



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

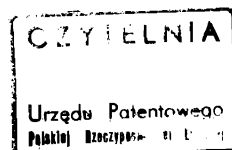
Zgłoszono: 17.02.78 (P. 204730)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 21.05.79

Opis patentowy opublikowano: 10.08.1982

Int. Cl.² C07C 103/19



Twórcy wynalazku: Ryszard Heropolitański, Kazimierz Czarny, Jolanta Sochacka, Barbara Mucha, Lucyna Michalska

Uprawniony z patentu: Instytut Chemii Przemysłowej, Warszawa; Krakowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”, Kraków (Polska)

Sposób izolacji tetracyklin

I

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji tetracyklin, powstałych w wyniku biosyntezy, z bulionu po oddzieleniu go od biomasy bądź z ługów po wytrąceniu zasad technicznych. Tetracykliny stanowią grupę antybiotyków pokrewnych pod względem chemicznym i o zbliżonych własnościach fizycznych. Antybiotyki te mają czteropierścieniowy układ oparty na szkielecie tetracykliny, jest to układ typu naftacenu. Różnice w budowie chemicznej tetracyklin dotyczą węgla 5,6,7, pierścienia naftacenowego. Podstawowymi antyniotykami tej grupy są: tetracyklina, oksyteracyklina i chlorotetracyklina.

Tetracykliny wytwarzane są na drodze biosyntezy przez szereg drobnoustrojów z grupy promieniowców jak: *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces armillatus* bądź ich mutanty. Odpowiednio wyhodowane kultury promieniowców wprowadza się do tanków produkcyjnych do złoża pożywki. W okresie fermentacji wymagającej odpowiedniego czasu i temperatury w zależności od użytego szczepu i składu pożywki, powstaje odpowiedni antybiotyk.

Tetracykliny tworzą podczas procesu fermentacji trudno rozpuszczalne w wodzie sole z jonami wapnia i magnezu znajdującymi się w brzeczce. W czasie procesu biosyntezy związki te okładowane są na grzybni tak, że ich stężenie w płynie fermentacyjnym nie jest zbyt wysokie. Po zakończeniu fermentacji, w celu zwolnienia antybiotyku w sól

2

rozpuszczalną w wodzie, brzeczkę zakwasza się kwasem szczawiowym lub siarkowym do pH ok. 2 i poddaje odsączeniu od biomasy, najczęściej na filtrach obrotowych. Po odsączeniu od biomasy uzyskuje się klarowną ciecz, zwaną bulionem, zawierającą rozpuszczalne w wodzie sole antybiotyku.

Istnieje obecnie kilka metod wydzielania tetracyklin z bulionu i następnie ich oczyszczania. Stosowane są metody ekstrakcyjne, wymiany jonowej oraz metody strąceniowe. W przemyśle najczęściej stosuje się metody strąceniowe, obejmujące dwa sposoby izolacji (wydzielania). Sposób pierwszy polega na wytrąceniu nierozpuszczalnego kompleksu tetracyklin. W tym celu do bulionu dodaje się 0,5—1% soli czwartorzędowej zasady amoniowej np. bromku centylopirydynowego i soli magnezu. Wytrąca się osad zawierający związek kompleksowy antybiotyku, który odsąca się i po przemyciu wodą, rozpuszcza w roztworze kwasu szczawiowego i solnego, oczyszcza węglem aktywnym i wytrąca techniczną zasadę podwyższając pH roztworu do wartości 4,0—4,5, dodając wodnego roztworu amoniaku.

Inny sposób strąceniowy polega na bezpośrednim wytrąceniu zasady z bulionu. Metoda ta wymaga jednak wcześniejszego usunięcia białek, barwników oraz wapnia, co osiąga się przez traktowanie bulionu żelazocyjankiem potasu i siarczanem cynku, a także kwasem szczawiowym. Następnie, po odsączeniu powstałych osadów, wytrąca się zasadę

podnosząc pH roztworu do 4,0—5,0 wodą amoniakalną.

