

Roślinne źródła półproduktów chemicznych i farmaceutycznych. Przykład trójterpenu z kasztanowca

Grzegorz GRYNKIEWICZ*, Mariusz M. GRUZA, Kamil JATCZAK – Instytut Farmaceutyczny, Warszawa

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2015, 69, 2, 75–80

Biologiczne źródła odnawialnych surowców chemicznych (dla medycyny i farmacji)

Rośliny wyższe (naczyniowe), podobnie jak drobnoustroje, charakteryzują się genetycznie utrwaloną zdolnością do wytwarzania metabolitów wtórnych. Ich oszałamiająca różnorodność strukturalna w globalnych zasobach flory stanowi jednocześnie cechę chemotaksonomiczną poszczególnych jej okazów, często przesądając, w obecnych warunkach dostępności metod analityki fitochemicznej, o przynależności do klasyfikacji botanicznej. Rośliny produkują nie tylko węglowodany, lipidy i proteiny, które stosujemy w przemyśle spożywczym, ale także związki naturalne, które okazały się dla gospodarza korzystne z punktu widzenia adaptacji środowiskowej. Korzystamy z nich od dawna w innych dziedzinach gospodarki, techniki i życia codziennego (barwniki, substancje konserwujące, zapachowe i przeciwinfekcyjne, taniny, woski, lateksy, gumy, żywice, a wreszcie substancje lecznicze oraz toksyczne). Wymienione funkcje użytkowe znajdujemy pośród takich kategorii związków naturalnych (metabolitów wtórnych), jak: alkaloidy, polifenole, flawonoidy czy terpenoidy [1 ÷ 4], które wywodzą swoją różnorodność strukturalną z wielości szlaków biosyntetycznych, a te z kolei biorą początek z puli metabolizmu pierwotnego: prostych cukrów, aminokwasów i małowcząsteczkowych kwasów tłuszczowych.

Organiczne związki chemiczne o wysokiej czystości pojawiły się jako odrębna kategoria materiałów dopiero w XIX w., w związku z rozwojem medycyny i farmacji. Początkowo były to natywne składniki izolowane z roślin o uznanych właściwościach terapeutycznych: morfina, papaweryna, chinina, atropina, salicyna, kwas salicylowy, kurkuma, alizaryna etc.; wkrótce dołączyły do tego zbioru produkty przerobu kopaliny pochodzenia organicznego – węgla i ropy. Wyodrębnianie czystych składników z surowców roślinnych było i pozostaje bardzo trudnym zadaniem, zarówno jako ćwiczenie laboratoryjne jak i projekt procesu technicznego. Wyrafinowane metody współczesnej analityki pozwalają na rozdział (HPLC, UPLC, GC), identyfikację (NMR, MS) i oznaczenie ilościowe (np. HPLC/MS-MS) bardzo wielu różnorodnych komponentów, występujących w tkankach roślinnych, ale składniki te są często frakcjonowane tylko na grupy o podobnym charakterze chemicznym lub analogicznych właściwościach fizykochemicznych. Tak więc, na przykład przerób przemysłowy jednego z najważniejszych surowców agrotechnicznych – ziarna sojowego (*Glycine max* Merrill), polega na wyodrębnieniu frakcji: lipidowej I (olej sojowy), lipidowej II (lecytyna), białkowej (proteina sojowa), flawonoidowej (fitoestrogeny izoflawonowe), przy czym każda z nich ma inne zastosowanie techniczne pozostając wieloskładnikową mieszaniną [5].

Zasoby różnorodności strukturalnej wśród metabolitów wtórnych są ogromne (liczbę związków w takich kategoriach jak alkaloidy, antybiotyki lub acetogeniny czy izoprenoidy szacuje się na dziesiątki tysięcy; za nieco mniej liczne uważa się flawonoidy, lignany i niebiałkowe peptydy) i w znacznym stopniu jeszcze niezbadane. Oprócz fragmentarycznie rozpoznanych pod względem szlaków

