladového extraktu, 0,5 % hydrolyzátu kaseinu, 1,3 % extraktu z kvasnic, 0,3 % CaCO_3 , 0,3 % K_2HPO_4 a 0,1 % protipěněního činidla se očkuje 5 litry předběžné kultury z příkladu 4 a fermentace se provádí za současného míchání a provzdušňování 5 dní při 24 °C, čímž se získá fermentační prostředí o 73 000 SIE/litr a s obsahem převážně derivátu $n = 2$.

90 litrů fermentačního prostředí se upra-

ví koncentrovanou kyselinou dusičnou na pH 2,5 a za stálého míchání se přidá 900 g (= 1 %) aktivního uhlí (Merck) k adsorbci většiny vytvořeného barviva. Směs se míchá 15 minut, pak se odstředí při 300 otáčkách za minutu od mycelia a většiny uhlí a supernatant se zfiltruje s přidavkem 3 kg Clarcelu pod tlakem. Získá se 65 litrů žlutohnědého čirého filtrátu o 60 000 SIE/litr.

Filtrát se upraví na pH 7 koncentrovaným amoniakem a účinná látka se absorbuje 30 minut na 1300 g (2 %) aktivního uhlí (Merck). Směs se zfiltruje pod tlakem a aktivní uhlí se promyje 3 × 10 litry destilované vody. Pak se uhlí vysuší a míchá se s 3 × 4 litry 50% acetonu při pH 2,5 vždy 15 minut k desorpci účinné látky. Acetonové roztoky se po oddělení aktivního uhlí

filtrací slijí a odpaří na rotační odparce na objem 250 ml, přidá se 250 ml methanolu a směs se znovu zfiltruje, 480 ml filtrátu se po kapkách přidá za energického míchání do 5 litrů acetonu, vytvořená sraženina se oddělí filtrací za odsávání a 3 X promyje acetone a etherem, načež se usuší ve vakuu při 35 °C. Výtěžek je 230 g produktu o 8 500 SIE/g.

25 g tohoto surového produktu se rozpustí v 1 litru vody a přidá se 300 g přípravku Dowex 50 WX 4 H⁺ (200 až 400 mesh), směs se míchá 30 minut, pryskyřice se oddělí filtrací a promyje 3 X 2 litry 0,001 N HCl. Promytá pryskyřice se uvede v suspenzi v 500 ml vody a suspenze se upraví na pH-metru přidáním 25% amoniaku na 9,0. Pak se provede desorpce ještě 2 X 500 ml 0,6% amoniaku, desorbáty se slijí a odpaří na rotační odparce na objem 100 ml. K odbarvení se ke koncentrátu přidá 2 g DEAE-celulózy (firma Schleicher a Schüll č. 02035, 0,6 mikrovalenci/g) směs se míchá 5 minut a pak se odstředí. Světle žlutý supernatant se smísí se 100 ml methanolu a směs se po kapkách přidá za energického míchání ke 2 litrům acetonu. Sraženina se oddělí filtrací za odsávání, promyje se acetone a etherem a usuší se ve vakuu při 35 °C. Získá se 4,2 g produktu o 26 000 SIE/g. K dalšímu čištění se provede filtrace 4,0 g inhibitoru po dílech 0,5 g na gelu Biogel P-2. K tomuto účelu se rozpustí vždy 0,5 g produktu v 10 ml vody a roztok se nanese na sloupec přípravku Biogel P-2 (200 až 400 mesh, firma Bio-Rad) o rozměrech 5 X 95 cm. Sloupec se vyvíjí vodou rychlostí 80 ml za hodinu. Odebírají se frakce po 12 ml. U všech frakcí se stanoví antronovou metodou a extinkcí při E₆₂₀ obsah uhlohydrátů, dále se stanoví obsah inhibitoru sacharázy a amylázy, mimoto se provádí chromatografie na tenké vrstvě podle příkladu 2.

Frakce, v nichž se zjistí deriváty aminocukrů o n = 4 až 6 se slijí, odpaří ve vakuu na 10 ml a vysráží tím, že se po kapkách přidají ke 200 ml absolutního alkoholu. Sraženina se oddělí filtrací, promyje se acetone a etherem a usuší ve vakuu. Výtěžek je 4,0 g surového inhibitoru, 0,2 g derivátů aminocukrů o n = 4 až 6 s koncentrací 17,5 X 10⁶ AIE/g a 8 500 SIE/g. Frakce, obsahující derivát aminocukrů o n = 3 se zpracovávají stejně, srážení se provádí 200 ml acetonu. Výtěžek je 4,0 g surového inhibitoru, 0,1 g derivátu aminocukrů o n = 3 při koncentraci 1,4 X 10⁶ AIE/g a 21 000 SIE/g. Frakce, obsahující derivát aminocukrů o n = 2 se zpracovávají stejně, srážení se provádí acetone, získá se 0,9 g derivátu aminocukrů o n = 2 při koncentraci 0,3 X 10⁶ AIE/g a 68 000 SIE/g.

Příklad 10

Do třech fermentorů se uvede vždy 8 lit-

rů živného roztoku s obsahem 7,5 % sušeného sladového extraktu, 0,3 % hydrolyzátu kaseinu, 0,7 % extraktu z kvasnic, 0,3 % CaCO₃, 0,3 % K₂HPO₄ a fermentory se očkují 5 % předběžné kultury kmene SE 50/100, získané podle příkladu 4, čímž se získá po 5 dnech fermentace při 24 °C fermentační prostředí se 73 SIE/ml a s obsahem převážně derivátu aminocukrů o n = 2. Po odstředění 30 minut při 3 000 otáčkách za minutu k oddělení mycela se získá 20,5 litrů sytého hnědého roztoku o 67 000 SIE/litr. Kyselinou dusičnou se pH upraví na 3,5 a k odbarvení se přidá 60 g Lewapolu (Ca 9221, 0,35 mm rozměr zrn, firma Bayer)/litr, celkem 1,23 kg Lewapolu. Po 20 minutách míchání se směs zfiltruje přes filtr Seitz K 3. Odbarvený roztok se neutralizuje amoniakem (18,5 litrů, 67 000 SIE/litr). Pak se absorbuje účinná látka na 20 g aktivního uhlí/litr, celkem 370 g uhlí a míchá se 30 minut. Pak se znovu směs zfiltruje přes filtr Seitz K 3, pokrytý vrstvou přípravku Clarcel. 17,5 litrů filtrátu o koncentraci 3 600 SIE/litr se odloží. Aktivní uhlí se promyje 3 X 2 litry destilované vody. Desorpce se provádí mícháním s 3 X 1 litrem 80% acetonu, míchá se vždy 15 minut, přičemž se pH nastaví koncentrovanou kyselinou solnou na 2,5. 2,4 litru desorbátu o koncentraci 371 000 SIE/litr se nanese na 46 g přípravku Dowex H⁺ (Dowex 50W 4 v H⁺-formě, firma Serva, Heidelberg), směs se míchá 20 minut, pryskyřice se oddělí filtrací (frakce Dowex I) a promyje se 75% acetone. 3 litry filtrátu a promývací kapaliny o koncentraci 215 000 SIE/litr se míchá se 60 g přípravku Amberlite IRA 410 v OH⁻-formě (firma Serva, Heidelberg)/litr až do pH 7. Pak se směs zfiltruje a 2,8 litru filtrátu o koncentraci 219 000 SIE/litr se smísí se 72 gramy Dowexu H⁺-formě a směs se míchá 20 minut, pH se upraví tak, že se do směsi ponoří nylonový sáček s pryskyřicí Amberlite IRA 410 v OH⁻-formě, tímto způsobem je možno pH udržet na hodnotě 3,0. Pak se Dowex oddělí filtrací (Dowex II), 2,6 litrů filtrátu o koncentraci 27 000 SIE/litr se odloží.