Otrzymaną surową zasadą rozpuszcza się powtórnie w kwasie i znów wytrąca celem dodatkowego oczyszczania. Omówiona metoda, poza koniecznością stosowania szeregu kłopotliwych operacji technologicznych, posiada bardzo poważną zasadniczą wadę, cechuje się mianowicie znacznymi stratami antybiotyku. Ługi po wytrąceniu i odsączeniu surowych tetracyklin zawierają przeciętnie od 1000 do 1500 j.d./cm³ (jednostek międzynarodowych na cm³) antybiotyku, jest to ilość sięgająca niekiedy 25% zawartości antybiotyku w brzeczce.

Znane są również metody izolacji tetracyklin na wymienniaczach jonowych.

Metody jonitowe bazują na tym, że tetracykliny posiadają charakter amfoteryczny. Są one wychwytywane na grupach funkcyjnych silnie kwaśnych kationitów. Izolacja tetracyklin na wymienniaczach jonowych przebiega z dobrą wydajnością. Metody jonitowe mają jednak dwie zasadnicze wady. Tetracykliny są nietrwałe zarówno w środowisku silnie kwaśnym jak i zasadowym. Częsteczki tetracyklin zasorbowane na grupach funkcyjnych silnie kwaśnych kationitów ulegają częściowo procesowi odbudowy głównie do dehydrotetracyklin. Proces desorpcji tetracyklin z kationitu wymaga przemycania złoża wodnymi bądź niewodnymi roztworami wodorotlenków, co z kolei powoduje alkaliczny rozkład częsteczek. Opisane trudności są powodem, że metody izolacji tetracyklin na wymienniaczach jonowych nie zostały w większej skali zastosowane w przemyśle.

W wyniku szeregu przeprowadzonych prac stwierdzono, że podczas procesu biosyntezy poza tetracyklinami powstają, ogólnie biorąc dwie grupy produktów ubocznych. Pierwsza grupa to wielocząsteczkowe substancje barwne o niezidentyfikowanej budowie trudno rozpuszczalne w wodzie albo dość dobrze rozpuszczalne w wodnych roztworach tetracyklin. Są to substancje stanowiące głównie źródło zanieczyszczeń tetracyklin, trudnych do usunięcia zarówno przy stosowaniu metod ekstrakcyjnych, wytrąceniowych jak i jonitowych.

Druga grupa produktów ubocznych to substancje małowcząsteczkowe będące częściowo produktami odbudowy tetracyklin a także nieprzefermentowane składniki pożywki. Istnieje cały szereg adsorbentów zarówno naturalnych jak i syntetycznych wykazujących duże zdolności adsorbowania tetracyklin. Niestety jak stwierdzono, wszystkie dostępne i przebadane adsorbenty wykazujące duże powinowactwo do częsteczek tetracyklin również bardzo dobrze adsorbują produkty uboczne a w szczególności wielocząsteczkowe substancje barwne. Eluaty uzyskiwane z takich adsorbentów na drodze desorpcji są bardzo silnie zanieczyszczone i wydzielenie z nich antybiotyków jest bardzo trudne, poza tym wydzielone antybiotyki są również silnie zanieczyszczone. Próby selektywnej desorpcji dały efekty bardzo nieznaczne.

W trakcie przeprowadzanych prób, stwierdzono jednak nieoczekiwane, że słabozasadowe żywice anionowymienne zastosowane w formie zablokowanych grup funkcyjnych np. typu Wofatyt AD-41

lub Acyberlist AD-21 wykazują bardzo niewielką zdolność adsorpcji tetracyklin, natomiast silnie adsorbują zanieczyszczenia, głównie wielkocząsteczkowe substancje barwne. Na tych stwierdzeniach oparty został sposób według wynalazku. Polega on na tym, że bulion po odfiltrowaniu biomasy z środowiska kwaśnym przy pH 1,5—5,6 zawierający rozpuszczony chlorek bądź siarczan tetracyklin i produkty uboczne (zanieczyszczenia) przepuszcza się przez układ co najmniej dwóch kolumn pracujących szeregowo, z których pierwsza wypełniona jest anionitem, którego grupy funkcyjne są zablokowane anionem kwasu mineralnego, na przykład w formie chlorkowej lub siarczanowej, natomiast następna bądź następne kolumny wypełnione są makroporowatą żywicą adsorpcyjną, do której tetracykliny wykazują duże powinowactwo.