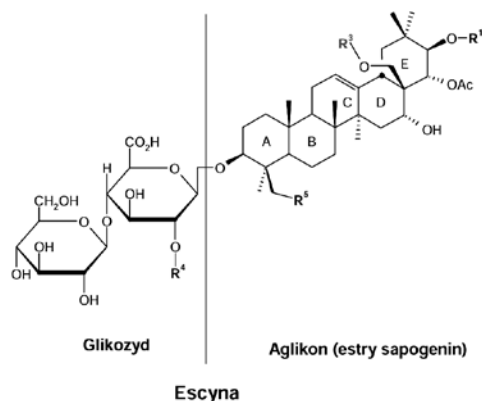
metabolizmu wtórnego ok. 200 tysięcy gatunków roślin wyższych, mamy do dyspozycji na naszej planecie wielokrotnie więcej jednostek taksonomicznych mikroorganizmów lądowych i wodnych, które w znacznej części nie były szczegółowo badane pod tym względem [1 ÷ 3]. Tradycyjne i współczesne badania fitochemiczne i farmakognostyczne wskazują na występowanie w naturze bardzo wielu związków chemicznych o wyraźnym potencjale użytecznej aktywności farmakologicznej. Jednak weryfikacja wstępnych danych wymaga zwykle znacznie większej liczby substancji o zdefiniowanej czystości chemicznej niż można uzyskać z dostępnych kolekcji próbek materiałów biologicznych. Optymalny scenariusz rozwoju produktu pochodzenia naturalnego, który nie jest związkiem o dużym ciężarze cząsteczkowym (jak polisacharydy, białka, lub kwasy nukleinowe), polega na szybkim rozpoznaniu alternatywnych metod otrzymywania (synteza chemiczna lub metody biotechnologiczne) i do izolacji z surowca biologicznego i zapewnieniu odpowiednich, najczęściej wielokilogramowych ilości substancji wysokiej czystości, do przeprowadzenia systematycznych badań przedklinicznych i klinicznych. Dopiero po uzyskaniu potwierdzenia przydatności wybranego związku do celów medycznych lub spożywczych, podejmuje się techniczno-ekonomiczną decyzję o sposobie pozyskiwania pożądanej substancji aktywnej w niezbędnej skali. W Polsce funkcjonuje wiele grup badawczych uprawiających z powodzeniem badania fitochemiczne, które często specjalizują się w określonych typach metabolitów wtórnych i dysponują unikatową ekspertyzą, zarówno w dziedzinie analizy jak i metod pozyskiwania i rozdzielania na składniki ekstraktów roślinnych. Niestety, według wiedzy Autorów, ilości pozyskiwanych w tych zespołach czystych materiałów fitochemicznych (najczęściej miligramowe), stanowią zasoby referencyjne, raczej niezbywalne, i są nieporównywalnie mniejsze od tych, które mogłyby stanowić materiałną podstawę farmakologicznych, nutraceutycznych, kosmetycznych, chemicznych lub medycznych projektów badawczo rozwojowych lub czysto aplikacyjnych. Jedynym znanym przykładem materializacji bardzo rozległych fitochemicznych i chemotaksonomicznych badań naukowych, w postaci imponującej kolekcji związków naturalnych, która od początku była tworzona zgodnie z zasadami systemu zapewnienia jakości i z myślą o komercjalizacji lub co najmniej wymianie barterowej, jest zbiór naturalnych poliprenoli prof. T. Chojnackiego z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, stanowiący jednocześnie doskonały instrument współpracy międzynarodowej, w którą chętnie angażują się biochemicy lipidów – od Japonii poprzez Rosję, Szwecję, Wielką Brytanię, Niemcy i Holandię, aż po kontynent amerykański [6].

Dalej przedstawiamy przykład pozyskania wielofunkcyjnego związku naturalnego z odnawialnego surowca, za pomocą prostych reakcji chemicznych i nieskomplikowanych operacji jednostkowych, bez użycia chromatograficznych technik separacyjnych. Metody chromatograficzne zwykle wymagają skomplikowanych instalacji, specyficznych złóż adsorpcyjnych, i faz ruchomych o charakterze mieszanych rozpuszczalników organicznych, (co stanowi problem techniczny, ekonomiczny i środowiskowy, a więc wymaga poważnych nakładów inwestycyjnych).

Autor do korespondencji:
Grzegorz GRYNKIEWICZ, Profesor, e-mail: g.grynkiewicz@ifarm.eu