Frakce Dowex I a II se odděleně promyjí 3X acetone o koncentraci 75 % při pH 3,5 a pak se frakce I promyje 3 X 100 ml 0,6% amoniaku a frakce II 3 X 150 ml roztoku. Při první desorpci, při níž amoniak nestačí k neutralizaci pryskyřice je nutno přidat koncentrovaný amoniak a upravit pH na hodnotu 9 při použití pH-metru. S desorbáty z frakce I a II se odděleně slijí, odpaří téměř do sucha, smísí s 50 ml vody a pH se upraví na 3 až 4 kyselinou solnou, a pak se přidá 50 ml methanolu. Roztoku se po kapkách přidají k 1,5 litru absolutního acetonu,

vytvořená sraženina se oddělí filtrací a promyje 3× acetonem a 1× etherem, načež se usuší ve vakuu.

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

$n = 2$, malé množství $n = 3$.

Výtěžky	Objem v litrech	SIE/litr	SIE celkem	Výtěžek SIE %
1) Fermentační prostředí	20,5	67 000	1 373 500	190
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 odloží se)
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	64 ⁺ — 5,0)
7) Smíšený desorbát (4—6)	2,4	371 000	890 400	64,8
8) Po 1. adsorpci na Dowex	3,0	215 000	645 000	
9) Po neutralizaci IRA OH ⁻	2,8	219 000	613 200	
10) Po 2. adsorpci na Dowex	2,5	27 000	67 500	(4,9) odloží se
11) Slité NH ₃ -desorbáty z frakce Dowex I	0,29	682 000	197 780	14,4
12) Slité NH ₃ -desorbáty z frakce Dowex II	0,45	1 419 000	638 550	60 ⁹ — 46,5
13) Srážení frakce I	8,5 g	25 000/g	162 500	11,8
Srážení frakce II	12,3 g	36 000/g	442 800	32,2 } 44-

Příklad 11

200 g přípravku z příkladu 1 se rozpustí v 940 ml destilované vody a 60 ml koncentrované kyseliny sírové a zahřívá se 4 hodiny pod zpětným chladičem. (Vnitřní teplota 98 až 100 °C, teplota olejové lázně 140 °C). Zchlazený černohnědý roztok se smísí s 10 g aktivního uhlí (Merck Art. 2186) a míchá se 1 hodinu. Aktivní uhlí se oddělí filtrací za odsávání, promyje vodou a filtrát se upraví 250 ml 10 N KOH na pH 7 až 8. Roztok se míchá 1 hodinu s 50 g aktivního uhlí, uhlí se oddělí filtrací, promyje 2 litry vody a filtrát se odloží. K desorpci se aktivní uhlí nechá stát se 2 litry 30% alkoholu přes noc. Pak se aktivní uhlí oddělí filtrací za odsávání a alkoholický roztok se odpaří na rotační odparce na 6,2 g odparku, který se rozpustí v 500 ml vody a opatrně promíchá s 30 g Amberlitu IR 120 v H⁺-formě 1 hodinu. Iontoměnič se oddělí filtrací za odsávání, promyje destilovanou vodou, až je filtrát neutrální a prostý glukózy. Iontoměnič se míchá s 15 ml 25% amoniaku v 1000 ml vody přes noc, oddělí se filtrací a filtrát se odpaří na odparek 3,7 g.

K dalšímu čištění se provádí chromatografie na celulóze, 4,5 materiálu, desorbovaného z iontoměniče na sloupec celulózy o rozměrech 1 m × 2,5 cm. Jako rozpustidla se užívá nejprve směsi ethanolu a vody v poměru 5 : 1, k eluci aminocukru o n = 1 se užije nejprve směsi ethanolu a vody v poměru 3 : 1. Při rychlosti 20 kapek za minutu se odebírají frakce po 14 ml a tyto frakce se podrobí chromatografii na tenké vrstvě. Frakce 47 až 85 poskytují po odpaření 1,6 g slabě hnědě zbarveného derivátu aminocukru o n = 1. Znečišťující barvivo nehraje v tomto případě žádnou roli. Deriváty je možno získat i bez příměsi barviva v případě, že se čištění provádí na silně kyselém iontoměniči nikoli po jednotlivých množstvích odděleně, nýbrž na sloupci.

Příklad 12

200 g přípravku z příkladu 1 se rozpustí v 940 ml destilované vody a 60 ml koncentrované kyseliny sírové a směs se zahřívá 1/4 hodiny pod zpětným chladičem při vnitřní teplotě 98 až 100 °C a teplotě olejové lázně 140 °C. Zchlazený hnědočerný roztok se smísí s 10 g aktivního uhlí (Merck, Art. 2186) a míchá se 1 hodinu. Pak se aktivní uhlí oddělí filtrací za odsávání, promyje se vodou a pH filtrátu se upraví 10 N hydroxidem draselným na hodnotu 7 až 8. Roztok se míchá 1 hodinu s 50 g aktivního uhlí. Aktivní uhlí se oddělí filtrací za odsávání, promyje se 2 litry vody a filtrát se odloží. K desorpci se aktivní uhlí digeruje přes noc s 2 litry 30% alkoholu. Nakonec se aktivní uhlí oddělí filtrací za odsávání a alkoholický roztok se odpaří na rotační odparce, čímž se získá 8,0 g odparku.

