

URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

59584

Patent dodatkowy
do patentu _____

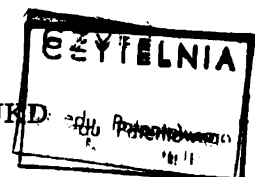
Zgłoszono: 17.I.1967 (P 118 520)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 30.IV.1970

Kl. 6 b, 16/03

MKP C 12 d 9/00



Współtwórcy wynalazku: mgr inż. Wiesław Lewenstein, mgr inż. Zdzisław Zakrzewski, mgr Sabina Raczkowska, mgr Anna Groszkiewicz, mgr Irena Wierzbicka, inż. Maria Iwaszkiewicz, Barbara Sokołowska

Właściciel patentu: Instytut Farmaceutyczny, Warszawa (Polska)

**Sposób wyodrębniania 17 α , 21-dwuhydroksypregnen-4-dionu-3,20
z breczki pofermentacyjnej**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania 17 α , 21-dwuhydroksypregnen-4-dionu-3,20 z breczki pofermentacyjnej. 17 α , 21-dwuhydroksypregnen-4-dion-3,20, ważny produkt pośredni w syntezie kortykoidów, powstaje w wyniku poddawania 3,21-dwuoctanu pregnen-5-triol-3/3, 17 α , 21-onu-20 działaniu odpowiednich drobnoustrojów hydrolizujących, odwodorniających i izomeryzujących, przy czym w skład breczki pofermentacyjnej obok zanieczyszczeń wchodzi zarówno produkt jak i nieprzereagowany substrat sterydowy.

Znany sposób wyodrębniania z breczki pofermentacyjnej mieszaniny obu sterydów polega na bezpośredniej ekstrakcji breczki chlorowcoalkanem lub chlorowcalkenem, po czym pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika rozdziela się chromatograficznie lub przez wielokrotną krystalizację. Przy tym sposobie do ekstraktu dostaje się wiele substancji stanowiących rozpuszczalne i nierozpuszczalne w breczce związki, takie jak substancje białkowe, lipidy, cukry i produkty degradacji tych związków oraz barwniki, pochodzące zarówno z podłoża wzrostowego, jak i powstałe w wyniku procesów metabolizmu, które utrudniają wyodrębnienie produktu i nieprzereagowanego substratu w postaci czystej.

Sposób ten związany jest ze znacznym nakładem pracy i czasu. Tak więc na przykład operowanie dużymi objętościami toksycznych rozpuszczalników zmusza do stosowania specjalnych warunków

2

bezpieczeństwa i higieny pracy, przy czym właściwości zawartych w breczce składników, a głównie zawiesiny mikroorganizmów, prowadzą do powstawania trudnej do rozdzielania wieloskładnikowej warstwy emulsyjnej czyli tzw. interfazy, oraz wchodzi duże zużycie tych rozpuszczalników, a rozdzielanie chromatograficzne lub przez wielokrotną krystalizację jest kłopotliwe i trudne do stosowania w skali przemysłowej.

W pewnych przypadkach rozdzielanie to jest mało skuteczne i produkt daje się wyodrębnić dopiero na drodze chemicznej poprzez na przykład pochodną Girarda, co wydatnie obniża wydajność.

Stwierdzono, że trudności te można ominąć przez oddzielenie części stałych breczki, w których znajduje się przeważająca większość sterydów, wysuszenie osadu i poddanie go kilkakrotnej ekstrakcji za pomocą kilku odpowiednio dobranych rozpuszczalników organicznych, selektywnie rozpuszczających poszczególne składniki, przy czym sposób ten w pełni nadaje się do zastosowania w skali przemysłowej.

Według wynalazku brzeczkę pofermentacyjną zawierającą 17 α , 21-dwuhydroksypregnen-4-dion-3,20 oraz nieprzereagowany 3,21-dwuoctan pregnen-5-triol-3 β , 17 α , 21-onu-20 poddaje się sedymentacji i/lub odwirowaniu bądź odsączeniu, osad suszy się, rozdrabnia i ekstrahuje benzenem, eterem naftowym oraz mieszaniną chlorowcoalkanu, takiego jak chlorek metylenu i niskiego alkanolu, takiego jak

metanol, przy czym rozpuszczalniki te można stosować w różnej kolejności.

Brzeczke pofermentacyjną, uprzednio ogrzaną w ciągu około 1 godziny do temperatury około 100°C w celu ułatwienia sedymentacji i zniszczenia form wegetatywnych drobnoustrojów, pozostawia się na kilka godzin i dekantuje tzw. supernatant od zawiesiny osadu, po czym osad odwirowuje się lub odsacza. W przypadku zmniejszenia szybkości sedymentacji, na przykład przy wzmożonej liczbie komórek drobnoustrojów, zwłaszcza pod wpływem zwiększonego pH środowiska, trzeba przystąpić od razu do odwirowania lub odsączenia części stałych brzeczki.

