

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **212573**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **389544**

(51) Int.Cl.
C07H 19/048 (2006.01)
C07H 19/10 (2006.01)
C07C 211/62 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **12.11.2009**

(54) **Nowa pochodna czwartorzędowych soli amoniowych i sposób otrzymywania
nowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.05.2011 BUP 11/11

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.10.2012 WUP 10/12

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
BARBARA DMOCHOWSKA, Reda, PL
EUGENIA SKORUPOWA, Gdańsk, PL
ANDRZEJ WIŚNIEWSKI, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Andrzej M. Jaeszke

PL 212573 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem projektu wynalazczego jest nowa pochodna czwartorzędowych soli amoniowych i sposób otrzymywania nowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych.

Szerokie zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych (CSA) wynika z ich wielu interesujących właściwości. Znaczna część tej grupy związków zawiera w swojej strukturze zarówno część hydrofobową jak i hydrofilową, dzięki czemu wykazują one przede wszystkim aktywność powierzchniową i są zaliczane do klasy kationowych związków powierzchniowo czynnych, co opisuje J. Błaszczuk, A. Skrzypczak, w pracy p.t. „Czwartorzędowe sole amoniowe” Poznań 2005, str. 32. Cecha ta pozwala na zastosowanie CSA jako składników detergentów, środków pianotwórczych, emulgatorów, antyelektrostatyków i zmiękczaczy tkanin, co zostało udokumentowane przez E. Grabińska-Sota, w pracy p.t. „Ocena Oddziaływania Czwartorzędowych Soli Amoniowych na Środowisko Wodne”, Gliwice 2004, str. 12. Liczne czwartorzędowe znane sole amoniowe charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną. Aktywność biologiczna wobec bakterii i grzybów jest znana od kiedy Domagk wprowadził środek dezynfekcyjny Zephird, oparty na czwartorzędowych solach amoniowych, co zostało opublikowane przez D. Demberelnyamba, K.-S. Kim, S. Choi, S.-Y. Park, H. Lee, Ch.-J. Kim, I.-D. Yoo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12, 853. Biobójczość wobec powyższych mikroorganizmów znajduje również wykorzystanie w środkach chroniących przed ich pojawieniem się na powierzchni drewna czy tynków, czego dowodzi J. Błaszczuk, A. Skrzypczak w pracy p.t. „Czwartorzędowe sole amoniowe”, Poznań 2005, 32. Literatura, w postaci opracowań D. Demberelnyamba, K.-S. Kim, S. Choi, S.-Y. Park, H. Lee, Ch.-J. Kim, I.-D. Yoo, opublikowanych w *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12, 853 podaje, że istnieje związek pomiędzy właściwościami kationowych związków powierzchniowo czynnych, a ich aktywnością biologiczną, to znaczy że związki o niskiej aktywności powierzchniowej mogą być nieaktywne wobec mikroorganizmów i odwrotnie.

Jak ujawnia literatura tematu, wśród licznych tlenowych kwasów fosforu, kwas fosforowy (V) i jego pochodne zasługują na szczególne wyróżnienie. Organiczne pochodne połączeń tego typu odgrywają bardzo ważne role w podstawowych procesach życiowych. Do tego typu połączeń należą między innymi kwasy nukleinowe, fosfolipidy oraz szereg koenzymów, a także produkty wyjściowe w wielu procesach metabolicznych w postaci pochodnych fosforowych i polifosforowych.

Proces fosforylacji można przeprowadzić na trzy różne sposoby. Na drodze enzymatycznej, na drodze syntezy chemicznej lub na drodze łączącej enzymatyczną syntezę z chemiczną. Metody enzymatyczne i enzymatyczno-chemiczne pozwalają na skuteczną syntezę fosforylowanych produktów, jednak nie są chętnie stosowane ze względu na wysoki koszt enzymów. Głównie z tego powodu ważne jest poszukiwanie sposobu i metod wprowadzania grupy fosforanowej na drodze chemicznej syntezy.

Czwartorzędowe sole amoniowe są szeroko znane i opisane w literaturze przedmiotu, natomiast w przypadku czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych cukrów, wiedza o ich syntezie i wykorzystaniu jest niewielka.