Odparek se smísí s 15 ml vody a nanese se na sloupec o rozměrech 20 × 2,4 cm, naplněný 50 g Amberlite IR 120 v H⁺-formě. Průtoková rychlost je 3 kapky za minutu, pak se sloupec promývá vodou rychlostí 12 kapek za minutu k odstranění složek, které nemají zásaditou povahu. Pak se vymývají zásadité složky 0,5% amoniakem rychlostí 12 kapek za minutu a vodný roztok se odpaří na rotační odparce, čímž se získá 4,1 g odparku.

2 g tohoto odparku se rozpustí v malém množství vody a roztok se nanese na sloupec o rozměrech 200 × 3 cm, naplněný Sephadexem G 15. Sloupec se vymývá vodou. Při rychlosti 8 ml za hodinu se odebírají frakce po 2 ml. Jednotlivé frakce se sledují chromatografií na tenké vrstvě. Z frakcí 85 až 94 se získá 280 mg derivátu aminocukru o n = 2 se specifickou účinností 50 000 SIE/g.

Příklad 13

2 g přípravku z příkladu 1 se inkubují v 60 ml 20 mmolech pufru s glycerofosfátem sodným o pH 6,9 a 1 mmolu CaCl₂ s 1 g α-amylázy ze spec. *Aspergillus* (Serva č. 13418) za stálého míchání 120 hodin při teplotě 37 °C, načež se směs zahřeje na 5 minut na 100 °C a odstředí při 4 000 otáčkách za minutu od nerozpustného podílu. Po lyofilizaci roztoku se získá 1,9 g produktu A 3500 SIE/g a 2 × 10⁶ AIE/g. Při zkoumání produktu chromatografií na tenké vrstvě a na inhibici sacharázy zejména derivát aminocukru o n = 1, 2 a 3.

Příklad 14

2 g přípravku z příkladu 1 se inkubují ve 30 ml 20 mmolech acetátového pufru o pH 4,8 a 1,25 mg β-amylázy z topinamburu (Boehringer 15471) za stálého míchání 120 hodin při 37 °C, načež se směs zahřeje na 5 minut na 100 °C, nerozpustný podíl se odstředí při 4 000 otáčkách za minutu, po lyofilizaci roztoku se získá 1,5 g produktu o 1 800 SIE/g a 3,8 × 10⁶ AIE/g. Po zkoušce tohoto produktu chromatografií na tenké vrstvě a na inhibici sacharázy podle příkladu 2 je zřejmé, že je přítomen zejména derivát aminocukru o n = 2 a 3.

Příklad 15

Erlenmeyerovy baňky o obsahu 200 ml s obsahem 25 ml živného roztoku, který obsahuje 0,1 % K₂HPO₄, 0,2 % (NH₄)₂SO₄, 0,05 procent MgSO₄, 0,05 % KCl, 0,01 % FeSO₄ 2 % přípravku z příkladu a suspenze spor kmene *Asp. niger* ATCC 11394 se podrobí fermentaci při 28 °C na rotační třepačce, přičemž po 6 dnech poklesne titr AIE z 210 000 AIE/ml na 53 000 AIE/ml, po 10 dnech až na 21 300 AIE/ml. Současně se zvýší obsah SIE/ml ze 7,0 na 72 SIE/ml.

20 ml roztoku, který byl 10 dní inkubován se suspenzí spor se odstředí 30 minut k oddělení mycelia při 3 000 otáčkách za minutu. 15 ml supernatantu o 72 000 SIE/litr se míchá 30 minut s 2 g Amberlitu IRC 50 v H^+ -formě a 1 g Amberlitu IRA 410 v OH^- -formě, čímž dojde k odstranění solí. (Vodivost je menší než 2 m Siemens). Směs se zfiltruje a filtrát se nechá projít rychlostí 5 ml/hodinu sloupcem o rozměru 1×10 cm s obsahem Dowexu v H^+ -formě v 0,001 N kyselině solné. Sloupec se vymývá 200 ml 0,001 N kyseliny solné. K desorpci se nechá rychlostí 10 ml za hodinu projít sloupcem roztok amoniaku o koncentraci 0,6 %, odebírají se frakce po 5 ml. Frakce s obsahem inhibitoru sacharázy se slíjí, odpaří na 2 ml v rotační odparce a smísí se 2 ml methanolu. Roztok se upraví na pH 3 až 4 a vysráží se tak, že se po kapkách přidá do 100 ml acetonu. Sraženina se oddělí filtrací za odsávání, promyje se acetonem a etherem a usuší ve vakuu. Získá se 26 mg produktu o 28 000 SIE/g, produkt sestává z derivátů aminocukru o $n = 2$ a 3. Derivát o $n = 2$ je možno z tohoto produktu získat způsobem podle příkladu 9 gelovou filtrací přes sloupec přípravku Bio-Gel P-2. Získá se 7 mg derivátu aminocukru o $n = 2$ se specifickou účinností 60 000 SIE/g.

Příklad 16

2 litry fermentačního prostředí, získaného podle příkladu 6 oddělením mycelia při 13 000 otáčkách za minutu s účinností 13 000 SIE/g se ke snížení obsahu solí (vodivost filtrátu 10 mS) míchá s 500 g směsí 2,5 dílu Amberlite IRC-50 v H^+ -formě a 1 dílu Amberlite IRA-410 v OH^- -formě 1 hodinu. Iontoměnič se oddělí, roztok se odpaří na množství nižší než 100 ml a nerozpustný podíl se odstraní odstředěním při 20 000 otáčkách za minutu 15 minut. Supernatant se doplní na 100 ml, má vodivost 3,5 mS a dále se čistí na sloupci o rozměrech 55×400 mm s obsahem P-celulózy (Serva č. 45130, připraveno běžným způsobem, rovnovážného stavu bylo dosaženo v 5 molech pufru s fosforečnanem amonným o pH 5,5). Sloupec se vymývá uvedeným puforem rychlostí 90 ml/hodina. Odebírají se frakce po 18 ml.

Frakce se zkoumají na obsah uhlohydrátů anthronovým testem a na obsah inhibitorů sacharázy testem na inhibici sacharázy, frakce prosté uhlohydrátů (frakce 60 až 80), které byly současně účinné jako inhibitory sacharázy se odpaří na 150 ml a nechají se projít sloupcem o rozměrech 50×300 mm s obsahem Amberlite IRA-410 v HCO_3^- -formě. K lepšímu řízení deionizace se eluát odebírá po frakcích po 10 ml za 20 minut a frakce se zkoušejí na obsah uhlohydrátů anthronovým testem, který má být téměř negativní, na fosforečnan činidlem s kyselinou askorbovou a molybdenanem a na inhibici sacharázy enzymatickým testem. Nejúčinnější frakce 3 až 30 se slíjí, odpaří a lyofilizují, zno-

vu rozpustí a znovu lyofilizují, čímž se získá 280 mg surového inhibitoru.