Escyna jako lek, surowiec chemiczny i źródło nowych materiałów

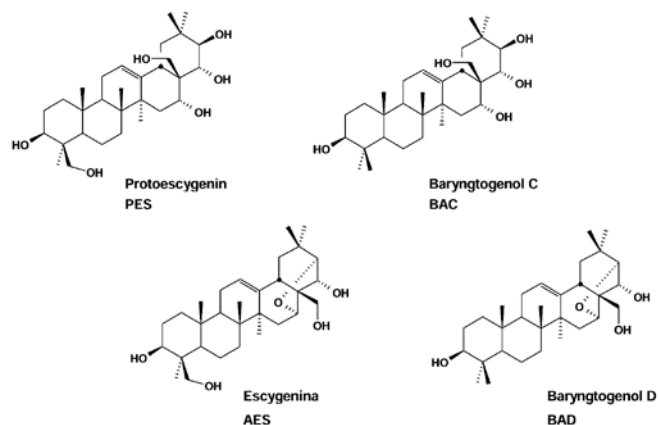
Saponiny kasztanowca (*Aesculus hippocastanum* L.) znane pod zbiorczą nazwą jako escyna, są tradycyjnym materiałem fitochemicznym o ustalonej pozycji klinicznej w terapiach patologii naczyń żylnych (przewlekła niewydolność żylna, żylaki) oraz stanach zapalnych [7, 8]. W zależności od pochodzenia materiału roślinnego i sposobu jego obróbki oraz procedury izolacji frakcji saponinowej, surowiec farmaceutyczny nosi nazwę: α -escyny lub β -escyny, a odmianom tym przypisuje się zróżnicowaną rozpuszczalność w wodzie. Nowoczesne badania fitochemiczne z powodzeniem rozróżniają izomeryczne i bliskie strukturalnie składniki triterpenowych saponin z grupy β -amyryny, których w owocnikach kasztanowców zidentyfikowano kilkadziesiąt (Rys. 1); posługując się w tym celu wyrafinowanymi metodami analizy chemicznej, które łączą chromatograficzne metody rozdzielania (HPLC, UPLC) z czułymi metodami detekcji związków organicznych, niemających grup chromoforowych (MS-MS; CAD). Ten rodzaj analitycznej docieklowości badawczej nie rozciąga się jednak na surowce fitochemiczne zarejestrowane do użytku medycznego na podstawie zastosowania uzasadnionego tradycją etnofarmakologiczną. Dlatego specyfikacje substancji stosowanych do produkcji preparatów farmaceutycznych zawierających w nazwie słowo „escyna” w ogóle nie odnoszą się do ich składu chemicznego, poprzestając tylko na nieistotnych cechach fizykochemicznych (np. czas zaniku piany w określonych warunkach badania roztworu; test który charakteryzuje saponiny). Niezależne badania farmakologiczne prowadzone na czystych składnikach saponinowych są na razie nieliczne, ze względu na ich bardzo ograniczoną dostępność, ale potwierdzają ich potencjał jako związków wiodących i kandydatów na nowe leki [9].



Escyna	Aglikon (R ⁵ =OH, H)	C21-OR (R ¹)	C28-OR (R ³)	Glikozyd (R ⁴)	Zawartość w mieszaninie, %
Ia	R ⁵ =OH, Protoescygenina	Tig	H	Glc-p	15
Ib	R ⁵ =OH, Protoescygenina	Ang	H	Glc-p	23
IIa	R ⁵ =OH, Protoescygenina	Tig	H	Xyl-p	6
IIb	R ⁵ =OH, Protoescygenina	Ang	H	Xyl-p	9
IIIa	R ⁵ =H, Baryngtogenol C	Tig	H	Gal-p	3
IIIb	R ⁵ =H, Baryngtogenol C	Ang	H	Gal-p	5
IV	R ⁵ =OH, Protoescygenina	Ac	H	Glc-p	5
V	R ⁵ =OH, Protoescygenina	PrCO-	H	Glc-p	7
VI	R ⁵ =OH, Protoescygenina	(2-Me)-BuCO-	H	Glc-p	b.d.

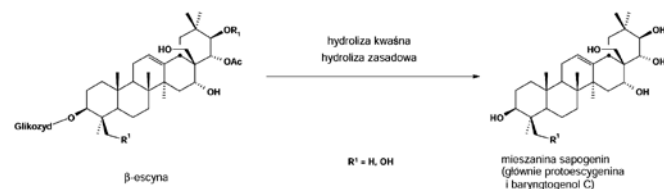
Rys. 1. Skład mieszaniny β -escyny izolowanej z owoców *Aesculus Hippocastanum* wg budowy strukturalnej składników [10]. Tig – tigloilo; Ang – angeloilo; Ac – acetylo; Glc-p – glukopiranozyd; Xyl-p – ksylopiranozyd; Gal-p – galaktopiranozyd

Podstawą różnorodności strukturalnej saponin kasztanowca są różnice budowy pięciocyklicznej triterpenowej części cząsteczki (aglikonu), zwłaszcza liczby grup hydroksylowych i ich rozmieszczenia (Rys. 2); budowa oligosacharydu umieszczonego w pozycji C3-O- pierścienia A, oraz rodzaje i pozycje grup estrowych ulokowanych w pierścieniu E.



