



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 18.XII.1964 (P 106 679)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 20.III.1968

Kl. 30 h, 6

MKP ~~A 01 k~~

C 12 d, 9/14

Współtwórcy wynalazku: John Vandeputte, Urs F. Nager

Właściciel patentu: E. R. Squibb and Sons, Inc., Nowy Jork (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób ekstrahowania nystatyny z grzybni wyodrębnionej z brzeczek fermentacyjnej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób ekstrahowania nystatyny z grzybni wyodrębnionej z brzeczek fermentacyjnej.

Nystatyna jest antybiotykiem, wytwarzanym przez hodowlę *Streptomyces noursei* w jałowym, ciepłym środowisku odżywczym, zawierającym przyswajalny węgiel i azot. Znany sposób wyodrębniania nystatyny polega na tym, że ze środowiska odżywczego oddziela się grzybnię i ekstrahuje ją niższym alkoholem lub niższym alkiloketonem, po czym z wyciągu wyosabia się nystatynę. Sposób ten jest jednak dość skomplikowany, gdyż obejmuje wiele czynności, a wydajność produktu zazwyczaj jest mała, gdyż wynosi 35—50% wydajności teoretycznej, przy czym otrzymuje się nystatynę o mocy do około 200 jednostek na 1 mg.

Sposób według wynalazku nie ma opisanych wad i umożliwia uzyskiwanie nystatyny z większą wydajnością i o wyższej czystości. Sposób ten polega na ekstrahowaniu nystatyny z wilgotnej od wody grzybni, wyosobnionej z brzeczek fermentacyjnej, zawierającej nystatynę. Ekstrakcję tę prowadzi się za pomocą niższego alkanolu, korzystnie metanolu, kwasu organicznego, takiego jak: kwas szczawiowy, malonowy, bursztynowy lub cytrynowy, również korzystnie za pomocą kwasu mineralnego, takiego jak: kwas solny lub kwas siarkowy oraz aminy, takiej jak: pierwszo-, drugo-, lub trzeciorzędowa alkilo- lub hydroksyalkilamina z niższym rodnikiem alkilowym, na przykład za pomocą metyloaminy, etanoloaminy,

2

dwumetyloaminy, dwuetyloaminy lub metyloetanoloaminy, najkorzystniej jednak za pomocą trójhdroksy- lub trójalkilo-, jak trójmetylo-, trójetylo- lub trójetanoloaminy, przy czym dobiera się taki stosunek kwasu i aminy, aby otrzymany roztwór był zasadniczo obojętny i wykazywał wartość pH około 6,0—6,5, korzystnie 6,0—6,2 i następnie wyodrębnia się nystatynę rozpuszczoną w tym roztworze.

Poddawaną ekstrakcji wyjściową grzybnię z antybiotykiem otrzymuje się przez odsączenie jej lub odwirowanie z brzeczek fermentacyjnej, korzystnie z uprzednio dodanym pomocniczym materiałem filtracyjnym, na przykład Hyflo. Przesącz odrzuca się, a z wyosobnionej, wilgotnej grzybni ekstrahuje się nystatynę za pomocą układu: kwas, amina, alkanol. Kolejność dodawania poszczególnych składników tego układu jest wprawdzie dowolna, ale korzystnie jest rozpuszczać nystatynę traktując grzybnię alkoholem w obecności kwasu. Nadmiar kwasu jest wówczas zobojętniany aminą po rozpuszczeniu nystatyny.

W przypadku niektórych brzeczek fermentacyjnych stwierdzono nieoczekiwanie, że jeżeli kwas i aminę dodaje się razem w postaci addycyjnej soli aminy z kwasem, to i wtedy nystatyna jest rozpuszczana w alkanolu. Taki sposób jest bardzo korzystny, gdyż unika się ewentualnego rozkładania nystatyny w środowisku kwaśnym. W związku z tym, najkorzystniej jest według wynalazku stosować jako układ do ekstrahowania roztwór addycyjnej soli trzeciorzędowej aminy z kwasem mineralnym, na

przykład siarczanu trójetiloaminy lub lepiej siarczanu trójetanolioaminy, w niższym alkanolu.

