

УДК 547.269.3:546.226-325[615.275.3.015.21]:543.422.3

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ДВОЙНОЙ СОЛИ АДЕМЕТИОНИНА С СЕРНОЙ И П-ТОЛУОЛСУЛЬФОКИСЛОТОЙ

Морозов А.В.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ, Пятигорск,
e-mail: andrewmorozov@mail.ru*

Разработан биосинтетический способ получения адеметионина. Суть метода заключается в накоплении адеметионина в клетках дрожжей в метионин-содержащей среде. Дрожжи промывают дважды избытком холодной воды, а затем лизируют в течение 2 часов путем добавления этилацетата в качестве селективного экстрагента, а также 0,15 М кислоты серной. После лизиса раствор, содержащий адеметионин, отделяют от остатков дрожжей с помощью центрифугирования. Очистку полученного лизата проводят путем добавления к лизату 10% водного раствора кислоты пикролоновой. Образующийся пикролонат адеметионина отстаивают в течение 12 часов, после чего промывают дважды избытком холодной воды и высушивают. На заключительной стадии пикролонат адеметионина разрушают с помощью добавления кислоты серной, п-толуолсульфокислоты и органического растворителя, не смешивающегося с водой, – н-бутанол. Полученную смесь отстаивают в течение 20 минут, далее удаляют органическую фазу, а к водной добавляют небольшое количество н-бутанола для удаления остатков кислоты пикролоновой. В результате получают водный раствор адеметионина, который осаждают этанолом, а полученное твердое вещество растворяют в 15% метанольном растворе п-толуолсульфокислоты. На заключительной стадии к полученному раствору добавляют хлороформ для осаждения двойной соли адеметионина. Соль высушивают и добавляют к ней лактозу в соотношении 1:1.

Ключевые слова: адеметионин, двойная соль, биосинтез

DEVELOPMENT OF A WAY OF RECEIVING DOUBLE SALT ADEMETIONINE WITH SULFURIC AND P-TOLUENSULFURIC ACID

Morozov A.V.

*Pyatigorsk physician – pharmaceutical Institute, branch of PEI of HPT to VolgGMU, Pyatigorsk,
e-mail: andrewmorozov@mail.ru*

The biosynthetic way of receiving ademetionine is developed. The essence of a method consists in accumulation ademetionine in cages of yeast in the metionin containing environment. Yeast washes out twice excess of cold water, and then lysis within 2 hours by ethyl acetate addition as selective extragent, and also 0,15 M of acid sulfuric. After lysis pounded containing ademet, separeneate from the remains of yeast by means of centrifugation. Cleaning of the received lysate carry out by addition to a lysate 10% of solution of pikrolonic acid. Being formed picrolonate of ademetionine defend within 12 hours then wash out twice excess of cold water and dry up. At a final stage picrolonate of ademetionine destroy by means of addition by a sulfuric, p-toluolsulfonic acid and organic solvent not mixing up with water – n-butanol. The received mix settle within 20 minutes, further delete an organic phase, and to water add a small amount of n-butanol, for removal of the remains of pikrolonic acid. As a result receive water solution ademetionine which besiege ethanol, and the received strong substance dissolve in 15% metanol solution p-toluolsulfonic acid. At a final stage to the received solution add chloroform for sedimentation of double salt ademetionine. Salt dry up and add to it lactose in the ratio 1:1.

Keywords: ademetionine, double salts, biosynthesis

Адеметионин (S-аденозил-L-метионин) играет важную роль в биохимических процессах в организме человека. Он участвует в реакциях трансметилирования, является предшественником цистеина, таурина, глутатиона. Применяется адеметионин при внутривенном холестазах, токсическом поражении печени, в том числе алкогольном, лекарственном, при вирусном гепатите и т.п. Адеметионин вырабатывается клетками печени. Однако при некоторых заболеваниях печени требуется принимать дополнительно адеметионин в качестве лекарственного средства [1].

В настоящее время субстанция адеметионина в РФ не производится.

Нами поставлена цель изучить существующие способы и разработать наиболее доступный способ получения адеметионина.

Описанные в литературе способы получения адеметионина можно разделить на три группы.

Один из первых способов получения адеметионина, который разработал Д. Кантони, заключался в синтезе адеметионина из аденозинтрифосфата (АТФ) и метионина в присутствии очищенного печеночного фермента метионаденозилтрансферазы. В настоящее время метод не применяется из-за сложности выделения и очистки фермента [2].

