



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224 726

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 07 04 82
(21) P_v 2485-82

(51) Int. Cl. C 07 J 9/00
C 07 C 172/00

(40) Zveřejněno 25 03 83
(45) Vydáno 01 08 85

(75)
Autor vynálezu TOMAN JAROMÍR ing., PARDUBICE
PSCHIEDT JIŘÍ ing., BOHDANEČ

(54) Způsob izolace ergosterolu

1

Vynález se týká způsobu izolace ergosterolu ze směsi sterolů získaných po odstranění nukleových kyselin a alkalické hydrolýze pomocí extrakce nepolárním rozpouštědlem.

Izolace ergosterolu ze směsi sterolů a vedlejších látek, produkovaných kvasinkami, se dosud obvykle provádí extrakcí benzenem, hexanem nebo jiným organickým rozpouštědlem a vykrystalováním produktu buď přímo, nebo po přidavku nižších alkoholů (methanol, ethanol). Nevýhodou těchto postupů je získání buď poměrně málo čistého produktu, vyžadujícího rekrytalizaci, nebo nízký výtěžek ergosterálu. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je benzen, který sice poskytuje produkt ještě vyhovující kvality bez rekrytalizace, dává však nízký výtěžek krystalizace asi 75 %. Další nevýhodou je dlouhá doba krystalizace, v matečných loužích zbývá značné množství ergosterolu, které společně s rozpouštědlem odchází do odpadních vod.

Nová japonská metoda využívá k extrakci n-butanolu, izolaci autoři provádějí vlitím zahuštěného extraktu do vody (Japan Kokai č. 75 142 787). Tato metoda však vyžaduje jednak rekrytalizaci produktu, jednak často působí značné potíže rozvrtvení doufázového systému v důsledku negativního působení solí vyšších mastných kyselin vzniklých alkalickou hydrolýzou.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob izolace ergosterolu ze směsi sterolů získané z hydrolyzovaného droždí extrakcí organickým rozpouštědlem a buď přímým oddestilováním tohoto

rozpouštědla, nebo krystalizací po částečném zahuštění extraktu, nebo oddestilováním rozpouštědla z matečných louhů po této krystalizaci, podle tohoto vynálezu. Podstata vynálezu spočívá v tom, že se ke směsi sterolů přidá 2 až 20násobné množství alkoholu C_4 až C_5 , s výhodou C_4 , nebo acetonu a voda, jejíž množství se pohybuje od 1 do 20 % hmotnostních, načež se směs zahřeje na 50 až 90 °C a ze vzniklého roztoku se ergosterol izoluje po ochlazení na +5 až -5 °C. Hodnota pH roztoku se může v kterékoliv fázi izolace upravit na 5 až 9. K případné úpravě pH roztoku ergosterolu je možno použít slabých kyselin, např. octové nebo kyselých solí, např. chloridu amonného, hydrogen a dihydrogenfosforečnanu sodného, hydrogensíranu sodného.

V případě zpracování extraktu způsobem dle vynálezu, tj. po oddestilování rozpouštědla použitého k extrakci kvasnic se získá ergosterol o čistoře kolem 90 % a obsahem krystalové vody 5 až 6 %, který je vhodný pro další zpracování ozařováním na vitamín D_2 . Jestliže po necháme nejprve část produktu vykrytalovat a zpracováváme jen matečné louhy, získáme produkt čistoty kolem 75 %, který rekrytalizací dá čistou látku. Matečné louhy po izolaci ergosterolu ze směsi alkohol - voda obsahující ještě další množství ergosterolu, který může být získán po částečném zahuštění a doplnění vody ve formě méně čistých podílů, které lze však dočistit.

K rekrytalizaci lze užít buď opakování postupu krystalizace z vodného alkoholu dle způsobu podle vynálezu nebo samotnou krystalizaci z běžně užívaných rozpouštědel, jako je benzen, směs benzen-etanol, etanol, izopropylalkohol aj. Lze též využít krystalizace surového produktu přidáním k původnímu extraktu obsahujícímu směs sterolů v org.rozpouštědle a vykrytalováním, případně krystalizací ze matečných louhů po izolaci prvních podílů produktu v případě používání dvoustupňové krystalizace. Matečné louhy po rekrytalizaci ergosterolu je možno zpracovat společně s matečnými louhy po vykrytalování prvních podílů ergosterolu. Pro extrakci směsi sterolů z droždí po hydrolýze jsou nejvýhodnější aromáty, jako benzen, toluen případně nasycené uhlovodíky, jako hexan a cyklohexan. Ke snížení oxidace produktu v alkalickém roztoku je možno přidat malé množství antioxiđantu, např. butylhydroxytoluenu.

Výhoda postupu dle vynálezu spočívá ve zvýšení výtěžku ergosterolu o 5 až 15 % při zachování kvality, minimálních vlastních nákladech, ve snížení doby krystalizace a snížení množství odpadních látek.

Pro bližší objasnění podstaty vynálezu jsou dále uvedeny příklady provedení.

Příklad 1

Z matečných louhů (benzenových) po izolaci ergosterolu byl oddestilován benzen až do teploty v baňce 130 °C a zbytky benzenu byly oddestilovány ze sníženého tlaku, aby destilační zbytek obsahoval méně než 2 % hmot. benzenu.

10,0 destilačního zbytku obsahujícího 23,1 % hmot. sterolu bylo rozpouštěno ve 100 ml izoamylalkoholu zahřátím na 80 až 90 °C, načež bylo přidáno 10 ml vody. Emulze byla míchána a chlazena na +5 °C, vypadlé krystaly byly odsáty a promyty 3x 10 ml etanolu. Po vysušení při 50 °C bylo získáno 3,1 g produktu s obsahem 37,3 % ergosterolu, tj. 50,2 % teorie.

Příklad 2

100,0 g destilačního zbytku, obsahujícího 22,3 % ergosterolu získaného podle příkladu 1, bylo rozpuštěno v 1 000 ml izobutylalkoholu a 200 ml vody zahřátím na 70 až 80 °C, přidány 2,0 g aktivního uhlí, za horka zfiltrováno a filtrát postupně ochlazen za míchání na 0 °C. Krystalický podíl byl ostře odsát a promyt 3x 100 ml etanolu ochlazeného na 0 °C. Po vysušení při 50 °C bylo získáno 20,5 g produktu s obsahem 69,4 % hmotnostních ergosterolu, tj. 63,8 % výtěžku.

Příklad 3

300,0 g destilačního zbytku, obsahujícího 30,3 % ergosterolu získaného podle postupu 1, bylo rozpuštěno v 2 700 ml n-butanolu a 450 ml vody zahřátím na 80 až 90 °C. Vzniklý roztok po přidání 2 g křemeliny byl za horka zfiltrován, pH roztoku upraveno přidavkem chloridu amonného na hodnotu 5 až 8 a filtrát postupně ochlazen za míchání na 0 °C. Krystalický podíl byl ostře odsát a promyt 3x 150 ml methanolu ochlazeného na 0 °C. Po vysušení koláče bylo získáno 87,2 g produktu obsahujícího 70,0 % hmot. ergosterolu, tj. s výtěžkem 67,1 % teorie.

Příklad 4

Z benzenového extraktu sterolů po hydrolýze droždí, tj. bez částečné izolace ergosterolu, byl oddestilován benzen až do teploty v baňce 130 °C a zbytky benzenu byly oddestilovány za sníženého tlaku, aby destilační zbytek obsahoval méně než 2 % hmot. benzenu.

218,0 g destilačního zbytku obsahujícího 50,8 % hmot. ergosterolu bylo rozpuštěno v 1 000 ml n-butanolu a 163 ml vody zahřátím na 80 až 85 °C, načež byl roztok postupně ochlazen na - 2 °C. Vypadlý produkt byl ostře odsát a promyt 3x 200 ml methanolu. Po vysušení bylo získáno 110,8 g produktu s obsahem 90,9 % hmot. ergosterolu, tj. s výtěžkem 90,9 % teorie.

Příklad 5

100 g surového ergosterolu s obsahem 78,3 % hmot. bylo rozpuštěno ve 2 000 ml butanolu zahřátím na 80 °C, přidány 2 g karborafinu a za horka zfiltrováno. K filtrátu přidáno 400 ml horké vody a za míchání ochlazen na 0 °C. Vyloučený krystal byl ostře odsát a po vysušení bylo získáno 55 g ergosterolu s obsahem 90,2 % účinné látky, což odpovídá výtěžku 63,4 % teorie.

Příklad 6

218 g destilačního zbytku, obsahujícího 50,8 % hmot. ergosterolu bylo rozpuštěno v 2 000 ml acetonu, přidáno 100 ml vody, směs zahřáta na 50 °C a roztok postupně chlazen za míchání na 0 °C. Produkt byl ostře odsát, promyt 3x 200 ml ethanolu. Bylo získáno 115,1 g produktu s obsahem 91,2 % hmot. ergosterolu, tj. s výtěžkem 94,2 % teorie.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolace ergosterolu ze směsi sterolů získané získané z hydrolyzovaného droždí extrakcí organickým rozpouštědlem a buď přímým oddestilováním tohoto rozpouštědla, nebo krystalizací po částečném zahuštění z extraktu, nebo oddestilováním rozpouštědla z matečných louhů po této krystalizaci, vyznačující se tím, že se ke směsi sterolů přidá 2 až 20 násobné množství alkoholu C_4 až C_5 , s výhodou C_4 , nebo acetonu a voda, jejíž množství se pohybuje od 1 do 20 % hmotnostních, směs zahřeje na 50 až 90 °C a ze vzniklého roztoku se ergosterol izoluje po ochlazení na +5 až -5 °C.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že pH roztoku se v kterékoliv fázi izolace upraví na hodnotu 5 až 9.