

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **234083**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **417881**

(22) Data zgłoszenia: **08.07.2016**

(51) Int.Cl.

**C12P 17/06 (2006.01)**

**C12P 7/02 (2006.01)**

**C07D 311/32 (2006.01)**

**C12R 1/685 (2006.01)**

---

(54) **Sposób wytwarzania czystego optycznie (+)-(R)-7-hydroksyflawanonu**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**15.01.2018 BUP 02/18**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.01.2020 WUP 01/20**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL  
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL  
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzec. pat. Anna Kasperowicz**

---

**PL 234083 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania (+)-(R)-7-hydroksyflawanonu o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Związek ten może znaleźć zastosowanie jako antyoksydant w przemyśle spożywczym oraz jako składnik środków farmaceutycznych i kosmetycznych.

Flawonoidy to wtórne metabolity roślin o potencjale biologicznym pozwalającym na wykorzystywanie ich jako farmaceutyki (Calcium Duo Allergo – kwercetyna, Rutinoscorbin® – rutyna, MenoStop® – izoflawony) (B. H. Havsteen, *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96, 67–202, Erlund, *Nutrition Research*, 2004, 24, 851–874).

Występowanie 7-hydroksyflawanonu udowodniono w szeregu roślin mających zastosowanie w ziołolecznictwie lub mogących być w przyszłości wykorzystane jako składniki leków. S enancjomer 7-hydroksyflawanonu został wyizolowany m.in. z *Dracena loureiri* i *Muntingia calabura* (W.-L. Kuo, H.-R. Liao, J.-J. Chen, *Molecules*, 2014, 19(12), 20521–20535, B.-N. Su, E. J. Park, J. S. Vigo, J. G. Graham, F. Cabieses, H. H.S. Fong, J. M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, *Phytochemistry*, 2003, 63 (3), 335–341, N. P. Lopes, M. J. Kato, M. Yoshida, *Phytochemistry*, 1999, 51, 29–33, D. Meksuriyen, G. A. Cordell, *Journal of the Science Society of Thailand*, 1988, 14, 3–24).

Istnieje szereg badań dotyczących 7-hydroksyflawanonu jako potencjalnego środka terapeutycznego. Związek ten wykazuje aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do *Streptococcus pneumoniae* i może być stosowany w leczeniu infekcji dróg oddechowych (I.C. Zampini, *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 140, 287–292). Udowodniono, że 7-hydroksyflawanon ma właściwości przeciwpierwotowe w stosunku do komórek SCC-4 (ludzki płaskonabłonkowy rak jamy ustnej) (Shun-Fa Yang, *Archives of oral biology*, 2008, 53, 287–294). Ponadto, 7-hydroksyflawanon wykazuje aktywność immunomodulującą (M. L. Sharma, *Phytomedicine*, 1996, 3(2), 191–195).

Znana jest metoda otrzymywania R enancjomeru 7-hydroksyflawanonu w wyniku krystalizacji frakcjonowanej (-)-mentyloksyoctanów i łagodnej kwasowej hydrolizy mniej rozpuszczalnego diastereoizomeru (G. Cardillo, L. Merlini, G. Nasini, *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1971, 3967–3970).

Do tej pory nie uzyskano R enancjomeru 7-hydroksyflawanonu metodą ekstrakcji z materiału roślinnego ani na drodze biotransformacji.

Biotransformacje to przyjazna dla środowiska naturalnego alternatywa w stosunku do syntezy chemicznej. Biokatalizatory mogą modyfikować strukturę związków, co prowadzi do powstania metabolitów np. o zwiększonych właściwościach antyoksydacyjnych i lipofilowych poprawiających ich biodostępność i aktywność biologiczną (E. Kostrzewa-Susłow, J. Dmochowska-Gładysz, J. Oszmiański, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 49 (1–4), 113–117, W. A. Loughlin, *Bioresource Technology*, 2000, 74, 49–62).

Istotne są badania mające na celu uzyskanie czystych optycznie substancji naturalnych cechujących się właściwościami przeciwutleniającymi, które mogą być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym, ale też kosmetycznym i spożywczym.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Aspergillus niger* CH 11/21.

Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest (±)-octan 7-hydroksyflawanonu o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu, co najwyżej 150 godzin. Kolejny produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, zwłaszcza 25 stopni Celsjusza.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 144 godziny.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Aspergillus niger* CH 11/21, następuje deestryfikacja przy C-7. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą (octan etylu).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie (+)-(R)-7-hydroksyflawanonu z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 100% ee, w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

**P r z y k ł a d.** Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 500 cm<sup>3</sup> sterylnej pożywki zawierającej 10 g aminobaku i 30 g glukozy, wprowadza się szczep *A. niger* CH 11/21. Po 96 godzinach jego wzrostu dodaje się 50 mg (±)-octanu 7-hydroksyflawanonu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm<sup>3</sup> tetrahydrofuranu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 144 godziny. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny octanu etylu i chlorku metylenu w stosunku 1:1.

Na tej drodze otrzymuje się 25 mg (+)-(*R*)-7-hydroksyflawanonu (wydajność 50%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

Opis sygnałów pochodzących z widma <sup>1</sup>H NMR (THF-d<sub>8</sub>): δ = 7.72 ppm (1H, d, J<sub>5,6</sub> = 8,3 Hz, H-5), δ = 7.49 ppm (2H, d, J<sub>2',3' (6',5')}</sub> = 7,5 Hz, H-2',H-6'), δ = 7.37 ppm (2H, t, J<sub>2',3' (5',6')}</sub> = 7,5 Hz, H-3', H-5'), δ = 7.31 ppm (1H, t, J = 7,3 Hz, H-4'), δ = 6.45 ppm (1H, dd, J<sub>6,5</sub> = 8,7 Hz, J<sub>6,8</sub> = 1,9 Hz, H-6), δ = 6.34 ppm (1H, d, J<sub>8,6</sub> = 2,3 Hz, H-8), δ = 5.45 ppm (1H, dd, J<sub>2,3ax</sub> = 12,99 Hz, J<sub>2,3eq</sub> = 2,82 Hz, H-2), δ = 2.93 ppm (1H, dd, J<sub>3ax,3eq</sub> = 16,6 Hz, J<sub>3ax,2</sub> = 13,2 Hz, H-3ax), δ = 2.68 ppm (1H, dd, J<sub>3eq,3ax</sub> = 16,6 Hz, J<sub>3eq,2</sub> = 3,0 Hz, H-3eq).

Opis sygnałów pochodzących z widma <sup>13</sup>C NMR (THF-d<sub>8</sub>): δ = 188.52 ppm (C-4), δ = 164.54 ppm (C-7), δ = 163.41 ppm (C-9), δ = 139.90 ppm (C-1'), δ = 128.47 ppm (C5), δ = 128.30 ppm (C-3', C-5'), δ = 128.04 ppm (C-4'), δ = 126.09 ppm (C-2', C-6'), δ = 114.26 ppm (C-10), δ = 110.23 ppm (C-6), δ = 102.56 ppm (C-8), δ = 79.84 ppm (C-2), δ = 44.25 ppm (C-3).

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania (+)-(*R*)-7-hydroksyflawanonu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Aspergillus niger* CH 11/21, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest (±)-octan 7-hydroksyflawanonu o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu, co najwyżej 150 godzin, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 144 godziny.

## Rysunek