Rys. 2. Sapogeniny wchodzące w skład escyn izolowanych z owoców z rodziny *Aesculus*, izolowane po deglikozydacji i saponifikacji escyny

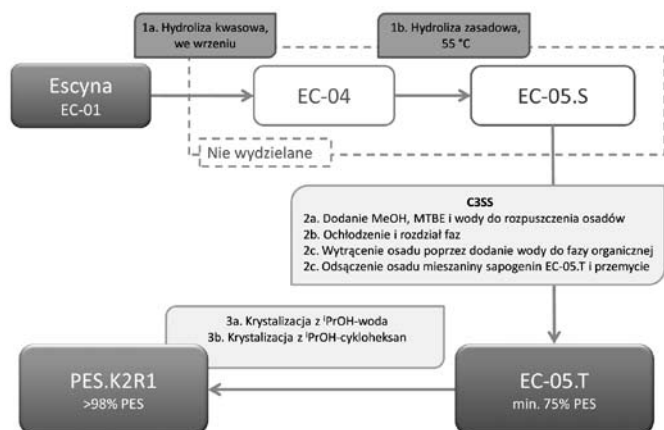
Różnorodność tę można zredukować z poziomu kilkadziesiątu, lub kilkunastu, escyn i związków pochodnych do kilku sapogenu (Rys. 2), przez sekwencyjne zastosowanie dwu prostych transformacji chemicznych: hydrolizy kwasowej (deglikozydacji) i hydrolizy zasadowej (saponifikacji) (Schemat 1). W otrzymanej w ten sposób mieszaninie aglikonów dominuje jeden składnik – protoescygenina (PES), stanowiąca ponad 50% składu mieszaniny.



Schemat 1. Hydroliza escyny do mieszaniny sapogenu

W Instytucie Farmaceutycznym opracowano technologię wytwarzania protoescygeniny o wysokiej czystości z escyny [11]. Metoda ta składa się z następujących etapów technologicznych (Schemat 2):

- dwustopniowej hydrolizy escyny:
 - w warunkach kwaśnych
 - i zasadowych, do otrzymania surowej mieszaniny sapogenu (**EC-05.S**; niewyodrębniana)
- wytrącenie mieszaniny sapogenu w postaci osadu z jednoczesnym wzbogaceniem surowej mieszaniny sapogenu (**EC-05.S**) w protoescygeninę, obejmującego:
 - rozpuszczenie produktu hydrolizy w trójskładnikowym układzie rozpuszczalników MeOH-MTBE-woda do uzyskania klarownego, jedno- lub dwufazowego roztworu
 - rozdzielanie faz
 - dodanie do otrzymanej fazy organicznej wody do wytrącenia osadu technicznej mieszaniny sapogenu (**EC-05.T**)
 - wyodrębniania osadu technicznej mieszaniny sapogenu (**EC-05.T**)
- oczyszczania technicznej mieszaniny sapogenu przez krystalizację, co najmniej po jednej krystalizacji z układów iPrOH-woda i iPrOH-cykloheksan
- wyodrębniania protoescygeniny (**PES.KIRI**) o czystości co najmniej 98%.



Schemat 2. Opracowana metoda otrzymywania protoescygeniny PES z β -escyny EC-01

Opracowana technologia wytwarzania protoescygeniny z escyny z powodzeniem została zastosowana w dużej skali, dla szarż kilkukilogramowych wyjściowego surowca.

Współczesne wyzwania zrównoważonego rozwoju i zielonej chemii wskazują na szczególną rolę surowców odnawialnych, zwłaszcza w dążeniu do nowych metod wytwarzania dla przemysłu materiałów o wysokiej wartości dodanej [12]. Związki naturalne o złożonej budowie i wielu centrach chiralności należą do takich właśnie materiałów, a ich otrzymywanie metodą totalnej syntezy jest nieuzasadnione pod względem technicznym i ekonomicznym. Alternatywą dla syntezy chemicznej jest biotechnologia, lecz mimo wielu sukcesów technicznych, np. w dziedzinie antybiotyków, przynajmniej w zakresie związków o małych ciężarach cząsteczkowych, nowe technologie otrzymywania z przeznaczeniem dla przemysłu farmaceutycznego są znacznie częściej realizowane w wersji chemicznej. W tej sytuacji możliwość pozyskania związków o skomplikowanej budowie z surowców odnawialnych, w stanie wysokiej czystości chemicznej, w zwalidowanym procesie technicznym, powinna być zastosowana w dalszych pracach rozwojowych, gdyż dostępność unikatowego materiału do badań od początku projektu jest walorem trudnym do przecenienia. Omawiane opracowanie zostało poddane ocenie środowiska naukowego w formie publikacji [11], a także jest przedmiotem zgłoszenia ochrony własności intelektualnej [13] oraz opracowania technicznego. Na Międzynarodowej Wystawie Wynalazków IWIS'2013, opracowanie uzyskało wyróżnienie złotym medalem, oraz otrzymało *Glory Medal* na Drugim Światowym Konkursie Wynalazków Chemicznych.