Аналогичный метод получения адеметионина из АТФ и метионина отличается лишь тем, что метионаденозилтрансферазу получают из дрожжевого экстракта. Этот метод также требует выделения и очистки фермента.

Ко второй группе методов можно отнести синтез адеметионина путем метилирования

S-аденозил-L-гомоцистеина. Варианты такого синтеза различаются метилирующими агентами. Однако эти методы оказались непригодными, так как в результате синтеза образуется неактивный S,R-изомер и лишь небольшая часть активного S,S-изомера. Помимо этого указанный метод дает большое количество примесей из-за возможностей метилирования разных реакционных центров S-аденозил-L-гомоцистеина [3].

С практической точки зрения наиболее успешными оказались методы биосинтеза адеметионина. Сущность метода заключается в накоплении адеметионина в дрожжевых клетках в питательной среде, обогащенной метионином, лизисе дрожжевых клеток и выделении адеметионина [4, 5].

Нами изучена возможность получения адеметионина методом биосинтеза.

В качестве продуцента адеметионина мы использовали *Saccharomyces cerevisiae*, а в качестве питательной среды была выбрана среда Шленка.

Дрожжи культивировали в течение 24–30 часов при постоянном перемешивании и аэрации при температуре 30°C. Затем проводили лизис дрожжей, содержащих адеметионин, с помощью органического растворителя и разбавленной кислоты серной. В качестве органического растворителя нами был использован этилацетат, а оптимальной концентрацией серной кислоты оказалась концентрация от 0,05 до 0,2 моль/л. Время проведения лизиса – 2 часа при постоянном перемешивании. Экстракция данным способом позволяет получить практически 100% адеметионина, присутствующего в дрожжах. Полученный лизат отделяли от остатков дрожжей при помощи центрифугирования.

На следующей стадии осуществляли очистку лизата. Для этого адеметионин из лизата осаждали 10% раствором пикролоновой кислоты в н-бутаноле, который добавляли при перемешивании к предварительно подкисленному до pH 2 лизату. Полученный осадок отстаивали в течение 12 часов, отфильтровывали и промывали дважды холодной водой.

На заключительной стадии получали стабильную соль адеметионина с толуолсульфокислотой.

К высушенному осадку пикролоната адеметионина добавляли при энергичном встряхивании растворы 0,1 моль/л серной и толуолсульфокислоты, органический растворитель – н-бутанол. Отстаивали в течение 20 минут, органический слой удаляли, водный слой промывали н-бутанолом до удаления следов пикролоновой кислоты. Затем к водному слою добавляли обесцвечивающий уголь, затем фильтровали.

К полученному бесцветному водному раствору добавляли этанол. Образующийся осадок отделяли декантацией и растворяли в метанольном растворе толуолсульфокислоты с концентрацией 15%.

На заключительной стадии к полученному раствору добавляли хлороформ, который осаждает двойную соль адеметионина с серной и п-толуолсульфокислотой.

Полученная таким образом соль адеметионина представляет собой гигроскопичный порошок, очень легко растворимый в воде, практически нерастворимый в этаноле, ацетоне и других органических растворителях.

Для уменьшения гигроскопичности к полученной субстанции добавляли лактозу в соотношении 1:1.

Методом УФ-спектроскопии была подтверждена подлинность полученной соли а также установлен количественный состав компонентов.

УФ-спектроскопию использовали для идентификации полученной соли. Водный раствор соли в области от 200 до 300 нм должен иметь 2 максимума, соответствующих адеметионину 258 ± 2 нм и п-толуолсульфокислоте 230 ± 2 нм.

Для этого точную навеску полученной соли (около 0,2 г) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл воды, растворяли и доводили тем же растворителем содержимое колбы до метки. Аликвоту в количестве 1 мл переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили водой до метки и регистрировали спектр поглощения в области от 220 до 300 нм (рис. 1).

Как видно из рис. 1, в спектре поглощения раствора испытуемого образца имеются 2 максимума при длинах волн 231 нм (п-толуолсульфокислота) и 256 нм (адеметионин).

Для количественного определения компонентов нами разработана спектрофотометрическая методика.