Oddzielenie osadu prowadzi do pozostawienia w ciekłej fazie brzeczki rozpuszczalnych substancji i barwników, które utrudniają oczyszczanie produktu i substratu sterydowego. Faza ta po oddzieleniu osadu zawiera jeszcze około 2% rozpuszczonych sterydów, jednakże jak stwierdzono opłaca się zrezygnować z tej części sterydów poddając przerobowi sam tylko osad. Tę część sterydów można zresztą wyekstrahować w łatwy sposób z ciekłej fazy brzeczki, ponieważ nie zawiera ona już osadu wywołującego powstawanie trudnej do rozdzielania interfazy.

Wysuszenie osadu przez ogrzewanie w temperaturze 50–60°C pod zmniejszonym ciśnieniem oraz dokładne rozdrobnienie, korzystnie do wielkości ziarna nie większej niż 4 mikrony, powoduje termiczną i mechaniczną denaturację białka oraz pozbawia go właściwości koloidogennych, co nasuwa główną przyczynę powstawania interfazy. Otrzymany w ten sposób osad zawiera obok sterydów komórki drobnoustrojów, lipidy, część barwników i inne zanieczyszczenia, w odmiennym jednak składzie jakościowym i w mniejszej ilości niż surowy produkt otrzymany przez ekstrakcję całej brzeczki.

Dla oddzielenia zanieczyszczonej lipidami mieszaniny produktu i substratu sterydowego stosuje się według wynalazku ekstrakcję osadu mieszaniną chlorowcoalkanu, takiego jak chlorek metylenu i niskiego alkanolu, takiego jak metanol. Dla oddzielenia związków barwnych stosuje się przy tym środki odbarwiające, na przykład węgiel aktywny.

Dla oddzielenia produktu od substratu sterydowego oraz substancji lipidowych stosuje się według wynalazku ekstrakcję benzenem. Natomiast resztę substancji lipidowych oddziela się przez ekstrakcję eterem naftowym.

Kolejność stosowania rozpuszczalników wpływa na jakość i wydajność wyodrębnianego i oczyszczanego produktu i w zależności od potrzeb może być celowo zmieniana.

Najwyższą wydajność produktu uzyskuje się przez ekstrakcję osadu mieszaniną chlorku metylenu i metanolu, korzystnie w stosunku objętościowym 1:1, przy czym do ekstraktu przechodzi produkt i substrat oraz lipidy, odparowanie ekstraktu, wyekstrahowanie z pozostałości substratu i części lipidów za pomocą benzenu i następnie wyekstrahowanie reszty lipidów za pomocą eteru naftowego. Otrzymuje się produkt o zabarwieniu lekko żółtawym.

Produkt niemal bezbarwny, ale o nieco niższej wydajności można uzyskać przez ekstrakcję osadu mieszaniną chlorku metylenu i metanolu, częściowe zagęszczenie ekstraktu, oddzielenie wykrystalizowanej mieszaniny sterydów zanieczyszczonej lipidami, wyekstrahowanie mieszaniny eterem naftowym i następnie wyekstrahowanie mieszaniny sterydów benzenem.

Najbardziej czysty produkt całkowicie bezbarwny i o wysokiej wartości ekstynkcji, uzyskuje się przez poddanie osadu ekstrakcji kolejno benzenem i mieszaniną chlorku metylenu i metanolu, zagęszczenie ekstraktu chlorem metylenu – metanol, odsączenie wykrystalizowanego produktu zanieczyszczonego lipidami i wyekstrahowanie go eterem naftowym.

Poniższe przykłady, w których temperatury podano w stopniach Celsjusza, wyjaśniają bliżej wynalazek.

Przykład I. Brzeczke pofermentacyjną pochodzącą z procesu biotransformacji sterydu w ilości 99,16 g w przeliczeniu na 3,17,21-trójhidroksypregnen-5-on-20 ogrzewano w ciągu 1 godziny w temperaturze 90–100° i pozostawiono do samorzutnego ochłodzenia do temperatury pokojowej. Następnie oddzielono osad od supernatantu odsączając go przez filtr Seitza i wysuszone pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze około 55°. Otrzymany osad w ilości 100,75 g sproszkowano w moździerzu, przeniesiono do kolby okrągłodennej, dodano 1000 ml mieszaniny chlorku metylenu z metanolem w stosunku objętościowym 1:1 i mieszano w temperaturze pokojowej przez jedną godzinę z dodatkiem 3% węgla aktywnego w stosunku do wagi osadu.

Osad odsączono przez sączkę Schotta G4 i przemyto wielokrotnie małymi porcjami mieszaniny chlorku metylenu-metanol aż do całkowitego odmycia sterydów. Połączone przesączy zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze około 50° do konstystencji gęstej papki i pozostawiono przez kilka godzin. Wydzielony osad odsączono i przemyto kilkoma porcjami wrzącego eteru naftowego, frakcja 35–65°, usuwając w ten sposób substancje lipidowe.