Ilość dodawanego alkanolu nie jest zasadniczo ograniczona, jednak w celu całkowitego przeprowadzenia nystatyny z grzybni do fazy wodno-alkanolowej należy dodać co najmniej 2 ml alkanolu na 1 g wilgotnej grzybni. Poza tym, w celu uniknięcia konieczności usuwania dużych ilości rozpuszczalnika po etapie ekstrakcji, nie jest wskazane stosować więcej niż około 2,5 ml alkanolu na 1 g grzybni.

Aminę stosuje się korzystnie w ilości około 0,02—0,05 ml na 1 ml alkanolu. Ilość kwasu ustala się tak, aby otrzymać żądane granice wartości pH, jak wspomniano wyżej. Ilość wody nie jest czynnikiem decydującym, ale wskazane jest stosować nie więcej niż około 0,25 ml wody na 1 ml alkanolu.

Po dodaniu alkanolu, kwasu i aminy i rozpuszczeniu nystatyny, roztwór oddziela się od wyekstrahowanej grzybni przez odsączenie lub odwirowanie, po czym grzybnę przepłukuje się dodatkową porcją alkanolu w celu wyosobnienia pozostającej w niej jeszcze nystatyny. W celu wydzielenia nystatyny z roztworu, przesącz i ewentualnie popłuczyny stęży się pod zmniejszonym ciśnieniem i do pozostałości dodaje ketonu, mającego zdolność mieszania się z wodą, na przykład acetonu. Otrzymany roztwór ogrzewa się do temperatury około 45—55°C, najkorzystniej około 50—52°C i następnie chłodzi. Z roztworu wykryształizowuje zasadniczo czysta nystatyna.

Poniższe przykłady objaśniają bliżej sposób według wynalazku.

Przykład I. Do brzeczki fermentacyjnej, uzyskanej w wyniku fermentacji *Streptomyces noursei* w wodnej pożywce z mączką sojową i melasą, dodaje się pomocniczego materiału filtracyjnego Hyflo w ilości 4% wagowo/objętość brzeczki, po czym odsącza się mieszaninę i wyosabia grzybnę. 200 g otrzymanej w ten sposób grzybni, zawierającej nystatynę w ilości 120200 jednostek na 1 g, dodaje się do 1080 ml metanolu i mieszając energicznie traktuje 40%-owym kwasem siarkowym aż do uzyskania wartości pH=3. Miesza się przy tej wartości pH w ciągu 7 minut i następnie dodaje trójetiloaminy aż do uzyskania wartości pH=6,8. Przy tej wartości pH miesza się dalej w ciągu 10 minut, po czym odsącza, przemywa osad na sączku 90%-owym roztworem wodnym metanolu i odsącza. Przesącz i popłuczyny odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 55 ml i dodaje do 55 ml 40%-owego roztworu wodnego acetonu, ogrzanego uprzednio do temperatury 45—50°C. Następnie dodaje się tyle trójetiloaminy, aby uzyskać pH=6,5 i przy powolnym mieszaniiu ogrzewa w ciągu ½ godziny. Następnie chłodzi się mieszaninę do temperatury pokojowej w ciągu około 45 minut i miesza w tej temperaturze w ciągu 1 godziny. Otrzymany krystaliczny produkt odsącza się, przemywa 50 ml 40%-owego roztworu wodnego acetonu i następnie 100 ml ecetonu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany produkt zawiera 4500 jednostek nystatyny na 1 mg, a całkowita wydajność procesu, w przeliczeniu na nystatynę zawartą w suchej grzybni, wynosi 90%.

Przykład II. 200 g grzybni, otrzymanej w sposób opisany w przykładzie I i zawierającej nysta-

tynę w ilości 103200 jednostek na 1 g, dodaje się do 280 ml alkoholu izopropylowego, a następnie 600 ml 50%-owego roztworu wodnego alkoholu izopropylowego, w celu uzyskania objętości roztworu 1 litr. Do otrzymanego roztworu, przy silnym mieszaniiu dodaje się 40%-owy roztwór wodny kwasu siarkowego aż do uzyskania wartości pH=7 i miesza przy tej wartości pH w ciągu 7 minut. Następnie dodaje się trójetiloaminy do uzyskania wartości pH=6,8, miesza w ciągu 10 minut i odsącza. Osad przemywa się 100 ml 60%-owego roztworu wodnego alkoholu izopropylowego i odsącza do sucha. Przesącz i popłuczyny stęży się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 95 ml i dodaje do 95 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu. Wartość pH mieszaniny nastawia się za pomocą kwasu solnego na 6,5 i ogrzewa mieszaninę w ciągu ½ godziny w temperaturze 45—50°C. Następnie chłodzi się mieszaninę do temperatury pokojowej i w tej temperaturze miesza łagodnie w ciągu nocy. Wytrącone kryształy odsącza się, przemywa 50 ml acetonu rozcieńczonego wodą i następnie 100 ml acetonu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskuje się produkt o zawartości nystatyny w ilości 4760 jednostek na 1 mg, zaś wydajność procesu w przeliczeniu na nystatynę zawartą w suchej grzybni wynosi 98%.