На первом этапе исследований нами была приготовлена модельная смесь адеметионина с п-толуолсульфокислотой с целью определения возможности использования непосредственного спектрофотометрического метода.

На рис. 2 представлен спектр поглощения модельной смеси, содержащей адеметионин и п-толуолсульфокислоту.

Из приведенного спектра видно, что полосы поглощения веществ перекрываются и делают невозможным непосредственное спектрофотометрическое определение адеметионина и п-толуолсульфокислоты. Поэтому для определения их содержания нами был использован метод Фирордта. На

основании полученного спектра поглощения были выбраны аналитические длины волн. Готовили 6 модельных смесей аде-

метионина и п-толуолсульфокислоты, для которых аналитические длины волн были равны $\lambda_1 = 231$ нм и $\lambda_2 = 256$ нм.

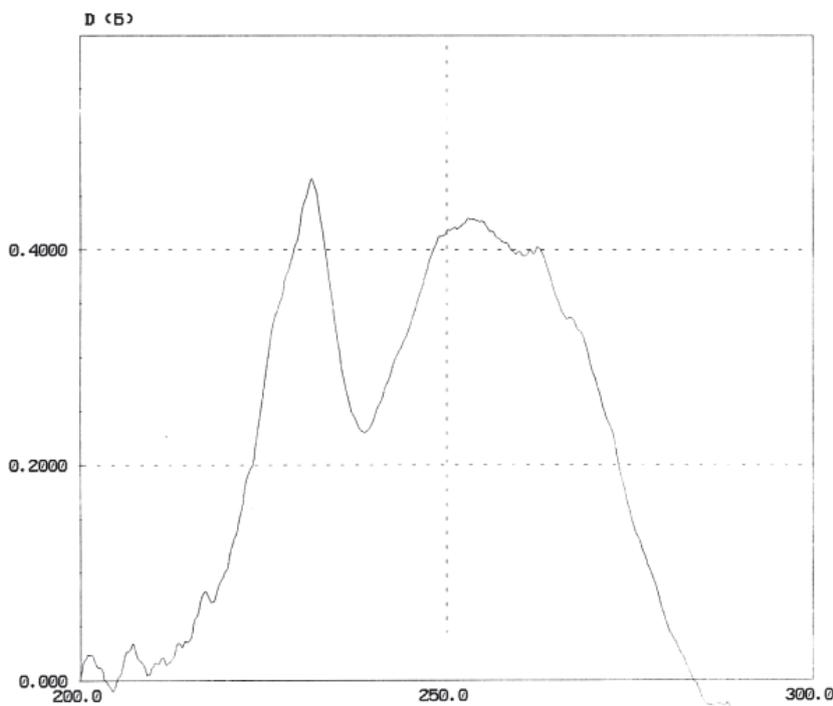


Рис. 1. Спектр поглощения раствора соли адеметионина с п-толуолсульфокислотой

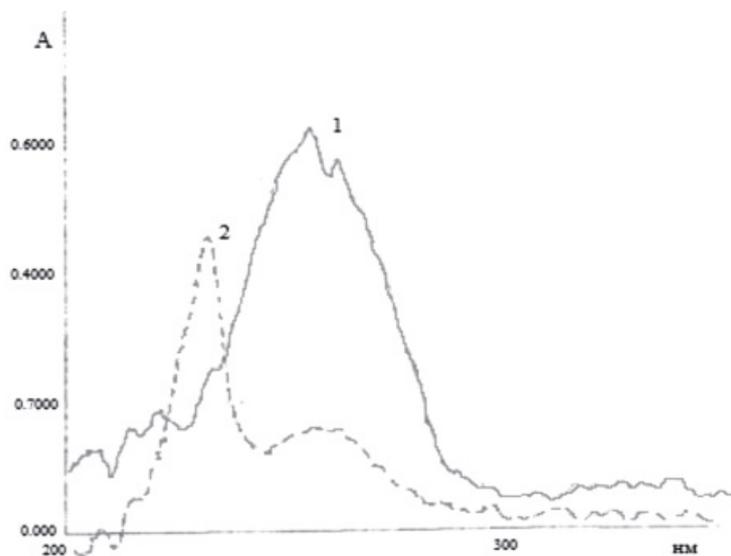


Рис. 2. Спектр поглощения модельной смеси, содержащей адеметионин и п-толуолсульфокислоту

Точную навеску модельной смеси (около 0,1 г) растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл в 50 мл воды, доводили раствор в колбе до метки тем же растворителем. Аликвоту в количестве 5 мл переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем

раствора до метки водой. Оптическую плотность раствора измеряли при длинах волн 231 и 256 нм. Раствор сравнения – вода.

