

УДК 547.269.3:546.226-325]543.422.3:542.913

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ АДЕМЕТИОНИНА, ЕЕ АНАЛИЗ

Морозов А.В., Кодониди И.П.

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

Разработан биосинтетический способ получения адеметионина. Суть метода заключается в накоплении адеметионина в клетках дрожжей в метионинсодержащей 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 добавлением к лизату 10% раствора пикролоновой кислоты. Образующийся пикролонат адеметионина отстаивают в течение 12 часов, после чего промывают дважды избытком холодной воды и высушивают. На заключительной стадии пикролонат адеметионина разрушают серной кислотой, *p*-толуолсульфокислотой в присутствии органического растворителя, не смешивающегося с водой – *n*-бутанола. Полученную смесь отстаивают в течение 20 минут, далее удаляют органический растворитель, а к водной фазе добавляют небольшое количество *n*-бутанола для удаления остатков пикролоновой кислоты. Получают водный раствор адеметионина, который осаждают этанолом. Полученную соль высушивают и добавляют к ней лактозу в соотношении 1:1.

**Ключевые слова:** адеметионин, двойная соль, биосинтез

## DEVELOPMENT OF A WAY OF RECEIVING SALT OF ADEMETIONINE, IT ANALYSIS

Morozov A.V., Kodonidi I.P.

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

The biosynthetic way of receiving ademetonine is developed. The essence of a method consists in accumulation ademetonine in cages of yeast in the metionin containing environment. Yeast washes out twice excess of cold water, and then lisis within 2 hours by ethyl acetate addition as selective extragent, and also 0,15 M of acid sulfuric. After lisis pounded containing ademet, separinatee 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 ademetonine defend within 12 hours then wash out twice excess of cold water and dry up. At a final stage picrolonate of ademetonine destroy by means of addition by a sulruric, *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 ademetonine which besiege ethanol. Salt dry up and add to it lactose in the ratio 1:1.

**Keywords:** ademetonine, double salts, biosynthesis

В настоящее время адеметионин (S-аденозил-L-метионин) является одним из эффективных гепатопротекторов. Он участвует в реакциях трансметилирования, является биосинтетическим предшественником цистеина, таурина, глутатиона. Наряду с высокой гепатопротективной активностью адеметионин оказывает противовоспалительное, обезболивающее, антидепрессивное действие [1].

В настоящее время субстанция адеметионина в РФ не производится.

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

Из литературных данных известно, что наиболее успешным является биосинтетический способ получения адеметионина. Сущность метода заключается в накоплении адеметионина в дрожжевых клетках в питательной среде, обогащенной метионином, лизисе дрожжевых клеток и выделении адеметионина из лизата в виде стабильной соли.

Ранее нами была получена соль адеметионина с серной и *p*-толуолсульфокислотой. Главным недостатком полученной соли является то, что она гигроскопична, что снижает срок хранения соли [2].

Было найдено, что добавление к двойной соли адеметионина с серной и *p*-толуолсульфокислотой лактозы в соотношении 1:1 приводит к уменьшению влажности полученной соли, а следовательно, повышает срок хранения.

Нами получена субстанция соли адеметионина с серной и *p*-толуолсульфокислотой с добавлением лактозы в соотношении 1:1 следующим образом.

В качестве продуцента адеметионина мы использовали сухие дрожжи рода *Saccharomycetes cerevisiae*, а в качестве питательной среды была выбрана среда Шленка [3].

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. Полученный лизат отделяли от остатков дрожжей при помощи центрифугирования.

На следующей стадии осуществляли очистку лизата. Для этого адеметионин из лизата осаждали 5% водным раствором пикролоновой кислоты. Полученный осадок отстаивали, отфильтровывали и высушивали [4, 5].

На заключительной стадии получали стабильную двойную соль адеметионина с серной толуолсульфокислотой.

К высушенному осадку пикрлоната 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, высушивали при температуре 0–5°C.

Полученная таким образом соль адеметионина представляет собой гигроскопичный порошок, очень легко растворимый в воде, практически нерастворимый в эта-

ноле, ацетоне и других органических растворителях.

Для уменьшения гигроскопичности к полученной соли добавляли лактозу в соотношении 1:1, высушивали в эксикаторе в течение 24 часов.

Для полученной субстанции соли нами были разработаны методики качественного и количественного анализа.

Для качественного анализа двойной соли адеметионина использовали известные химические реакции, а также УФ-спектроскопию.

УФ-спектроскопию использовали для идентификации полученной соли.

Приготовление раствора испытуемого образца. Точную массу соли (0,1 г, что эквивалентно 0,02 г адеметионин-иона) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл воды, растворяли, и доводили тем же растворителем до метки. Аликвоту в количестве 5 мл переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили водой до метки. Регистрировали спектр поглощения в области от 200 до 300 нм.

