



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260704
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 19/62

(22) Přihlášeno 27 04 67
(21) (PV 3092-67)

(40) Zveřejněno

(45) Vydáno 15 05 89

(75)

Autor vynálezu

PELZBAUER JIŘÍ, BENDA ANTONÍN ing., ROZTOKY u Prahy,
ČULÍK KAREL dr., KALINA VLADIMÍR ing., PRAHA

(54) Způsob přípravy krystalického fungicidinu

1

2

Řešení se týká výroby krystalického fungicidinu z fermentovaných půd nebo amorfních preparátů. K methanolickému koncentrátu antibiotika se přidá alkanol s nejméně třemi atomy uhlíku a naředí voda tak, aby vznikla jednofázová kapalina, ze které rychle vykristaluje účinná látka bez amorfni příměsí, což prodlužuje skladovatelnost antibiotika.

Fungicidin, jedno z prvních protiplísňových antibiotik, je pro léčebné účely běžně dodáváno ve formě amorfního preparátu s omezenou stabilitou. Naproti tomu krystalický preparát fungicidinu vyniká především lepší stabilitou, což přináší při skladování i aplikaci tohoto antibiotika četné výhody.

Náš vynález se týká přípravy krystalického fungicidinu z fermentovaných půd, nebo z amorfního preparátu.

Je publikováno několik postupů přípravy krystalického fungicidinu, které však vyžadují složité čištění účinné látky, případně používají velkých množství poměrně drahých rozpouštědel a dosahují mnohdy nízké výtěžnosti.

Například dle *Antibiotics annual 1953-4*, 191 (Dutcher), je možno připravit extrakcí mycelií alkoholický extrakt, který se zpracuje na surový preparát a ten je dále čištěn horkým ethylacetátem, nerozpuštěný podíl se za tepla rozpouští ve vodném acetonu, po filtraci se chlazením vylučuje 1. amorfni frakce a dále 2. krystalická frakce. Anebo je možno meziprodukt krystalovat odpařením dvoufázového roztoku (butanol, methanol, voda, hexan, nebo butanol s nasyceným roztokem NaCl). Oba postupy jsou navrhovány pro laboratorní přípravu, protože jsou značně nákladné.

Podle publikace J. Tréfouela a sp. (Ca 54, 12381 — g — 1960), je možno amorfni preparát rozpouštět za tepla ve vodném methanolu nebo acetonu a odpařením filtrátu krystalovat fungicidin. Spotřeba rozpouštědel je zde vzhledem k omezené rozpustnosti fungicidinu vysoká, nehledě k tomu, že velká část účinné látky odpadá v matečných loužích.

V US patentu 2 382 719 (58) je obdobný způsob krystalizace z vodného acetonu. Podle francouzského patentu 1 166 230 (J. Vandepuette), se ze surového produktu připravuje 1. preparát, který krystaluje za tepla z vodně methanolického prostředí, za pečlivé úpravy pH, přičemž se ještě produkt frakcionuje na část amorfni a krystalickou.

S podobným postupem a velmi složitou frakcionací na amorfni a krystalickou část se setkáváme v US patentu 2 865 807 (Dutcher), který používá vodně isopropanolického roztoku fungicidinu.

Podle čl. patentu 119 507 (E. Nevole), se ke krystalizaci používá dvoufázového roztoku (methanol, voda, chloroform) ve velkých množstvích, takže postup je opět neekonomický. Navíc, jak ukázaly poslední práce autora, není tento postup dobře reprodukovatelný.

Všechny jmenované práce mají dále společný nedostatek. Použije-li se za účelem snížení spotřeby rozpouštědel některé modifikace vedoucí k získání koncentrovanějšího roztoku ke krystalizaci, selhávají postupy buď zcela, nebo se vyloučí převážně amorfni produkt vedle menšího množství krystalického.

Vypracovali jsme nyní nový postup přípravy krystalického fungicidinu z methanolického koncentrátu, který vyniká proti předcházejícím jednoduchostí, malou spotřebou rozpouštědel, vysokou výtěžností při vynikající kvalitě a navíc je univerzální, neboť nezáleží na postupu, jakým byl připraven koncentrát. K přípravě methanolického koncentrátu je možno použít libovolného způsobu extrakce, vedoucího ke zvýšení rozpustnosti, např. přes vápenatý nebo hořečnatý komplex, pomocí aminových solí nebo jiných solí okyselením methanolu slabou kyselinou nebo s přídavkem slabé zásady. Ke koncentrátu se přidá 3 — 20 % obj. selektivního rozpouštědla, kterým je podle našeho vynálezu obecně alkohol o vyšším počtu uhlíku než 3 a přídavkem teplé vody se upraví podmínky ke krystalizaci.

Vynález spočívá na objevu existence vhodného vícesložkového rozpouštědla, v němž je amorfni fungicidin několikanásobně rozpustnější než krystalický preparát. Tuto vlastnost mají směsi vyšších alkoholů s methanolem a vodou, které tvoří jen jednu kapalnou fázi. Například pro směs 60 % methanolu + 25 % vody + 15 % butanolu (obj.) při normální teplotě je rozpustnost amorfniho fungicidinu 3,5krát vyšší, než krystalického. Za jiných podmínek bývá rozdíl rozpustnosti mezi amorfni a krystalickým preparátem v podobných směsích podstatně větší. (Stanovení rozpustnosti amorfniho preparátu je zde však nepříznivě ovlivňováno rychlým vypařováním krystalů.) Využití této skutečnosti vede ke spolehlivému krystalování fungicidinu i ze značně koncentrovaných roztoků (10 až 15 %, protože ze jmenované směsi rozpouštědel kvantitativně překrystalizuje i ta část produktu, která se vyloučila vlivem vysoké koncentrace, po přidavku vody, nejprve v amorfni formě).

Vyzkoušeli jsme se zdarem několik alkoholů (např. butanol, amylalkohol, isoamylalkohol, cyklohexanol a jiné), přičemž z hlediska dostupnosti, ceny i účinku se jevil nejlepším butanol. Množství vyššího alkoholu vzhledem k jeho účinku je limitováno pouze dolejší hranicí. Tato s koncentrací účinné látky stoupá, u nižších koncentrací postačují asi 3 % obj. Při nedostatečném množství vyššího alkoholu se získá preparát s amorfni příměsí, případně zcela amorfni.

Krystalizace fungicidinu může probíhat jenom v případě, že v roztoku je též dostatečné množství vody. U methanolických koncentrátů musí být větší než cca 20 % obj. Přídavek 20 % vody ke koncentrátu vede zpravidla k částečnému vysrážení amorfniho produktu, což není na závadu, neboť přítomnost vyššího alkoholu umožňuje samovolné překrystalování amorfni části. Rychlost dávkování vody nemá vliv na velikost krystalů. Lze doporučit rychlé dávkování vody v množství rovnajícímu se objemu koncentrátu.

Prokázali jsme přímou závislost velikosti

krystalků na teplotě v rozmezí 25 až 75 °C. Je proto možno s výhodou dávkovat do koncentráту teplou vodu (60 až 80 °C). Teplota koncentráту po smíchání vystoupí na 50 až 60 °C. Chlazení směsi na normální teplotu je správné provést rychle, protože průběh krystalizace není odvislý od rychlosti chlazení.

Příklady:

Příklad 1

20 g vlhkého fungicidinu (běžný amorf-ní produkt po promytí acetonem, 40 % sušiny) + 40 ml methanolu + 8 ml isoamylal-koholu + 2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 70 ml vody 75 stupňů Celsia přidáno najednou za míchání, teplota po smíchání 55 °C, očkováno, zchla-zeno během 20 min. na 15 °C. Filtrace, pro-mytí a sušení. Získáno 7,4 g krystalického produktu (5 100 j/mg), výtěžek 92 % na ne-sušený amorf-ní preparát.

Příklad 2

3,0 kg vlhkého produktu po acetonu (1,1 kg sušiny + 6 l methanolu + 0,3 kg CaCl_2 + + 1,5 l butanolu, rozpuštěno, filtrace, objem filtrátu 9,5 l + 9,5 l vody 78 °C, očkováno. Chlazení během 30 minut na 25 °C, dále při

5 °C 14 hodin. Filtrace, promytí. Produkt 1,0 kilogramu, krystalický, 91,0 % výt. Kvalita: pH — 7,45, vlhkost — 4,5 %.

EI^1 — 0,648; 0,90 biologická účinnost — 4 950 j/mg.

Příklad 3

5 g suchý amorf-ní preparát + 180 ml me-thanolu + 20 ml butanolu + 2 % kyseliny citrónové, filtrace, + 80 ml vody + NH_4OH (pH — 7,0), zahuštěno na 90 ml při 25 až 30 °C. Produkt po zfiltrování, promytí a usušení 4,1 g, účinnost 5 150 j/mg.

Příklad 4

2 l fermentované půdy o účinnosti 31 000 j/ml naředěno vodou na 3 l, biomasa odse-parována, získáno 260 g pasty. + 650 ml me-thanolu intenzívně mícháno při 5 °C, filtrace. Odvodněná biomasa extrahována methano-lem, okyseleným kyselinou citrónovou, zís-káno 700 ml kyselého extraktu o účinnosti 81 000 j/ml + H_2O + NH_4OH (pH = 7,0), částečně zahuštěno na obsah vody = 26 % obj. a 100 000 j/ml. + 8 % obj. butanolu, za-huštěno na 45 % vody. Filtrace produktu, promytí, sušení. Výtěžek krystalického pre-parátu 8,2 g o účinnosti 5 000 j/mg, tj. 66,2 procenta na fermentovanou půdu.

PŘEDMĚT VYNALEZU

1. Způsob výroby krystalického fungicidi-nu z fermentovaných půd, nebo amorf-ních preparátů, vyznačený tím, že k methanolic-kému koncentráту antibiotika se přidá al-kohol o vyšším počtu uhlíků než 3 a směs se upraví přidávkem vody tak, aby vznikla soustava o jedné kapalně fázi.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že jako vyššího alkoholu se použije butano-

lu v množství 3 až 20 % a nejméně 20 % obj. vody.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že k přípravě koncentráту se použije bio-masy, která byla předem částečně odvodně-na methanolem.

4. Způsob podle bodu 3, vyznačený tím, že k částečně zahuštěnému vlhkému extrak-tu se přidá vyšší alkohol a směs se dále za-huštuje do vykrystalování antibiotika.