K dalšímu čištění se surový inhibitor podrobí frakcionaci na přípravku Bio-Gel P-2 podle příkladu 6. Z frakcí se získá čistý derivát aminocukru o $n = 1$, po lyofilizaci se získá 30 mg produktu o $0,3 \times 10^6$ AIE/g a 35 000 SIE/g.

Příklad 17

K získání derivátu aminocukru o $n = 5$ až 7 se vychází například z přípravku podle příkladu 1.

30 g extraktu z příkladu 1 se rozpustí ve 250 ml vody. Vodivost tohoto roztoku je 10 mS, pH 5,5. Roztok se zbaví solí tak, že se smísí s 60 g Amberlite IRC 50 v H^+ -formě (slabě kyselý kationtoměnič, který váže deriváty aminocukru ve vodném roztoku jen ve stopách) a 20 g Amberlite IRA 410 v OH^- -formě a směs se míchá 20 minut. Filtrát s vodivostí 0,5 mS o pH 3,5 se upraví na pH 3,0 1 N HCl a má pak vodivost 0,6 mS. Tento roztok se nechá projít rychlostí 42 ml za hodinu sloupcem o rozměru $2,5 \times 40$ cm s obsahem Dowex 50 W v H^+ -formě o rozměru zrn 200 až 400 mesh, sloupec je v rovnovážném stavu v 0,001 N HCl. Sloupec se vymývá 2 litry 0,001 N HCl. Po promytí se provádí eluce 1,2% vodným amoniakem a odebírají se frakce po 10 ml. Účinné frakce se slíjí, amoniak se odpaří ve vakuu a roztok se pak ve vakuu odpaří na objem 30 ml. Srážení se provádí tak, že se roztok po kapkách přidá do 600 ml bezvodého alkoholu, sraženina se oddělí filtrací za odsávání a po promytí alkoholem a etherem suší ve vakuu, čímž se získá 4,4 g produktu o $26,5 \times 10^6$ AIE/g.

Vždy 0,5 tohoto produktu se jemně čistí preparativní chromatografií na sloupci přípravku Bio-Gel P-2 podle příkladu 9. Frakce, které podle zkoušky chromatografií na tenké vrstvě obsahují derivát aminocukru o $n = 5$ až 7 se slíjí, odpaří ve vakuu a vysráží svrchu uvedeným způsobem bezvodým ethanolem. Výtěžek z 0,5 g surového produktu je 0,2 g derivátu aminocukru o $n = 5$ až 7 s 30×10^6 AIE/g a 2 500 SIE/g.

Příklad 18

I. Uspořádání pokusu ke zjištění účinnosti inhibitorů hydroláz glykosidů a ke zjištění zábrany resorpce glukózy u krysy u člo-
věka

K vyvolání alimentární hyperglykemie a hyperinzulinemie se podá bdícím krysám ($n=6$) nebo bdícím pokusným osobám buď 2,5 g sacharózy, 2,5 g maltózy, 1 g pováženého škrobu nebo 2,5 g glukózy/kg perorálně nebo 50 g sacharózy, 50 g maltózy, 50 g pováženého škrobu nebo 50 g glukózy na osobu ve vodném roztoku nebo suspenzi. Další krysy ($n = 6$) obdrží stejné množství

svrchu uvedených uhlohydrátů a mimoto účinnou látku z některého příkladu v uvedené dávce. Zdravé pokusné osoby střídavě obdržely v odstupu 2 dnů pouze uhlohydrát nebo uhlohydrát s uvedenou účinnou látkou. Hladina krevního cukru a inzulinu, byla stanovena v odstupu po 5 minutách po dobu až 3 hodiny po zatížení uhlohydrátem $\pm$ účinnou látkou v krvi, přičemž krev byla odebrána u krys z retroorbitální žilné pleteně a u pokusných osob buď z loketní žíly nebo jako kapilární krev. Stanovení hladiny krevního cukru bylo prováděno přístrojem Auto-Analyzer (Technicon^R, podle publikace Hoffman: J. biol. Chem. **120**, 51 (1937) nebo enzymaticky glukózooxidázou a o-dianisidinhydrochloridem, stanovení inzulinu v krevním séru bylo prováděno metodou podle publikace Hales a Randle: Biochem. J. **88**, 137 (1963).

II. Sledování inhibice přeměny uhlohydrátů na lipidy tukových tkání.

Krasy ($n = 6$) obdržely uhlohydráty z odstavce I v inaktivní formě spolu s vhodnou dávkou téhož uhlohydrátu, značeného radioaktivním uhlíkem $\pm$ účinnou látkou z téhož příkladu polykací sondou. Po krátké době byla zvířata usmrcena a byla provedena analýza tukové tkáně epididymis a/nebo perirenální tukové tkáně, lipidy byly extrahovány směsí chloroformu a methanolu v poměru 2 : 1 a metabolity nelipidové povahy byly vymyty. Měřena byla radioaktivita izolovaných lipidů na kapalinovém scintilačním počítači. Účinnost byla udána v dpm/1 gramů tukové tkáně.

V tabulkách znamená P pravděpodobnost chyby a s standardní odchylku.

Tabulka 1 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s u bdících krys různou dobu po perorálním podání škrobu $\pm$ účinná látka z příkladu 17, derivát aminocukru s n = 5 až 7

minuty po aplikaci	10	15	20	30	45
kontrola bez škrobu	55 $\pm$ 4,8	63 $\pm$ 5,9	67 $\pm$ 5,8	72 $\pm$ 4,7	66 $\pm$ 5,0
kontrola se škrobem	103 $\pm$ 11	117 $\pm$ 8,6	118 $\pm$ 8,5	128 $\pm$ 8,9	109 $\pm$ 11
12 000 MIE + škrob	95 $\pm$ 4,3	107 $\pm$ 3,3	102 $\pm$ 5,5	111 $\pm$ 3,0	102 $\pm$ 6,7
24 000 MIE + škrob	87 $\pm$ 8,6	94 $\pm$ 8,8	89 $\pm$ 8,5	98 $\pm$ 8,3	91 $\pm$ 4,3
48 000 AIE + škrob	74 $\pm$ 8,9	84 $\pm$ 7,2	84 $\pm$ 6,9	85 $\pm$ 6,5	85 $\pm$ 4,9
----- P < 0,05	----- P < 0,01	----- P < 0,001	oproti kontrole se škrobem	-----	-----