Для расчёта каждого компонента в смеси определяли удельный показатель поглощения при длинах волн 231 и 256 нм.

Таблица 1

Значение удельных показателей поглощения при аналитических длинах волн

Название лекарственного вещества	$\lambda = 256$ нм	$\lambda = 231$ нм
Адеметионин	84,09	23,86
п-толуолсульфо- фокислота	11,2	19,94

Расчет содержания каждого компонента в образцах проводили путем решения системы уравнений

$$A_1 = X_1E_{11} + X_2E_{12}$$

$$A_2 = X_1E_{21} + X_2E_{22}$$

Таким же образом было проведено определение компонентов в соли адеметионина с серной и п-толуолсульфофокислотой.

Таблица 2

Результаты определения адеметионина и п-толуолсульфофокислоты в модельной смеси

Взято адеметионина	Найдено адеметионина		Взято п-толуолсульфофокислоты	Найдено п-толуолсульфофокислоты	
	г	%		г	%
0,01126	0,01130	100,36	0,09581	0,03529	99,72
0,01142	0,01120	98,07	0,09927	0,03518	99,07
0,01079	0,01106	102,50	0,10032	0,03524	99,04
0,01158	0,01150	99,31	0,09647	0,03528	99,49
0,01135	0,01133	97,82	0,09754	0,03517	99,12
0,01145	0,01146	100,09	0,09687	0,03571	100,90
	Метрологические характеристики $\bar{x} = 99,75$ SD = 0,5181 RSD = 0,5194 $S\bar{x} = 0,2115$ $\bar{x} \pm S\bar{x} = 99,75 \pm 0,5438$			Метрологические характеристики $\bar{x} = 99,59$ SD = 0,7251 RSD = 0,7281 $S\bar{x} = 0,2960$ $\bar{x} \pm S\bar{x} = 99,59 \pm 0,7610$	

Результаты определения приведены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты анализа двойной соли

Наименование соли	Найдено вещества, %
Адеметионин	40,0 ± 0,9
п-толуолсульфофокислота	50,0 ± 1,0

Приведенные результаты показывают, что методика определения соли адеметионина с серной и п-толуолсульфофокислотой позволяет определить все компоненты с погрешностью не более 3 %.

Выводы

1. Разработан биосинтетический способ получения двойной соли адеметионина.
2. Разработаны спектрофотометрические методики подлинности двойной соли адеметионина с серной и п-толуолсульфофокислотой.
3. Разработаны методики количественного определения компонентов двойной соли при помощи метода Фирордта.

Список литературы

1. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. – 19-й вып. / под ред. Г.Л. Вышковского. – М.: РЛС-МЕДИА, 2010. – С. 80.
2. Aminosugar, glycosaminoglycan, and S-adenosylmethionine composition for the treatment and repair of connective tissue [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.google.ru/patents/US6271213>.

3. Composition and use of ademetionine against ageing of the skin [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.google.com/patents/US4956173>.

4. Stable salts of S-adenosyl-L-methionine with polyanions [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.google.co.in/patents/US4764603>.

5. Sulphonic acid salts of S-adenosylmethionine [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.google.com/patents/US4057686>.

References

1. Registr lekarstvennyh sredstv Rossii RLS Jenciklopedija lekarstv. 19-j vyp. / Pod. red. G.L. Vyshkovskogo. M.: RLS-MEDIA, 2010. pp. 80.

2. Aminosugar, glycosaminoglycan, and S-adenosylmethionine composition for the treatment and repair of connective tissue [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.google.ru/patents/US6271213>.

3. Composition and use of ademetionine against ageing of the skin [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.google.com/patents/US4956173>.

4. Stable salts of S-adenosyl-L-methionine with polyanions [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.google.co.in/patents/US4764603>.

5. Sulphonic acid salts of S-adenosylmethionine [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.google.com/patents/US4057686>.

Рецензенты:

Лазарян Д.С., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института, филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск;
Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института, филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 25.12.2013.