Приготовление раствора стандартного образца. Из точной массы СО адеметионина сульфата п-толуолсульфоната (0,12 г, что эквивалентно 0,025 г адеметионин-иона) получали раствор по методике, приведенной выше. Раствор сравнения – вода (рис. 1).

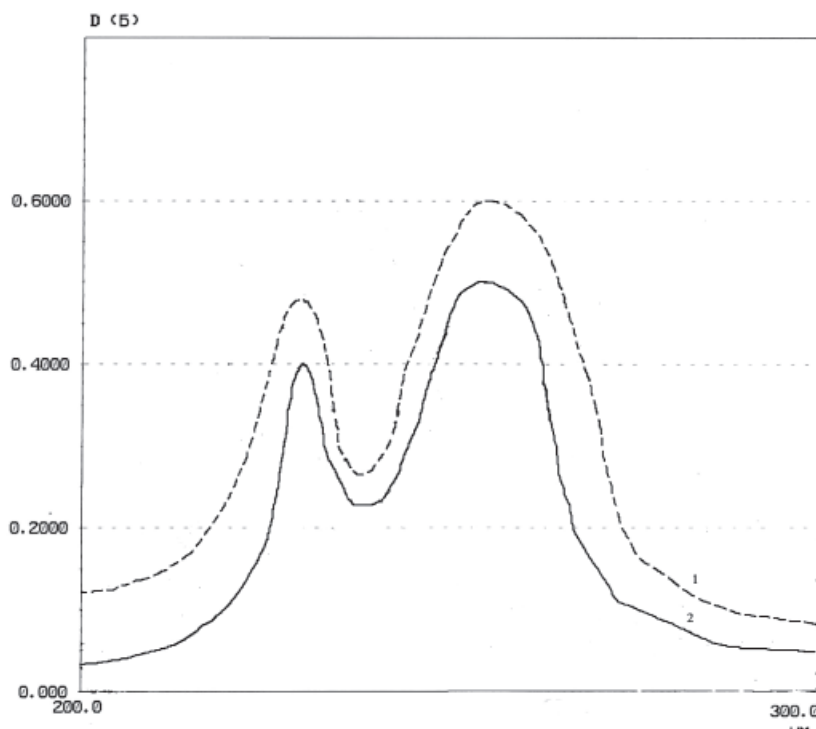


Рис. 1. Спектр поглощения: 1 – водного РСО адеметионина п-толуолсульфоната дисульфата 0,006%; 2 – водного раствора соли адеметионина с серной и п-толуолсульфокислотой 0,005%

Как видно из рис. 1, в спектре поглощения раствора испытуемого образца имеется 2 максимума при длинах волн 231 нм (п-толуолсульфокислота) и 256 нм (адеметионин), которые полностью совпадают и имеют одинаковые максимумы со спектром раствора стандартного образца.

С целью идентификации компонентов соли проводили гидролиз, для этого к водному раствору полученной соли адеметионина добавляли водный раствор натрия гидроксида 1М до значения рН среды 5,0, полученный раствор нагревали в течение 30 минут, после чего охлаждали и определяли наличие остатка метионина, тио-группы, а также сульфат-иона по следующим методикам:

К 2 мл гидролизата добавляли 1 мл водного раствора натрия гидроксида 1М и 0,5 мл свежеприготовленного водного раствора нитропруссиды натрия 5%, после кипячения на водяной бане в течение 10 минут появлялось красно-фиолетовое окрашивание (тио-группа).

К 2 мл гидролизата добавляли водный раствор натрия гидрокарбоната 5% до значения рН среды 6,5–7,0, затем добавляли 1 мл водного раствора нингидрина 10%, кипятили в течение 5 минут при температуре около 100°C – появлялось фиолетовое окрашивание (первичная алифатическая аминогруппа).

К 2 мл полученного гидролизата добавляли 0,5 мл водного раствора бария хлорида 5%, образовывался белый кристаллический осадок, нерастворимый в разведенных минеральных кислотах (сульфат-ион).

Для количественного определения компонентов соли нами разработана спектрофотометрическая методика анализа.

На первом этапе исследований нами были приготовлены водные растворы СО адеметионина сульфата и СО п-толуолсульфокислоты с целью определения возможности использования непосредственно спектрофотометрического метода.

На рис. 2 представлены спектры поглощения полученных растворов.