„Podziękowanie; Autorzy wyrażają wdzięczność pracownikom Ośrodka Przetwarzania Informacji za efektywne merytoryczne podejście do problemu finansowania zadań chemicznych projektu „Poszukiwanie innowacyjnego leku śródbłonkowego w grupie nowych pochodnych escyny” (POIG.01.01.02-14-072/09-00) w ramach programu POIG.”

Literatura

1. Appendino G., Pollastro F.: *Natural Product Chemistry for Drug Discovery* Royal Society of Chemistry 2010, 140–173.
2. Cordier C., Morton D., Murrison S., Nelson A., O'Leary-Steele C.: *Natural products as an inspiration in the diversity-oriented synthesis of bioactive compound libraries*. *Nat Prod Rep.*, 2008, **25**, 719–737.
3. Ji H.-F., Li X.-J., Zhang H.-Y.: *Natural products and drug discovery*. *EMBO Rep.*, 2009, **10**, 194–200.
4. Wawer I.: *Chemia i farmacja bliżej natury, czyli jak przedłużyć życie w zdrowiu*. *Chemik*, 2010, **64**, 219–227.

5. Sikorski Z.E.: *Chemia żywności, T. 3, Odżywcze i zdrowotne właściwości składników żywności*, Wyd. VI. WNT, 2014.
6. Chojnacki T.: *50 Lat wokół lipidów*. IBB PAN, 2014.
7. Safayhi H., Sailer E.-R.: *Anti-Inflammatory Actions of Pentacyclic Triterpenes*. *Planta Medica*, 1997, **63**, 487–493.
8. Sirtori C.R.: *Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile*. *Pharmacol. Res.*, 2001, **44**, 183–193.
9. Zhang Z., Li S., Lian X.-Y.: *An Overview of Genus Aesculus L.: Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacological Activities*. *Pharmaceutical Crops*, 2010, **1**, 24–51.
10. Wulff G., Tschesche R.: *Über triterpene—XXVI: Über die struktur der rosskastaniensaponine (Aescin) und die aglykone verwandter glycoside*. *Tetrahedron*, 1969, **25**, 415–436.
11. Gruza M.M., Jatczak K., Zagrodzki B., Łaszcz M., Koziak K., Malińska M., Cmoch P., Giller T., Zegrocka-Stendel O., Woźniak K., Gryniewicz G.: *Preparation, Purification and Regioselective Functionalization of Protoescigenin—The Main Aglycone of Escin Complex*. *Molecules*, 2013, **18**, 4389–4402.
12. Kafarski P.: *Chemia a biotechnologia przemysłowa*. W książce *Misja nauk chemicznych*. Ed. B. Marciniak, Wydawnictwo Nauka i Innowacje, Poznań 2011, str. 153 – 168.
13. Zgłoszenie patentowe nr PL20110396618, Polska; opublikowany także jako WO2013055244 i US20130190538.

*Grzegorz GRYNKIEWICZ, profesor w Instytucie Farmaceutycznym, jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (magisterium 1962; doktorat 1968; habilitacja 1979; tytuł naukowy 1992). Główne zainteresowania zawodowe: chemia związków naturalnych, synteza organiczna, chemia medyczna, technologia leków. (www.ifarm.eu)

e-mail: g.gryniewicz@ifarm.eu, tel. (48)-22 4563885

Dr Mariusz M. GRUZA jest absolwentem Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Warszawskiego (1998), gdzie następnie uzyskał stopień doktora (2003). Obecnie pracuje w Instytucie Farmaceutycznym. Zainteresowania naukowe: chemia farmaceutyków, synteza organiczna. Jest autorem lub współautorem 9 artykułów w prasie naukowo-technicznej, 4 zgłoszeń patentowych i patentów oraz kilkunastu referatów i posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

e-mail: m.gruza@ifarm.eu, tel. 501 644 073

Mgr Kamil JATCZAK jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (2010). Obecnie pracuje w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie. Zainteresowania naukowe: chemia związków naturalnych, selektywne funkcjonalizacje, chemia grup zabezpieczających. Jest autorem lub współautorem 6 artykułów w prasie naukowo-technicznej, 8 referatów i posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

e-mail: k.jatczak@ifarm.eu, tel. 692 315 410