Znane i opisane czwartorzędowe sole *N-D*-glikopiranozyloamoniowe wykazują wady, do których zalicza się zwłaszcza niską wydajność i niewielką aktywność biologiczną.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie opracowania nowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych i sposobu otrzymywania nowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych, jako pochodnej związków naturalnie występujących w przyrodzie, wykazującej prawdopodobnie korzystne działanie przeciwwgrzybiczne i pozwalającej, po uprzednim zbadaniu, na wykorzystanie w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym.

Nowa pochodna czwartorzędowych soli amoniowych charakterystyczna tym według wynalazku, że stanowi ją 1,4-anhydro-2-deoksy-3-*O*-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-*D*-rybitol.

Sposób otrzymywania nowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych charakterystyczny tym według wynalazku, że od 0,140 g do 0,180 g lecz najkorzystniej 0,165 g ($4,7 \cdot 10^{-2}$ mola) tosyłanu *N*-[(1,4-anhydro-2-deoksy-*D*-rybitol)-5-ilo]pirydynowego o wzorze (5), rozpuszcza w od 1,05 g do 1,40 g, lecz najkorzystniej 1,25 g tlenochlorku fosforu (POCl_3), a następnie całość miesza się w temperaturze otoczenia i umieszcza w naczyniu technologicznym i zatęża się, w celu usunięcia chlorku tosyłu, przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem, utrzymywanym w przedziale od 1 kPa do 2 kPa, lecz najkorzystniej wynoszącym 1,5 kPa, przez okres utrzymywany w przedziale od 5 godzin do 10 godzin, lecz najkorzystniej przez 8 godzin, po którego upływie, zawartość naczynia technologicznego miesza się w temperaturze otoczenia przez

okres utrzymywany w przedziale od 10 godzin do 20 godzin, lecz najkorzystniej przez 16 godzin, a następnie zobojętnia żelem Amberlit COO, mającym liczbę kwasową utrzymywaną w przedziale od pH 4 do pH 6, lecz najkorzystniej pH 5 i ponownie zatęża się przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem utrzymywanym w przedziale od 1 kPa do 2 kPa, lecz najkorzystniej 1,5 kPa i uzyskuje się około 0,10 g związku (6) w postaci gęstopłynnej substancji, którą następnie suszy się w odrębnym naczyniu technologicznym, wypełnionym na dnie pięciotlenkiem fosforu użytym w ilości utrzymywanej w przedziale 10 g do 30 g, lecz najkorzystniej 15 g, w czasie od 20 godzin do 30 godzin, lecz najkorzystniej przez 24 godziny, otrzymując 0,098 g (80,5%) 1,4-anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitolu (6) w postaci słomkowego oleju.

Nowa pochodna czwartorzędowych soli amoniowych, otrzymana sposobem według wynalazku, według analizy widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR 400 MHz) oraz spektrometrii mas (MALDI TOF-MS), potwierdza czystość otrzymanego nowego związku według wynalazku określonego jako 1,4-anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitol (6).

W Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii przeprowadzono testy na mutagenność nowego związku według wynalazku, przy użyciu szczepu bakteryjnego *Vibrio harveyi* [patrz literatura: Chęć E, Podgórska B., Węgrzyn, G., Mutation Research, 2006, 611, 17-24]. Badaniom poddano następujące związki: bromek *N*-(2,3,4,6 tetra-*O*-acetylo- β -D-glukopiranozylo)pirydyniowy, bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -D-gluko-piranozylo)trimetyloamoniowy, mieszaninę bromków *N*-(α - i - β -D-glukopiranozylo)-pirydyniowych, bromek *N*-(β -D-glukopiranozylo)pirydyniowy, bromek *N*-(β -D-gluko-piranozylo)trimetyloamoniowy, tosylian *N*-[(1,4-anhydro-2-deoksy-D-rybitol)-5-ilo]-trimetyloamoniowy, tosylian *N*-[(1,4-anhydro-2-deoksy-D-rybitol)-5-ilo]pirydyniowy. Oczekiwane właściwości mutagenne wykazały wszystkie badane związki. Ponadto, w Zakładzie Enzymologii Molekularnej MWB UG-UM w Gdańsku, przeprowadzono badania dotyczące określenia aktywności biologicznej jako działania hamującego na izolowane enzymy i linie komórkowe, oraz zdolności rozkładu biologicznego związków (katabolizmu) w niefrakcjonowanych homogenatach tkanek zwierzęcych. W celach porównawczych wskazane badania przeprowadzono z wieloma czwartorzędowymi solami amoniowymi: np. tosylianem 1-*n*-butylo-3-metyloimidazoliowym, chlorkiem 1-*n*-butylo-3-metyloimidazoliowym, tetrafluoroboranem 1-*n*-butylo-3-metyloimidazoliowym, bromkiem *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -D-glukopiranozylo)trimetyloamoniowym i bromkiem *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -D-glukopiranozylo)-pirydyniowym. Badania te wykazały, że dwie czwartorzędowe sole amoniowe: bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -D-glukopiranozylo)trimetyloamoniowy i bromek *N*-(2,3,4,6 tetra-*O*-acetylo- β -D-glukopiranozylo)pirydyniowy, wykazywały aktywność inhibitorową typu niekompetycyjnego (odpowiednie EC_{50%} = 0,05 i 0,5 mM), wobec deaminazy AMP (AMD-DA) izolowanej z mięśni szkieletowych szczura [patrz literatura A. Składanowski, P. Stepnowski, K. Kleszczyński, B. Dmochowska, Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19(2), 291]. Z uwagi na istotną rolę tego enzymu w metabolizmie nukleotydów purynowych i jego powszechność występowania, efekty takie mogą mieć znaczenie toksyczne i ekotoksyczne. U podstaw syntezy tej grupy związków leżało m.in. wprowadzenie ugrupowania cukrowego uważanego powszechnie za zdolne do szybkiej degradacji biologicznej.

Najnowsze badania nad czwartorzędowymi solami trimetyloamoniowymi pochodnymi anhydroalditoli, dotyczą syntezy 3-hydroksymuskaryny tj. tosylanu A-[(2*S*,3*S*,4*K*,5*S*)-2,5-anhydro-1,6-dideoksy-heksitol-6-ilo]trimetyloamoniowego z L-ramnozy. Pochodne muskaryny mają zastosowanie w chemioterapii i w leczeniu choroby Alzheimera [patrz literatura Mantell S. J., Ford P. S., Watkin D. J., Fleet G. W. J., Brown D., Tetrahedron, 1993, 49, 3343].

Funkcjonalizowanie 3-pozycji tosylanu *N*-[(1,4 anhydro-2-deoksy-D-rybitol)-5-ilo]pirydyniowego stanowi oddzielny, ciekawy z punktu widzenia działania biologicznego, aspekt technologii objętej wynalazkiem.

Na podstawie powyższych wyników możliwe jest przyjęcie tezy, że otrzymana charakterystycznym sposobem według wynalazku, nowa pochodna czwartorzędowych soli amoniowych jako 1,4-anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitol (6), posiadający w swej strukturze fosfopodstawnik będzie wykazywała większą aktywność biologiczną niż przebadane czwartorzędowe sole *N*-[(1,4-anhydro-2-deoksy-D-rybitol)-5-ilo]amoniowe.

Wynalazek jest szczegółowo opisany na przykładzie jego wykonania i zobrazowany na schemacie przedstawiającym zapis związków chemicznych uczestniczących w procesie.

Sposób otrzymywania 1,4-anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitol (6) polega na tym, że najkorzystniej 0,165 g ($4,7 \cdot 10^{-2}$ mola) tosylanu *N*-[(1,4-anhydro-2-deoksy-D-rybitol)-5-ilo]pirydynowego o wzorze (5), rozpuszcza się w najkorzystniej 1,25 g tlenochlorku fosforu (POCl₃) a następnie całość miesza się w temperaturze otoczenia i umieszcza w naczyniu technologicznym, mającym postać kolby reakcyjnej i zatęża, w celu usunięcia chlorku tosyłu, przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniu wynoszącym najkorzystniej 1,5 kPa. Zabieg ten prowadzi się przez najkorzystniej 8 godzin, po którego upływie zawartość kolby reakcyjnej miesza się w temperaturze otoczenia przez najkorzystniej 16 godzin, a następnie zubożętnia żelem Amberlit COO, mającym liczbę kwasową około pH 5 i zatęża przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem wynoszącym najkorzystniej 1,5 kPa. W wyniku tak przeprowadzonej procedury, uzyskuje się około 0,10 g związku (6) w postaci gęstopylnnej substancji, którą następnie suszy w odrębnym naczyniu technologicznym, zwłaszcza w eksykatorze, wypełnionym na dnie pięciotlenkiem fosforu użytym w ilości najkorzystniej 15 g w czasie najkorzystniej 24 godzin. W wyniku otrzymuje się 0,098 g (80,5%) 1,4-anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitolu (6) w postaci słomkowego oleju.