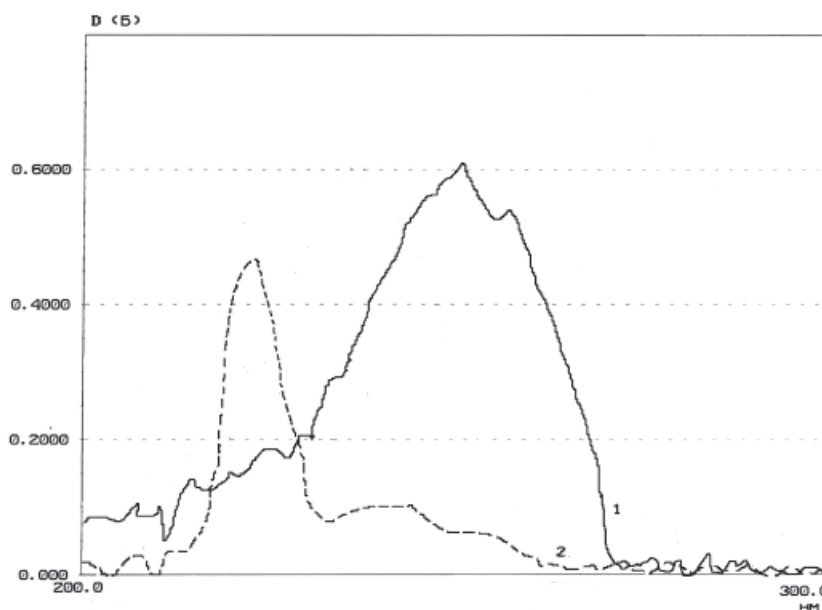


Рис. 2. Спектры поглощения:  
1 – водного раствора СО адеметионина сульфата – 0,003%; 2 – водного раствора СО п-толуолсульфокислоты – 0,002%

Как следует из рис. 2, полосы поглощения веществ перекрываются и делают невозможным непосредственное спектрофотометрическое определение адеметионина и п-толуолсульфокислоты. Поэтому для определения их содержания нами был использован метод Фирордта.

Результаты определения адеметионина и п-толуолсульфокислоты в модельной смеси и двойной соли приведены в табл. 1 и 2.

### Выводы

1. Разработан биосинтетический способ получения субстанции адеметионина с серной и п-толуолсульфокислотой с добавлением лактозы в соотношении 1:1.
2. Разработаны спектрофотометрические методики подлинности субстанции двойной соли адеметионина с серной и п-толуолсульфокислотой.

3. Разработаны методики количественного определения компонентов субстанции двойной соли при помощи спектрофотометрического метода Фирордта.

Таблица 1

Результаты определения адеметионина и п-толуолсульфокислоты в модельной смеси

Взято адеметионина, г	Найдено адеметионина		Взято п-толуолсульфокислоты, г	Найдено п-толуолсульфокислоты	
	г	%		г	%
0,0200	0,01957	97,85	0,1300	0,13236	101,82
0,0250	0,02598	103,92	0,1250	0,12238	97,90
0,0300	0,02935	97,83	0,1200	0,11802	98,35
0,0350	0,03621	103,46	0,1150	0,11796	102,57
0,0400	0,03989	99,73	0,1100	0,10955	99,59
0,0450	0,04511	100,24	0,1050	0,01025	97,62
	Метрологические характеристики $\bar{x} = 100,51$ SD = 2,656 RSD = 2,643		Метрологические характеристики $\bar{x} = 99,64$ SD = 2,103 RSD = 2,111		

Таблица 2

Результаты определения компонентов в соли адеметионина с серной и п-толуолсульфокислотой

Взято соли, г	Найдено адеметионина		Взято соли, г	Найдено п-толуолсульфокислоты	
	г	%		г	%
0,1500	0,03608	24,25	0,1500	0,01706	11,37
0,1800	0,04423	24,57	0,1800	0,02013	11,18
0,2100	0,04411	25,00	0,2100	0,02483	11,82
0,2400	0,05126	26,36	0,2400	0,02419	10,08
0,2700	0,06163	25,83	0,2700	0,02932	10,86
	Метрологические характеристики $\bar{x} = 25,20$ SD = 2,044 RSD = 4,098		Метрологические характеристики $\bar{x} = 11,06$ SD = 1,300 RSD = 5,878		

### 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-adenosylmethionine [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.google.ru/patents/US6276578>.
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 [Jelektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://www.google.ru/patents/US6271213>.

3. Composition and use of ademetionine against ageing of the skin [Jelektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://www.google.com/patents/US4956173>.

4. Stable salts of S-adenosylmethionine [Jelektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://www.google.ru/patents/US6276578>.

5. Sulphonic acid salts of S-adenosylmethionine [Jelektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://www.google.com/patents/US4057686>.

### Рецензенты:

Компанцев В.А., д.фарм.н., профессор кафедры неорганической химии Пятигорского медико-фармацевтического института, филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск;  
Попова О.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института, филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 26.03.2014.