Zasorbowaną tetracyklinę z kolumny wypełnionej żywicą adsorpcyjną desorbuje się przez przemycanie 15—40% roztworem acetonu lub metanolu zakwaszonym kwasem mineralnym do pH około 1—5. W takich warunkach desorpcji ulegają prawie wyłącznie tetracykliny, które wydzielają się z eluatów znaną metodą stosując zmianę pH.

Następnie złożę żywicy adsorpcyjnej przemycamy się acetonem bezwodnym lub czystym metanolem bądź wodnymi ich roztworami o zawartości wody nie większej jak 40% w celu usunięcia zasorbowanych zanieczyszczeń i przygotowania kolumny do następnego cyklu pracy.

Desorpcję zanieczyszczeń z kolumny anionitowej przeprowadza się podobnie jak zanieczyszczeń z żywicy adsorpcyjnej stosując czyste rozpuszczalniki niewodne bądź też rozpuszczalniki z niewielką ilością wody, przy czym korzystne jest zakwaszenie roztworu.

Stwierdzono nieoczekiwane, że złożę anionitu zablokowane anionem kwasu mineralnego adsorbuje większość zanieczyszczeń, głównie wielkocząsteczkowych substancji barwnych; nieznaczne ilości zanieczyszczeń, być może o innej budowie częsteczki bądź o mniejszym ciężarze cząsteczkowym, przechodzą przez złożę kolumny anionitowej i zostają zasorbowane razem z tetracyklinami na żywicy adsorpcyjnej. Stwierdzono jednak, że substancje te są bardzo słabo desorbowane przez zakwaszone wodne roztwory rozpuszczalników organicznych, takich jak na przykład aceton czy metanol.

Jako żywicę adsorpcyjną stosuje się korzystnie niepolarną, hydrofobową, syntetyczną żywicę adsorpcyjną o dużej powierzchni właściwej typu Amberlit XAD-4 lub XAD-2. Ze względu na amfoteryczny charakter tetracyklin można je adsorbować również na adsorbentach hydrofilowych średnio bądź silnie polarnych jednakże wówczas następuje również sorbowanie znacznych ilości niskocząsteczkowych produktów ubocznych.

Sposób według wynalazku może być stosowany samodzielnie do izolacji tetracyklin z bulionu uzyskanego z brzeczki po oddzieleniu biomasy, bądź też jako metoda uzupełniająca przy istniejących innych metodach izolacji do wychwytywania i wydzielenia resztek antybiotyków z ługów i ścieków produkcyjnych. Stosowanie jej umożliwia osiągnięcie wysokich wydajności izolacji i oczyszczania.

Przykład I. Bulion po biosyntezie oksytetracykliny (po odsączeniu biomasy) o pH 1,9 zawierający 5670 j_d/cm³ antybiotyku przepuszczano przez układ trzech kolumn. Pierwsza kolumna wypełniona była makroporowatą żywicą anionowymienią w formie chlorkowej (typ: Wofatyt AD-41). Dwie pozostałe kolumny wypełnione były makroporowatą syntetyczną żywicą sorpcyjną o właściwościach hydrofobowych (Amberlit XAD-4). Ługi przepuszczano przez układ kolumn z prędkością 4 objętości na objętość złoża na godzinę.

Po przepuszczeniu przez kolumny około 25 objętości cieczy licząc na objętość złoża jednej kolumny, stwierdzono, że wyciek po kolumnie 2 zawierał 4900 j_d/cm³ antybiotyku, natomiast wyciek po kolumnie 3—85 j_d/cm³. W tym momencie cykl sorpcji uznano za zakończony i kolumnę, która pracowała jako druga poddano desorpcji w celu odzysku oksytetracykliny oraz zregenerowaniu powierzchni adsorbentu. Desorpcję antybiotyku oraz regenerację powierzchni adsorbentu przeprowadzono w sposób następujący: Przez złożę kolumny przepuszczono od góry wodny roztwór acetonu o zawartości 30% acetonu zakwaszony kwasem siarkowym do pH 1,5.