Przykład III. 200 g grzybni, otrzymanej w sposób opisany w przykładzie I i zawierającej 103200 jednostek nystatyny na 1 g, miesza się z 1060 ml bezwodnego etanolu i silnie mieszając traktuje 40%-owym roztworem wodnym kwasu siarkowego aż do uzyskania wartości pH=3. Przy tej wartości pH miesza się w ciągu 7 minut i następnie dodaje trójetiloaminy aż do uzyskania wartości pH=6,8. Po 10 minutach mieszaniiu odsącza się, osad przemywa 100 ml 80%-owego roztworu wodnego etanolu i odsysa. Przesącz i popłuczyny stęży się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 55 ml i dodaje do 55 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu, a następnie dodaje się 20%-owego kwasu solnego w celu uzyskania wartości pH=6,5. Mieszaninę ogrzewa się w ciągu ½ godziny w temperaturze 45—50°C, chłodzi do temperatury pokojowej i utrzymuje w tej temperaturze w ciągu 1 godziny. Odsącza się powstałe kryształy, przemywa je 50 ml 40%-owego roztworu wodnego acetonu i 100 ml acetonu, a następnie suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność procesu w przeliczeniu na nystatynę zawartą w suchej grzybni wynosi 82%, a produkt zawiera 4720 jednostek nystatyny na 1 mg.

Przykład IV. Do 4320 ml metanolu dodaje się 40 ml trójetiloaminy i dodając 40%-owy roztwór wodny kwasu siarkowego doprowadza pH mieszaniny do wartości 6,0. Do tak przygotowanej mieszaniny dodaje się następnie 800 g grzybni, otrzymanej w sposób opisany w przykładzie I i zawierającej nystatynę w ilości 130000 jednostek na 1 g. Mieszaninę miesza się silnie w ciągu ½ godziny i odsącza, przemywa osad 400 ml 90%-owego roztworu wodnego metanolu i odsysa. Przesącz i popłuczyny stęży się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 220 ml i dodaje do 220 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu, ogrzanego uprzednio do temperatury 45—50°C. Do mieszaniny dodaje się następnie taką samą objętość 50%-owego roztworu wodnego acetonu

i 440 ml 80%-owego roztworu acetonu, po czym dodaje się 20%-owego kwasu solnego aż do uzyskania wartości pH=6,5. Mieszaninę utrzymuje się w temperaturze 45—50°C w ciągu 1 godziny przy powolnym mieszaniu i następnie chłodzi do temperatury pokojowej i w tej temperaturze miesza łagodnie w ciągu nocy. Odsącza się otrzymane kryształy, przemywa je 100 ml 40%-owego roztworu wodnego acetonu i 200 ml acetonu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność procesu w przeliczeniu na nystatynę zawartą w suchej grzybni wynosi 92%, a produkt zawiera 4560 jednostek nystatyny na 1 mg.

Przykład V. Do 540 ml metanolu dodaje się 40 ml 40%-owego roztworu metyloaminy i przez dodawanie 40%-owego roztworu wodnego kwasu siarkowego doprowadza pH mieszaniny do wartości 6,0. Następnie do mieszaniny dodaje się 200 g grzybni otrzymanej w sposób opisany w przykładzie I i zawierającej 151000 jednostek nystatyny na 1 g. Miesza się energicznie w ciągu ½ godziny i odsącza, przemywając osad 200 ml 90%-owego roztworu wodnego metanolu, po czym odsącza się do sucha. Przesącza i popłuczyny stęża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 65 ml i dodaje do 65 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu, ogrzanego uprzednio do temperatury 45—50°C. Do mieszaniny dodaje się następnie taką samą objętość 50%-owego roztworu wodnego acetonu, 130 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu, po czym przez dodawanie metyloaminy doprowadza się pH mieszaniny do wartości 6,5. Mieszaninę ogrzewa się w ciągu 1 godziny w temperaturze 45—50°C przy łagodnym mieszaniu po czym miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu nocy. Powstałe kryształy odsącza się, przemywa 50 ml 50%-owego roztworu wodnego acetonu i 100 ml acetonu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność procesu w przeliczeniu na nystatynę zawartą w suchej grzybni wynosi 92%, a produkt zawiera 4960 jednostek nystatyny na 1 mg.