Tabulka 2 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s) u bdících krys různou dobu po perorálním podání škrobu $\pm$ účinná látka z příkladu 9, derivát aminocukru s n = 4 až 6

minuty po aplikaci	10	15	20	30	45
kontrola bez škrobu	55 $\pm$ 4,8	63 $\pm$ 5,9	67 $\pm$ 5,8	72 $\pm$ 4,7	66 $\pm$ 5,0
kontrola se škrobem	103 $\pm$ 11	117 $\pm$ 8,6	118 $\pm$ 8,5	128 $\pm$ 8,9	109 $\pm$ 11
6 000 AIE + škrob	99 $\pm$ 4,5	118 $\pm$ 5,8	104 $\pm$ 8,1	123 $\pm$ 11	107 $\pm$ 7,3
12 000 AIE + škrob	90 $\pm$ 5,2	98 $\pm$ 8,2	99 $\pm$ 4,1	117 $\pm$ 6,7	104 $\pm$ 8,2
24 000 AIE + škrob	74 $\pm$ 5,5	82 $\pm$ 2,9	83 $\pm$ 3,7	96 $\pm$ 6,6	85 $\pm$ 6,4
----- P < 0,05	----- P < 0,01	----- P < 0,001	oproti kontrole se škrobem	-----	-----

Tabulka 3 k příkladu 18

střední hodnota $\pm$ 1s) u bříčích krys různou dobu po perorálním podání škrobu $\pm$ účinná látka z příkladu 9, derivát aminocukru s n = 3.

minuty po aplikaci	5	10	15	20	30	45
kontrola bez škrobu	52 ± 2,3	75 ± 7,9	57 ± 3,7	78 ± 9,6	82 ± 6,5	70 ± 6,9
kontrola se škrobem	93 ± 7,3	133 ± 12	127 ± 9,3	152 ± 15	156 ± 9,2	124 ± 7,7
750 AIE + škrob	86 ± 8,5	107 ± 5,0	117 ± 8,7	121 ± 12	126 ± 11	114 ± 3,6
1 500 AIE + škrob	77 ± 14	92 ± 9,6	94 ± 9,5	113 ± 9,7	112 ± 8,8	111 ± 4,2
3 000 AIE + škrob	65 ± 5,6	101 ± 3,3	82 ± 11	112 ± 4,5	109 ± 6,4	104 ± 2,5

oproti kontrole se škrobem

Tabulka 4 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s u bdících krys různou dobu po perorálním podání škrobu $\pm$ účinná látka z příkladu 9, derivát aminocukru s n = 2.

minuty po aplikaci	5	10	15	20	30	45
kontrola bez škrobu	61 ± 3,7	68 ± 3,9	83 ± 5,3	75 ± 8,7	91 ± 5,2	84 ± 1,5
kontrola se škrobem	85 ± 7,9	120 ± 7,7	132 ± 11	140 ± 12	135 ± 5,0	128 ± 15
150 AIE + škrob	82 ± 7,5	105 ± 4,2	120 ± 6,0	124 ± 7,0	134 ± 6,1	125 ± 5,2
300 AIE + škrob	79 ± 8,2	97 ± 2,7	105 ± 10	118 ± 6,7	119 ± 9,9	130 ± 5,9
600 AIE + škrob	70 ± 4,6	80 ± 8,8	94 ± 6,9	91 ± 16	103 ± 9,2	102 ± 4,2
1 200 AIE + škrob	70 ± 7,0	84 ± 7,7	88 ± 7,4	97 ± 5,2	97 ± 5,0	100 ± 4,3

Tabulka 5 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s u bdících krys různou dobu po perorálním podání škrobu $\pm$ účinná látka z příkladu 6.

minuty po aplikaci	5	10	15	20	30	45
kontrola bez škrobu	74 $\pm$ 6,2	74 $\pm$ 3,0	82 $\pm$ 9,4	71 $\pm$ 11	76 $\pm$ 5,4	90 $\pm$ 9,2
kontrola se škrobem	101 $\pm$ 8,8	135 $\pm$ 13	146 $\pm$ 4,8	151 $\pm$ 9,5	148 $\pm$ 18	156 $\pm$ 19
75 AIE + škrob	102 $\pm$ 2,9	130 $\pm$ 6,9	128 $\pm$ 5,4	143 $\pm$ 11	125 $\pm$ 11	132 $\pm$ 18
150 AIE + škrob	98 $\pm$ 8,7	116 $\pm$ 9,0	128 $\pm$ 5,8	127 $\pm$ 4,8	115 $\pm$ 5,2	137 $\pm$ 5,2
300 AIE + škrob	87 $\pm$ 13	106 $\pm$ 1,8	110 $\pm$ 8,9	111 $\pm$ 2,1	108 $\pm$ 5,3	121 $\pm$ 7,2
----- P < 0,05 ----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001

----- P < 0,05 ----- P < 0,01 ----- P < 0,001 oproti kontrole se škrobem nebo sacharózou

Tabulka 6 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s u bdících krys různou dobu po perorálním podání sacharózy $\pm$ účinná látka z příkladu 17, derivát aminocukru s n = 5 až 7

minuty po aplikaci	15	30	45	60
kontrola bez sacharózy	58 $\pm$ 2,9	49 $\pm$ 3,3	54 $\pm$ 4,8	63 $\pm$ 5,0
kontrola se sacharózou	107 $\pm$ 11	121 $\pm$ 6,0	132 $\pm$ 16	132 $\pm$ 6,7
25 SIE + sacharóza	102 $\pm$ 11	108 $\pm$ 9,6	109 $\pm$ 7,5	101 $\pm$ 7,9
50 SIE + sacharóza	92 $\pm$ 7,0	100 $\pm$ 8,3	109 $\pm$ 3,7	102 $\pm$ 6,3
100 SIE + sacharóza	95 $\pm$ 8,1	84 $\pm$ 8,7	93 $\pm$ 9,0	91 $\pm$ 4,5
----- P < 0,05 ----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001	----- P < 0,01 ----- P < 0,001

----- P < 0,05 ----- P < 0,01 ----- P < 0,001 oproti kontrole se škrobem nebo sacharózou

Tabulka 7 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s u bdících krys různou dobu po perorálním podání sacharózy $\pm$ účinná látka z příkladu 9, derivát aminocukru s n = 4 až 6.

minuty po aplikaci	15	30	45	09
kontrola bez sacharózy	58 $\pm$ 2,9	49 $\pm$ 3,3	54 $\pm$ 4,8	63 $\pm$ 5,0
kontrola se sacharózou	107 $\pm$ 11	121 $\pm$ 6,0	132 $\pm$ 16	132 $\pm$ 6,7
25 SIE + sacharóza	109 $\pm$ 6,4	105 $\pm$ 10	112 $\pm$ 9,1	108 $\pm$ 8,1
50 SIE + sacharóza	103 $\pm$ 4,1	107 $\pm$ 15	102 $\pm$ 7,7	101 $\pm$ 9,2
100 SIE + sacharóza	85 $\pm$ 8,1	94 $\pm$ 9,9	95 $\pm$ 8,5	85 $\pm$ 6,4