Po odebraniu około 2 objętości cieczy rozpoczęto odbieranie właściwej frakcji eluatu. Roztwór wodno-acetonowy przepuszczano z prędkością 1,5 objętości złoża na godzinę. Ogółem przez złożę przepuszczono 1,5 objętości roztworu wodno-acetonowego licząc na objętość złoża w kolumnie.

Następnie złożę przemywano acetonem bezwodnym w ilości 1 objętość na objętość złoża w celu usunięcia zanieczyszczeń. Ciemno zabarwiony wyciek acetonowy odbierano osobno i kierowano do odzysku acetonu. Z frakcji eluatu zawierającego oksytetracyklinę wydzielano antybiotyk przez podwyższenie pH znaną metodą. Kolumnę pierwszą zawierającą anionit w formie chlorkowej regeneruje się po stwierdzeniu, że złożę nie sorbuje już zanieczyszczeń barwnych. Regenerację taką przeprowadza się po 3—4 cyklach sorpcji.

Regenerację złoża anionitu przeprowadzano w sposób podobny z tą różnicą, że przemywano je acetonem o zawartości 20% wody zakwaszonym do pH ok. 2. Przez złożę przepuszczano 2 objętości acetonu i cały wyciek kierowano do odzysku acetonu znaną metodą. Po przemyciu złoża acetonem, zarówno w przypadku regeneracji kolumny pierwszej jak i drugiej złożę przemywano następnie wodą w ilości 4 objętości na objętość złoża w celu odmycia acetonu.

Przykład II. Przez układ trzech kolumn podobnie jak w przykładzie I przepuszczano ługi po

wytrąceniu technicznej tetracykliny o zawartości antybiotyku 810 j_d/cm³. Ługi przepuszczano z prędkością 5 objętości na objętość złoża na godzinę do chwili, kiedy po drugiej kolumnie stężenie antybiotyku wynosiło 520 j_d/cm³. Nastąpiło to po przepuszczeniu 150 objętości cieczy, po czym drugą kolumnę odłączono do odzysku antybiotyku.

Desorpcję tetracykliny prowadzono w sposób podobny jak w przykładzie I z tą różnicą, że stosowano wodno-acetonowy roztwór o zawartości 20% acetonu zakwaszony kwasem solnym do pH 1,5.

Przykład III. Przez układ kolumn podobnie jak w przykładzie I i II przepuszczano ługi po wytrąceniu technicznej oksytetracykliny (metodą wytrąceniową) o pH 5,2 i zawartości antybiotyku 1100 j_d/cm³.

Ługi przepuszczano z prędkością 4 objętości podobnie jak w przykładzie I do chwili kiedy wyciek po drugiej kolumnie zawierał 850 j_d/cm³ antybiotyku. Nastąpiło to po przepuszczeniu 150 objętości cieczy. Desorpcję antybiotyku prowadzono w sposób podobny jak w przykładzie I z tą różnicą, że stosowano wodno-metanolowy roztwór o zawartości 25% metanolu, zakwaszony kwasem siarkowym do pH 3,5.

Regenerację złoża anionitu przeprowadzono również w sposób podobny jak w przykładzie I z tym, że zamiast acetonu stosowano alkohol metylowy o zawartości 10% wody, zakwaszony kwasem siarkowym do pH 2.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób izolacji tetracyklin z wodnego roztworu soli tych związków znajdujących się w bulionie lub w ługach uzyskanych po wytrąceniu tetracyklin technicznych przy użyciu żywic sorpcyjnych i jonowymiennych, **znamienny tym**, że wodny roztwór soli tetracyklin mający odczyn kwaśny o pH 1,5—5,6 przepuszcza się przez złożę słabozasadowego anionitu, którego grupy funkcyjne są zablokowane anionem kwasu mineralnego, następnie z wycieku antybiotyk sorbuje na złożu makroporowatej żywicy sorpcyjnej, po czym desorbuje przemywając złożę 15—40% wodnym roztworem acetonu lub metanolu zakwaszonym do pH 1—5 i z eluatu wydziela się czysty związek znanym sposobem, a złożę anionitu i makroporowatej żywicy sorpcyjnej przemywa się acetonem bezwodnym lub metanolem bądź wodnym roztworem tych substancji o zawartości powyżej 60% acetonu lub metanolu, przy czym korzystne jest zakwaszenie roztworu.

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej