ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

259364
(11) (B1)

(51) Int. Cl.[4]
C 12 P 37/09

(22) Prihlásené 16 11 85
(21) (PV 8285-85)

(40) Zverejnené 15 03 88

(45) Vydané 15 03 89

(75)
Autor vynálezu MAZÁŇ ŠTEFAN RNDr., JAKUBČOVÁ MÁRIA ing., DAUČÍK ADAM, GRELNETOVÁ JÚLIA, BUČKO MICHAL ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Spôsob izolácie čistého fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu

1

Riešenie sa týka spôsobu izolácie čistého fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu z fermentačnej pôdy, za účelom účinného odstraňovania bielkovinových a farebných látok z filtrátu fermentačnej pôdy. Uvedeného účelu sa dosiahne tým, že sa pH fermentačnej pôdy upraví roztokom koagulantu síranu hlinitého na hodnotu pH 5,2 až 5,5 a po úprave sa pomaly pridá 0,05 až 0,3 perc. zásobný roztok katiónaktívneho flokulantu polyamínokarboxyesterom alebo kopolyméru polyakrylamidu s polyamínokarboxyesterom v množstve 3 až 20% obj. na fermentačnú pôdu.

2

Vynález sa týka spôsobu izolácie čistého fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu odstraňovaním bielkovinových a farebných látok z fermentačnej pôdy.

V súčasnej dobe sa izolácia fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu prevádza filtráciou fermentačnej pôdy za účelom odstránenia pevných častíc, filtrát sa spracuje extrakciou v kyslej oblasti pH s organickým rozpúšťadlom, ktoré nie je miešateľné s vodou, s výhodou s butylacetátom, extrakt penicilínu sa odfarbí absorpčným činidlom, najmä aktívnym uhlím a fenoxymetylpenicilín alebo benzylpenicilín sa vyzráža vo forme solí alkalických kovov, ktoré sú málo rozpustné v organickom rozpúšťadle. Vyzrážané soli sa ďalej spracujú rôznymi čistiacimi operáciami za účelom výroby výsledných produktov, ktoré musia vyhovovať rôznym kvalitatívnym požiadavkám.

Vyfermentovaná pôda fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu obsahuje množstvo balastných látok (bielkoviny, zvyškové prekurzory, fenoxyoctovú alebo fenyloctovú kyselinu, vedľajšie penicilíny, farebné polymérne látky), ktoré sťažujú proces izolácie čistého produktu. Mnohé patentové spisy sa zaoberajú odstraňovaním sprievodných balastných látok v rôznych stupňoch izolácie. Ťažkosti pri extrakcii spôsobujú bielkovinové látky, farebnosť extraktu, farebné polymérne látky. Patentové spisy riešia tento problém použitím vhodných extraktorov (amer. pat. spis č. 2 509 010), voľbou vhodných organických rozpúšťadiel (francúzsky pat. spis čís. 1 038 127, angl. pat. spis čís. 760 351, amer. pat. spis č. 2 488 878), vhodným pH extrakcie (amer. patent. spis číslo 2 482 938). Odstraňovaním bielkovín z natívneho roztoku penicilínu prídavkom organických polyelektrolytov, ako sú deriváty polystyrénu, polyakrylovej kyseliny a polyvinylalkoholu (sov. pat. spis č. 187 241), prídavkom vodorozpustných solí napr. $CaCl_2$ (angl. pat. spis č. 760 351), použitím hydroxidu hlinitého, hydroxidu horečnatého, uhličitanu bárnatého k absorplii nečistôt (angl. pat. spis č. 1 015 111), extrakcia s prídavkom hydroxidu vápenatého (amer. pat. spis čís. 2 481 092), aplikáciou enzýmov (amer. pat. spis č. 2 471 597).

Ďalšie patentové spisy sa zaoberajú čistením fermentačných kvapalín antibiotík pomocou komplexov (sov. pat. spis č. 166 461), termokoaguláciou na 70 °C po dobu 1 až 1,5 min. a ochladenie na 20 °C (sov. pat. spis č. 122 582). Prídavkom demulgátorov pri extrakcii sa rieši priebeh extrakcie (angl. pat. spis č. 610 649, 606 940), okyslením $NaHSO_4$ (angl. pat. spis č. 684 460), okyslením sodným alebo vápenatým bisulfitom a následná extrakcia s amylacetátom (angl. pat. spis č. 574 872). Použitím bentonitov domáceho pôvodu a nepatrným prídavkom katexolu pri úprave penicilínových fermentačných pôd navrhoval I. Vaňo 1959, Chemické zvesti 13, 471—478).

Prímesné látky, ktoré v priebehu spracovania penicilínovej pôdy rušia dobrý priebeh operácií, hlavne extrakcie, môžu byť dvojakého pôvodu. Jednak látky pochádzajúce zo surovín a jednak priame produkty metabolizmu vznikajúce počas kultivácie. Tieto látky majú sklon k tvorbe emulzií pri extrakcii penicilínu do organického rozpúšťadla, čo má za následok kalenie organického extraktu, vysoký obsah penicilínu v odpadnej pôde. V prípade väčšieho množstva vo filtráte sa usadzujú v extrakčnom aparáte, čím extrakcia prebieha pri nižších prietokoch organického rozpúšťadla a filtrátu, čo má za následok zníženie účinnosti extrakcie. Aby nedochádzalo k týmto negatívnym javom, je potrebné odstrániť tieto látky z fermentačnej pôdy.

Uvedené nevýhody odstraňuje spôsobo izolácie čistého fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu z upraveného filtrátu fermentačnej pôdy podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa hodnota pH fermentačnej pôdy upraví prídavkom koagulantu síranu hlinitého na 5,2 až 5,0, potom sa pomaly pridá 0,05 až 0,3 % hmot. zásobného roztoku katiónaktívneho flokulantu typu polyméru polyamínokarboxyesteru alebo kopolyméru polyakrylamidu s polyamínokarboxyesterom.

Spôsob podľa vynálezu sa ďalej prevádza tak, že sa do fermentačnej pôdy pridá 30 % hmot. roztoku síranu hlinitého do hodnoty pH 5,5 a potom sa pridá 0,2 % obj. zásobného roztoku katiónaktívneho flokulantu typu polyméru polyamínokarboxyesteru v množstve 7,5 % obj. na objem fermentačnej pôdy, alebo sa pomaly pridá 0,1 % obj. zásobný roztok kopolyméru polyakrylamidu s polyamínokarboxyesterom v množstve 15 % obj. na objem fermentačnej pôdy.

Spôsob podľa vynálezu vychádza z poznatku, že fermentačná pôda oboch penicilínov obsahuje 2,2 až 3,0 mg/ml látok bielkovinovej povahy a filtrát má nízku priepustnosť. Tieto faktory výrazne ovplyvňujú izoláciu čistého penicilínu.

Bolo zistené, že aplikáciou koagulantu, s výhodou síranu hlinitého a katiónaktívneho flokulantu derivátu, alebo kopolyméru polyakrylamidu do fermentačnej pôdy, dochádza k účinnému vyvločkovaniu bielkovín a k absorpcii farebných látok na povrch vločiek. Filtrát získaný týmto spôsobom je lepšej kvality pre ďalšie spracovanie, čo priaznivo ovplyvňuje následné izolačné stupne oboch penicilínov. Priamo z filtrátu je možné vyzrážať voľnú kyselinu fenoxymetylpenicilínu. Pri spracovaní filtrátu do draselnej soli fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu na extrakciu do organického rozpúšťadla, nie je potrebná ďalšia povrchovoaktívna látka. Časť polymérnych látok je naabsorbovaných na povrchu vločiek bielkovín, ktoré ostávajú v mycéliu a ďalšia časť odchádza v odpadnej pôde z extrakcie. Zís-

kaný extrakt penicilínu v organickom rozpúšťadle nie je potrebné odfarbovať aktívnym uhlím a draselnú soľ je možné priamo vyzrážať nasýteným vodným roztokom octanu draselného.

Draselná soľ fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu sa môže pripraviť podľa vynálezu napr. tak, že číry filtrát získaný aplikáciou koagulantu síranu hlinitého a katiónaktívneho flokulantu, derivátu alebo kopolyméru polyakrylamidu do fermentačnej pôdy, sa extrahuje do butylacetátu bez použitia ďalšej povrchovoaktívnej látky, draselná soľ sa vyzráža nasýteným vodným roztokom octanu draselného v prítomnosti vody a acetónu, premyje sa organickým rozpúšťadlom a vysuší sa.

Draselná soľ fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu pripravená týmto spôsobom vyhovuje všetkým predpísaným liekopisným kritériám. Postupom podľa vynálezu možno vyrobiť čistú draselnú soľ fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu vo zvýšenom výťažku a úspeore surovinových nákladov.

Nasledujúce príklady spôsob podľa vynálezu dopĺňajú, ale neobmedzujú.

Príklad 1

K 5 000 ml fermentačnej pôdy fenoxymetylpenicilínu o účinnosti 25 300 mj/ml sa po kvapkách pridáva 20 %-ný roztok síranu hlinitého na hodnotu pH 5,2—5,5. Za intenzívneho miešania sa pridá 7,5 obj. % zásobného 0,2 %-ného roztoku katiónaktívneho flokulantu polyméru polyamínokarboxyesteru. Po 45 min. miešania sa fermentačná pôda odsaje a filtračný koláč sa premyje 1 680 ml destilovanej vody. Spojený filtrát obsahuje 19 030 mj/ml fenoxymetylpenicilínu. Ku získanému filtrátu o objeme 5 320 ml sa pridá 1 060 ml butylacetátu a 10 %-nou kyselinou sírovou sa upraví na hodnotu pH 2,5 až 2,9. Po 15 min. miešania sa oddelí vodná fáza od butylacetátovej. Vodná fáza obsahuje 1 220 mj/ml fenoxymetylpenicilínu a butylacetátová vrstva 86 400 mj/ml fenoxymetylpenicilínu. Draselná soľ priamo vyzráža z takto pripraveného butylacetátu zo 4,5 obj. % nasýteného vodného roztoku octanu draselného v prítomnosti 2 obj. % acetónu a 2 obj. % vody. Po odsatí sa draselná soľ premyje etanolom a acetónom a vysuší sa. Získa sa 55,0 g bielej kryštalickej soli o účinnosti 1 500 mj/mg t. j. 81,5 % počítané na fermentačnú pôdu. Pomer absorbancií A_{268}/A_{274} je 1,22.

Príklad 2

5 000 ml fermentačnej pôdy fenoxymetylpenicilínu o účinnosti 20 800 mj/ml sa upraví 20 %-ným roztokom síranu hlinitého na hodnotu pH 5,2 až 5,5. Za stáleho miešania sa pomaly pridá 6 obj. % 0,2 %-ného zásobného roztoku katiónaktívneho flokulantu polyméru polyamínokarboxyesteru. Po 45 min. miešania sa fermentačná pôda odsaje a mycel premyje 500 ml destilovanej vody. Získa sa 4 560 ml filtrátu o účinnosti 19 700 mj/ml. Priamo z filtrátu sa vyzráža voľná kyselina fenoxymetylpenicilínu úpravou filtrátu kyselinou octovou na pH 4,5 a zriedenou kyselinou chlorovodíkovou na pH 1,9. Po 20 min. miešania sa voľná kyselina odsaje, premyje sa 3 krát vodou a vysuší sa. Získa sa 47,3 g kryštalickej voľnej kyseliny fenoxymetylpenicilínu o účinnosti 1 580 mj/mg.

Príklad 3

5 000 ml fermentačnej pôdy benzylpenicilínu o účinnosti 22 867 mj/ml sa upraví 30 %-ným roztokom síranu hlinitého na hodnotu pH 5,2—5,5 a za stáleho miešania sa pridá 5 obj. % 0,05 %-ného zásobného roztoku katiónaktívneho flokulantu kopolyméru polyakrylamidu s polytrimetylamínoetylakrylmetasulfátu. Po 45 min. miešania sa fermentačná pôda prefiltruje a premyje vodou. Zo získaného filtrátu o účinnosti 18 200 mj/ml sa extrahuje penicilín do butylacetátu pri pH 2,5—2,9. Draselná soľ benzylpenicilínu sa vyzráža 4,5 obj. % nasýteným vodným roztokom octanu draselného v prítomnosti 2 obj. perc. a 1 obj. % acetónu. Po 30 min. miešania sa draselná soľ prekryje acetónom a premyje butanolom. Po vysušení sa získa 49,6 g draselnej soli benzylpenicilínu o účinnosti 1 580 mj/mg.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob izolácie čistého fenoxymetylpenicilínu alebo benzylpenicilínu z upraveného filtrátu fermentačnej pôdy vyznačujúci sa tým, že sa hodnota pH fermentačnej pôdy upraví prídavkom koagulantu síranu hlinitého na hodnotu pH 5,2 až 5,5, potom sa pomaly pridá 0,05 až 0,3 %-ný hmot. zásobný roztok katiónaktívneho flokulantu typu polyméru polyamínokarboxyesteru alebo kopolyméru polyakrylamidu s polyamínokarboxyesterom v množstve 3 až 20 % objemových na objem fermentačnej pôdy.

2. Spôsob podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že sa do fermentačnej pôdy pridá 30 %-ný roztok síranu hlinitého do pH 5,5, potom sa pomaly pridá 0,2 %-ný zásobný roztok katiónaktívneho flokulantu polyamínokarboxyesteru v množstve 7,5 obj. % na objem fermentačnej pôdy.

3. Spôsob podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že sa do fermentačnej pôdy pridá roztok síranu hlinitého do pH 5,5, potom sa pomaly pridá 0,1 %-ný zásobný roztok katiónaktívneho flokulantu kopolyméru polyakrylamidu s polyamínokarboxyesterom v množstve 15 obj. % na objem fermentačnej pôdy.

Severografia, n. p. závod 7, Most

Cena 2,40 Kčs