Przykład VI. 200 g grzybni, otrzymanej w sposób opisany w przykładzie I i zawierającej 126200 jednostek nystatyny na 1 g dodaje się do roztworu siarczanu dwuetyloaminy, otrzymanego przez dodanie 25 ml dwuetyloaminy do 1080 ml metanolu i doprowadzenie pH mieszaniny do wartości 6,0 za pomocą 40%-owego roztworu wodnego kwasu siarkowego. Mieszaninę miesza się intensywnie w ciągu ½ godziny, odsącza, przemywa osad 200 ml 90%-owego roztworu wodnego metanolu i odsącza. Przesącza i popłuczyny stęża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 55 ml i dodaje do 55 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu, ogrzanego uprzednio do temperatury 45-50°C. Do mieszaniny dodaje się następnie taką samą objętość 50%-owego roztworu wodnego acetonu i 110 ml 80%-owego roztworu acetonu,

po czym za pomocą dwuetyloaminy doprowadza się pH mieszaniny do wartości 6,5. Mieszaninę ogrzewa się w ciągu 1 godziny w temperaturze 45—50°C łagodnie mieszając, po czym chłodzi się do temperatury pokojowej i w tej temperaturze miesza łagodnie w ciągu nocy. Odsącza się powstałe kryształy, przemywa je 50 ml wodnego roztworu acetonu, a następnie 100 ml acetonu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność procesu w przeliczeniu na nystatynę zawartą w suchej grzybni wynosi 89%, zaś produkt zawiera 4200 jednostek nystatyny na 1 mg.

Przykład VII. 100 ml trójetanolaminy dodaje się do 2700 ml metanolu i do roztworu wlewa następnie 40%-owy roztwór wodny kwasu siarkowego aż do uzyskania pH=6,0. Do otrzymanej mieszaniny dodaje się 1 kg grzybni, przygotowanej w sposób opisany w przykładzie I i zawierającej 130 000 jednostek nystatyny w 1 g. Miesza się intensywnie w ciągu ½ godziny, odsącza, przemywa osad 500 ml 85%-owego roztworu wodnego metanolu i odsącza. Przesącza i popłuczyny stęża się pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 325 ml i dodaje do 325 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu, ogrzanego uprzednio do temperatury 45-50°C. Do mieszaniny dodaje się taką samą objętość 50%-owego roztworu wodnego acetonu i 650 ml 80%-owego roztworu wodnego acetonu. Przez dodatek 20%-owego roztworu wodnego kwasu solnego nastawia się wartość pH mieszaniny na 6,5 i ogrzewa mieszaninę w temperaturze 45-50°C, łagodnie mieszając w ciągu 1 godziny. Następnie chłodzi się mieszaninę do temperatury pokojowej i w tej temperaturze miesza łagodnie w ciągu nocy. Odsącza się powstałe kryształy, przemywa je 250 ml 50%-owego roztworu wodnego acetonu i 500 ml acetonu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność procesu w przeliczeniu na nystatynę zawartą w suchej grzybni wynosi 100%, a produkt zawiera 4750 jednostek nystatyny na 1 mg.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób ekstrahowania nystatyny z grzybni wyodrębnionej z brzeczki fermentacyjnej zawierającej ten antybiotyk, za pomocą rozpuszczalników organicznych, **znamienny tym**, że oddzieloną od brzeczki wilgotną grzybnię ekstrahuje się niższym alkanolem, kwasem i aminą, dobierając taki stosunek kwasu do aminy, ażeby środowisko było w przybliżeniu obojętne, po czym z przesączonego roztworu wyosabia się nystatynę, korzystnie przez krystalizację.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminę stosuje się trójetanolaminę.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminę stosuje się trójetanolaminę.