----- P < 0,05 ----- P < 0,01 ----- P < 0,001 oproti kontrole se sacharózou

Tabulka 8 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota 1s u bdících krys různou dobu po perorálním podání sacharózy $\pm$ účinná látka z příkladu 9, derivát aminocukru s n = 2.

minuty po aplikaci	15	30	60
kontrola bez sacharózy	15 $\pm$ 4,5	92 $\pm$ 8,5	95 $\pm$ 6,4
kontrola se sacharózou	113 $\pm$ 9,9	126 $\pm$ 20	127 $\pm$ 14
25 SIE + sacharóza	71 $\pm$ 3,7	100 $\pm$ 7,3	107 $\pm$ 2,4
100 SIE + sacharóza	58 $\pm$ 5,9	92 $\pm$ 4,0	98 $\pm$ 5,0

----- P < 0,05 ----- P < 0,01 ----- P < 0,001 oproti kontrole se sacharózou

Tabulka 9 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % a inzulin v séru v μ jednotkách/ml u 2 bdících osob po perorálním podání sacharózy $\pm$ účinná látka z příkladu 9, surový inhibitor (26 000 SIE/g)

Pokusná osoba A v kontrolním pokusu se sacharózou

minuty po aplikaci	0	15	30	45	60	90	120	180
glukóza v krvi	120	178	190	176	140	94	100	104
inzulín v séru	14	33	45	37	27	17	9	13

Pokusná osoba A v pokusu se sacharózou + 1000 SIE

minuty po aplikaci	0	15	30	45	60	90	120	180
glukóza v krvi	122	146	148	132	116	120	112	110
inzulín v séru	10	20	18	18	13	14	12	10

Pokusná osoba B v kontrolním pokusu se sacharózou

minuty po aplikaci	0	15	30	45	60	90	120	180
glukóza v krvi	108	122	160	158	140	100	96	104
inzulín v séru	7	14	31	21	19	10	7	13

Pokusná osoba B v pokusu se sacharózou + 1000 SIE

minuty po aplikaci	0	15	30	45	60	90	120	180
glukóza v krvi	102	122	134	128	120	112	110	106
inzulín v séru	6	13	15	13	7	8	8	10

Tabulka 10 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s) u bdících krys v různé době po perorálním podání sacharózy $\pm$ účinná látka z příkladu 6

minuty po aplikaci	15	30	45
kontrola bez sacharózy	69 $\pm$ 5,2	84 $\pm$ 3,9	91 $\pm$ 5,9
kontrola se sacharózou	117 $\pm$ 11	135 $\pm$ 8,1	152 $\pm$ 18
50 SIE + sacharóza	105 $\pm$ 11	123 $\pm$ 5,2	128 $\pm$ 11
100 SIE + sacharóza	89 $\pm$ 6,5	111 $\pm$ 4,1	116 $\pm$ 3,9
200 SIE + sacharóza	72 $\pm$ 4,6	95 $\pm$ 9,1	104 $\pm$ 9,6
----- P < 0,05	----- P < 0,01	----- P < 0,001 oproti kontrole se sacharózou nebo maltózou	-----

Tabulka 11 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s) u bdících krys různou dobu po perorálním podání maltózy $\pm$ účinná látka z příkladu 9 jako surový inhibitor (26 000 SIE/g, 6 000 MIE/g)

minuty po aplikaci	5	10	20	30	60	90
kontrola bez maltózy	69 $\pm$ 1,6	71 $\pm$ 4,6	91 $\pm$ 3,0	90 $\pm$ 9,6	101 $\pm$ 13	72 $\pm$ 5,3
kontrola s maltózou	101 $\pm$ 5,8	138 $\pm$ 11	179 $\pm$ 10	174 $\pm$ 7,5	186 $\pm$ 17	148 $\pm$ 21
100 MIE + maltóza	104 $\pm$ 5,1	108 $\pm$ 4,1	139 $\pm$ 7,6	135 $\pm$ 13	150 $\pm$ 13	132 $\pm$ 5,3
200 MIE + maltóza	92 $\pm$ 6,6	101 $\pm$ 9,6	128 $\pm$ 8,5	128 $\pm$ 11	136 $\pm$ 6,6	126 $\pm$ 3,6
----- P < 0,05	----- P < 0,01	----- P < 0,001 oproti kontrole se sacharózou nebo maltózou	-----	-----	-----	-----

Tabulka 12 k příkladu 18

Glukóza v krvi v mg % (střední hodnota $\pm$ 1s) u bdících krys různou dobu po perorálním podání glukózy $\pm$ účinná látka z příkladu 9, derivát aminocukru o n = 2.

minuty po aplikaci	15	30	45
kontrola bez glukózy	72 $\pm$ 4,6	78 $\pm$ 1,3	87 $\pm$ 6,8
kontrola s glukózou	142 $\pm$ 12	142 $\pm$ 12	158 $\pm$ 19
30 mg + glukóza	135 $\pm$ 13	128 $\pm$ 5,5	132 $\pm$ 7,3
60 mg + glukóza	125 $\pm$ 13	118 $\pm$ 2,9	130 $\pm$ 9,0

----- P < 0,05 ----- P < 0,01 proti kontrolám s glukózou

Příklad 19

Příklad na kyselou desorpci sloučenin podle vynálezu.

Sloupec o průměru 1,5 cm se naplní 30 g vlhké hmotnosti přípravku Dowex^R 50 W X X 4 v H⁺-formě o rozměru zrn 200 až 400 mesh v 0,001 N HCl. Sloupcem se nechá projít 500 ml smíšeného desorbátu o 400 000 SIE/litr při pH 2,5 s obsahem 60 % acetonu, získaného z příkladu 10. Desorbát prochází sloupcem přibližně 1 hodinu, sloupec se pak promyje 500 ml 0,001 N HCl. Za těchto podmínek se vymyjí pouze malé stopy přítomného inhibitoru. Pak se provede přímo ve sloupci desorpce 0,0125 N kyselinou solnou,

přičemž se stanoví vodivost eluátu. Mimoto se v eluátu stanoví obsah SIE. Účinné frakce č. 74 až 100 se slijí a neutralizují přidáním Amberlite IRA 410 v OH⁻formě, pak se odpaří na 5 ml, smísí se s 5 ml methanolu a vysráží se tak, že se roztok po kapkách přidá do 200 ml acetonu. Po promytí acetonem a etherem se roztok odpaří ve vakuu.