Analiza NMR otrzymanej sposobem według wynalazku nowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych, potwierdza czystość nowego związku określonego jako 1,4 anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitol (6)

Zapis analizy NMR przedstawia się następująco:

¹H NMR (D₂O): δ 2.11 (m, 2H, H-2, H-2'), 3.91 (q, 1H, *J*_{1',1}, 8.4, H-1'), 4.01 (sekszet, 1H, *J*_{1,2} 4.8, H-1), 4.32 (dt, 1H, *J*_{3,4} 2.8, H-4), 4.48 (dd, 1H, *J*_{4,5} 9.6, *J*_{5,5'}, 14.0, H-5), 4.63 (m, 1H, H-3), 4.86 (dd, 1H, *J*_{4,5'}, 2.8, H-5'), 8.77-8.01 (m, 5H, pirydyna);

¹³C NMR (D₂O): δ 146.50, 145.09, 128.42 (C-pirydyna), 83.20 (C-4), 76.81 (C-3), 67.87 (C-1), 62.55 (C-5), 33.00 (C-2). MALDITOF-MS: *m/z* 260.

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowa pochodna czwartorzędowych soli amoniowych, **znamienna tym**, że stanowi ją 1,4-anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitol.

2. Sposób otrzymywania nowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych, **znamienny tym**, że od 0,140 g do 0,180 g lecz najkorzystniej 0,165 g ($4,7 \cdot 10^{-2}$ mola) tosylanu *N*-[(1,4-anhydro-2-deoksy-D-rybitol)-5-ilo]pirydynowego o wzorze (5), rozpuszcza w od 1,05 g do 1,40 g, lecz najkorzystniej 1,25 g tlenochlorku fosforu (POCl₃), a następnie całość miesza się w temperaturze otoczenia i umieszcza w naczyniu technologicznym i zatęża się, w celu usunięcia chlorku tosyłu, przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem, utrzymywany w przedziale od 1 kPa do 2 kPa, lecz najkorzystniej wynoszącym 1,5 kPa, przez okres utrzymywany w przedziale od 5 godzin do 10 godzin, lecz najkorzystniej przez 8 godzin, po którego upływie zawartość naczynia technologicznego miesza się w temperaturze otoczenia przez okres utrzymywany w przedziale od 10 godzin do 20 godzin, lecz najkorzystniej przez 16 godzin, a następnie zubożętnia żelem Amberlit COO, mającym liczbę kwasową utrzymywaną w przedziale od pH 4 do pH 6, lecz najkorzystniej pH 5 i ponownie zatęża się przez odparowanie w temperaturze otoczenia i pod zmniejszonym w stosunku do atmosferycznego ciśnieniem utrzymywany w przedziale od 1 kPa do 2 kPa, lecz najkorzystniej 1,5 kPa i uzyskuje się około 0,10 g związku (6) w postaci gęstopylnnej substancji, którą następnie suszyć się w odrębnym naczyniu technologicznym, wypełnionym na dnie pięciotlenkiem fosforu użytym w ilości utrzymywanej w przedziale 10 g do 30 g, lecz najkorzystniej 15 g, w czasie od 20 godzin do 30 godzin, lecz najkorzystniej przez 24 godziny, otrzymując 0,098 g (80,5%) 1,4-anhydro-2-deoksy-3-O-hydroksyoksydofosforylo-5-pirydynium-D-rybitolu (6) w postaci słomkowego oleju.

Rysunek