Z przesączu chlorek metylenu-metanol uzyskano w analogiczny sposób II i III rzut mieszaniny sterydów. Połączone produkty uwolniono od nieprereagowanego substratu (w postaci głównie dwuocetanu z domieszką octanu i alkoholu) przez ekstrakcję benzenem w ilości 90 ml na 1 g zawartego w nich 3,21-dwuocetanu 3,17,21-trójhidroksypregnen-5-onu-20. W tym celu ogrzewano mieszaninę do wrzenia utrzymując zawartość kolby w tej temperaturze przy energicznym mieszaniu w ciągu jednej godziny.

Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej zawartość kolby przesączono przez sączkę Schotta G3, osad przemyto 2–3-krotnie małymi porcjami benzenu i wysuszone. Uzyskano chromatograficznie czysty 17,21-dwuhydroksypregnen-4-dion-3,20 z wydajnością 77,6% o ekstynkcji $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 451\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ m}\mu$. Z roztworu benzenowego zawierającego mieszaninę nieprereagowanego substratu i produktu w stosunku ilościowym około 4:1 oddestylowa-

no rozpuszczalnik i wyodrębnione substancje sterydowe skierowano do ponownej biotransformacji.

Przykład II. Z otrzymanego jak w przykładzie I przesącza oddestylowano chlorek metylenu i metanol. Otrzymaną suchą pozostałość uwolniono od nieprzereagowanego substratu i większości lipidów przez ekstrakcję wrzącym benzenem w sposób opisany w przykładzie I i usunięto resztki substancji lipidowych przemywając ją porcjami wrzącego eteru naftowego frakcja 35–65°, a następnie wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze około 55°. Otrzymano chromatograficznie czysty lekko żółtawy 17,21-dwuhydroksypregnen-4-dion-3,20 z wydajnością 79,7% o ekstynkcji $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 452$ przy λ 240 m μ . Przesącz benzenowy odparowano do sucha, pozostałość przemyto wrzącym eterem naftowym i wyodrębniony substrat (w postaci mieszaniny dwuocanu, octanu i wolnego alkoholu) z domieszką produktu skierowano do ponownej biotransformacji.

Przykład III. Otrzymany jak w przykładzie I wysuszony i sproszkowany surowy produkt biotransformacji przeniesiono do kolby okrągłodennej, dodano benzenu w stosunku 90 ml benzenu na 1 g zawartości w osadzie pierwotnego substratu sterydowego i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w ciągu 1 godziny w temperaturze wrzenia przy energicznym mieszaniu. Zawartość kolby pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej, po czym osad odsączono i przemyto 2–3 razy małymi porcjami benzenu.

Następnie z osadu na sączku wymywano 17,21-dwuhydroksypregnen-4-dion-3,20 mieszaniną chloru metylenu i metanolu (stosunek objętościowy 1 : 1), stosowaną małymi porcjami, aż do całkowitego wyekstrahowania tego związku. Otrzymany eks-

trakt zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem do konsystencji gęstej papki i pozostawiono w chłodni w ciągu 8 godzin. Wydzielony osad odsączono, prze-
myto kilkoma małymi porcjami wrzącego eteru
naftowego frakcja 35–65° i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze około 55°. Uzy-
skano chromatograficznie czysty 17,21-dwuhydro-
ksypregnen-4-dion-3,20 z wydajnością 63,5% o eks-
tynkcji $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 462$ przy $\lambda_{\text{max}} = 240$ m μ . Przesącz
benzenowy przerobiono w sposób opisany w przy-
kładzie II.

Przykład IV. Z otrzymanego jak w przykładzie III roztworu 17,21-dwuhydroksypregnen-4-dionu-3,20 w mieszaninie chlorku metylenu i metanolu oddestylowano całkowicie rozpuszczalniki, pozostałość w kolbie poddano kilkakrotnej ekstrakcji eterem naftowym frakcja 35–65° w celu oddzielenia resztek substancji lipidowych i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 55°. Uzyskano chromatograficznie czysty 17,21-dwuhydroksypregnen-4-dion-3,20 z wydajnością 74,3% o ekstynkcji $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 462$ przy $\lambda_{\text{max}} = 240$ m μ .

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wyodrębniania 17 α , 21-dwuhydroksypregnen-4-dionu-3,20 z brzezki pofermentacyjnej zawierającej nieprzereagowany substrat sterydowy, **znamienny tym**, że brzeczkę poddaje się sedimentacji i/lub odwirowaniu bądź odsączeniu, osad suszy się, rozdrabnia i ekstrahuje benzenem, eterem naftowym oraz mieszaniną chlorowcoalkanu, takiego jak chlorek metylenu i niższego alkanolu, takiego jak metanol, przy czym rozpuszczalniki te można stosować w różnej kolejności.