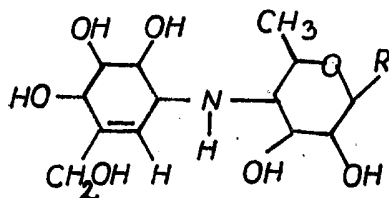
Výtěžek je 1 g derivátu aminocukru o $n = 2$ s obsahem 65 000 SIE/g.

Z aktivních předběžných frakcí je možno získat deriváty aminocukrů, v nichž $n = 3$ nebo 4.

Tento postup pro kyselou desorpci umožňuje také na rozdíl od alkalické desorpce frakcionaci jednotlivých homologů řady derivátů aminocukru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby nových derivátů aminocukrů obecného vzorce



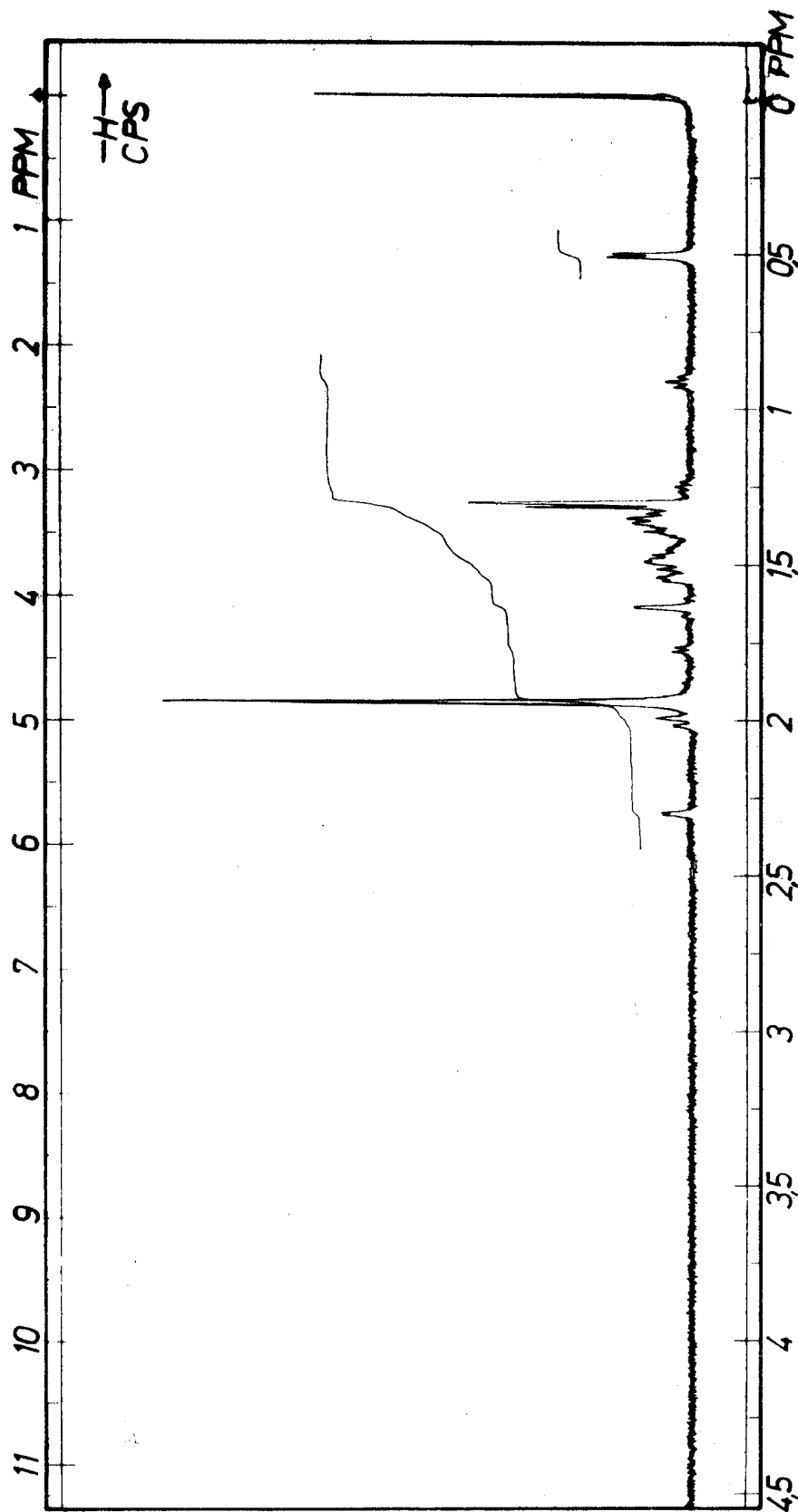
kde

R znamená oligosacharidový řetězec s 1 až 7 hexózovými jednotkami, vyznačující se

tím, že se pěstují mikroorganismy čeledi Actinoplanaceae kmen SE 50/110 — CBS 674.73 ve vodném živném prostředí s obsahem zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí při pH 5,0 až 8,5 a teplotě 15 až 45 °C za aerobních podmínek a derivát aminocukru se po skončené fermentaci izoluje, a popřípadě se při výrobě sloučenin, v nichž R znamená 1 nebo 2 monosacharidové jednotky odbourávají sloučeniny, v nichž R znamená více než 2 monosacharidové jednotky enzymatickým způsobem inkubací s hydrolázami nebo hydrolýzou v kyselém prostředí za použití vodných roztoků anorganických kyselin.

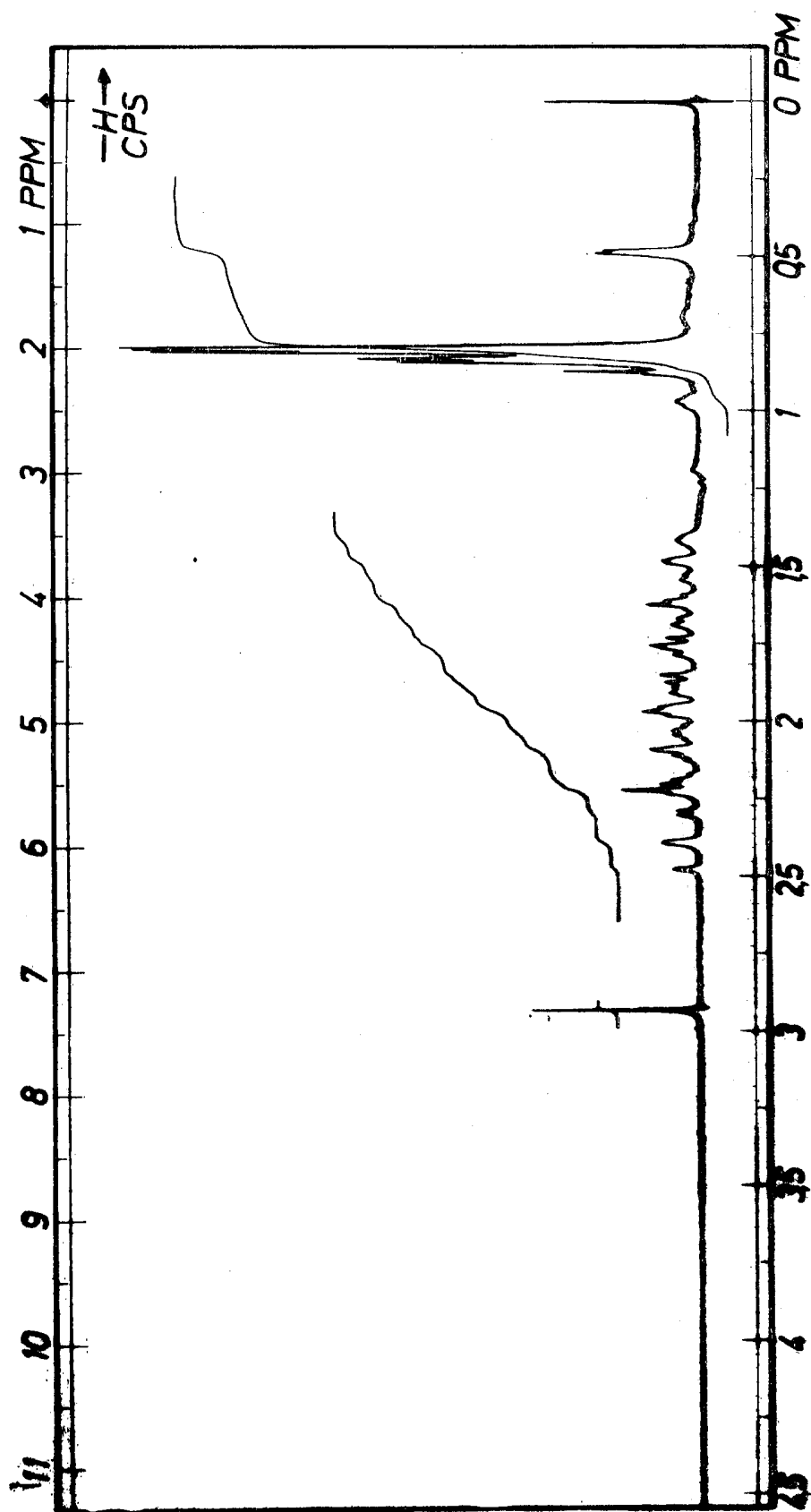
3 listy výkresů

200173



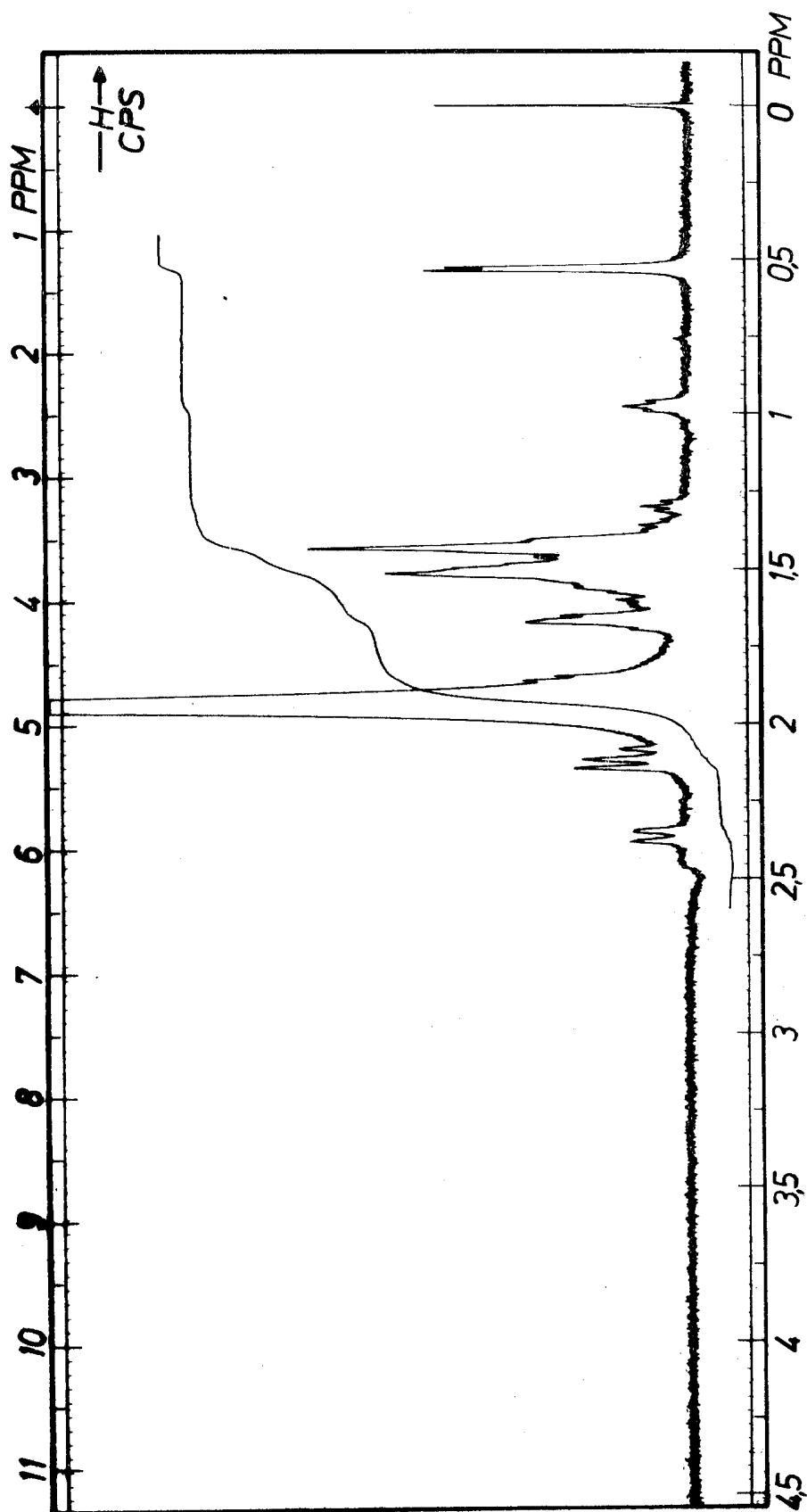
Obr. 1

200173



Obr. 2

200173



Obr. 3