



(12)

BREVET DE INVENTIE

Hotarirea de acordare a brevetului de inventie poate fi revocata
in termen de 6 luni de la data publicarii

(21) Nr. cerere: **143766**

(22) Data de depozit: **17.01.90**

(30) Prioritate:

(41) Data publicarii cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicarii hotaririi de acordare a brevetului:
31.05.93 BOPI nr. 5/93

(45) Data publicarii brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfectionare la brevet:
Nr.

(62) Divizata din cererea:
Nr.

(86) Cerere internationala PCT:
Nr.

(87) Publicare internationala:
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 99792; 79543

(71) Solicitant: Institutul de Cercetari Chimico-Farmaceutice, Bucuresti - Centrul de Cercetari pentru Antibiotice,
Iasi, RO

(73) Titular: (72)

(72) Inventatori: Luca Stefan, Graunte Xenia, Mihai Cristina, Bocan Ana-Maria, Iasi, RO

(54) Procedeu pentru separarea și purificarea eritromicinei-bază

(57) **Rezumat:** Inventia se refera la un procedeu de izolare a eritromicinei-baza din solutiile native rezultate din biosinteza, prin intermediul lactatului de eritromicina, neutralizarea acestuia in mediu or-

ganic apos sau anhidru si separarea eritromicinei, la cald sau la rece, in functie de solventul in care s-a realizat scindarea lactatului de eritromicina in eritromicina baza.

Revendicari: 1

RO 106512 B1



Prezenta invenție se referă la un procedeu de separare și purificare a eritromicinei - bază din lactatul de eritromicină - produs intermediar sub care se poate izola eritromicina din lichidul de cultură rezultat în urma procesului de biosinteză a eritromicinei.

Se cunosc procedee de separare a eritromicinei, care constau în izolarea acesteia din soluțiile native, prin extracții succesive în solvenți organici nemiscibili cu apa, din care, în final, eritromicina se separă ca bază liberă prin procedee combinate, care utilizează procese de răcire a soluțiilor eritromicinei și nesolvenți, sau prin transformare în alte săruri insolubile în solventul în care s-a făcut extracția.

Aceste procedee prezintă dezavantajul că implică multe etape de lucru, consumuri de solvenți mari și cheltuieli energetice ridicate. Pe de altă parte, produsul se obține parțial impurificat.

Procedeul conform invenției înlătură aceste dezavantaje, prin aceea că eritromicina se izolează din soluția nativă obținută în urma filtrării lichidului de cultură, prin extracție într-un solvent nemiscibil cu apă, de preferință acetat de butil, din care se izolează sub forma unei sări insolubile cu acidul lactic, în etapa finală lactatul de eritromicină fiind transformat în eritromicină bază.

Un alt avantaj al procedurii conform invenției constă în aceea că utilizează solvenți care se pot recupera și recircula în proces, asigurând economicitatea ridicată a procesului propus în invenție.

În procedeul conform invenției se obține lactatul de eritromicină direct în solventul utilizat în extracția eritromicinei din soluție nativă, după care acesta se separă și se transformă în eritromicină bază, prin alcalinizare cu o bază organică sau anorganică în mediu anhidru sau apos.

Drept agenți de alcalinizare se pot folosi trietilamina, amoniacul sau hidroxidul de sodiu, iar ca solvenți se pot utiliza clorura de metilen sau cloroformul, de

preferință clorura de metilen.

În cazul în care reacția de transformare a lactatului de eritromicină în eritromicină bază are loc în mediu organic anhidru, se folosește trietilamina, sarea de trietilamoniu a acidului lactic rezultată prin reacția lactatului cu trietilamina, se îndepărtează din solvent prin extracție în apă.

Izolarea eritromicinei bază rezultată din clorura de metilen se face după purificarea acesteia prin decolorare cu cărbune activ, prin răcire la $-15 \dots -20^{\circ}\text{C}$, de preferință -18°C , urmată de filtrare.

Se dau în continuare trei exemple, care ilustrează procedeul conform invenției.

Exemplul 1. Obținerea lactatului de eritromicină: 2000 ml soluție de eritromicină în acetat de butil cu activitatea de 19950 U/ml, se anhidrizează cu 100 g Na_2SO_4 anhidru, se decolorează cu 10 g cărbune activ, se agită 15 min și se filtrează.

Soluția obținută se acidulează cu soluție de acid lactic în acetat de butil 37% (g/v) până la $\text{pH} = 5,2$. Se agită la temperatura camerei 1,5 h, apoi 0,5 h la $-5 \dots 0^{\circ}\text{C}$. Cristalele obținute se separă prin filtrare, se spală pe filtru cu 40 ml eter de petrol și se usucă la presiune redusă, timp de 3 h, la temperatura de 45°C .

Rezultă 43,4 g lactat de eritromicină cu activitate de 800 U/mg. Randament 87,01%.

Transformarea lactatului de eritromicină în eritromicină bază: 10 g lactat de eritromicină, cu activitate de 800 U/mg, se dizolvă în 400 ml apă rece ($2 \dots 8^{\circ}\text{C}$). Soluția obținută se filtrează la presiune redusă de eventualele impurități, după care se tratează cu amoniac 25% până la $\text{pH} = 8,5 \dots 9,0$, se încălzește la $50 \dots 55^{\circ}\text{C}$ și se agită la această temperatură 2 h. Cristalele obținute se filtrează la cald și se spală pe filtrul cu 10 ml apă cu temperatura de 50°C .

După uscare la presiune redusă timp de 3 h, la temperatura de 45°C , se obțin

7,7 g eritromicină-bază cu activitate de 920 U/mg și rotație specifică $[\alpha]_D^{20} = -74,8^\circ$. Randament 88,5%.

Exemplul 2. Se lucrează ca în exemplul 1, cu deosebire că, în locul amoniacului 25%, pentru corecția de pH se folosește soluție NaOH 10%. Se obțin 7,68 g eritromicină-bază cu activitate de 920 U/mg și rotație specifică $[\alpha]_D^{20} = -73,5^\circ$. Randament 88,3%.

Exemplul 3. 10 g lactat de eritromicină, cu activitate de 800 U/mg, se suspendă în 130 ml clorură de metilen și se adaugă trietilamină până la $pH = 8,5 \dots 9,0$, când are loc solvirea completă. Soluția diclormetanică obținută se supune extracției lactatului de trietilamoniu în 65 ml apă.

Faza organică se anhidrizează cu 4 g Na_2SO_4 anhidru și se decolorează cu 0,4 g cărbune activ. Se agită 15 min și se filtrează. Soluția obținută se răcește la $-15 \dots -18^\circ C$, se menține sub agitare la această temperatură 4 h, apoi eritromicina-bază cristalizată se filtrează pe un filtru Nuce, prevăzut cu răcire, la $-15 \dots -20^\circ C$ și se spală pe filtru cu 5 ml clorură

de metilen răcită la $-15 \dots -18^\circ C$.

După uscare la presiune redusă, timp timp de 3 h la $45^\circ C$, se obțin 6,4 g eritromicină-bază cu activitate de 930 U/mg și rotație specifică $[\alpha]_D^{20} = -75,6^\circ$. Randament 74,4%.

Revendicare

- 10 Procedeu de separare și purificare a eritromicinei - bază din soluția sa în acetat de butil, obținută în urma filtrării lichidului de biosinteză și a extracției cu acetat de butil, caracterizat prin aceea
- 15 că soluția se acidulează cu acid lactic în acetat de butil 37% (g/V) până la $pH = 5,2$, se agită 1,5 h la $20 \dots 25^\circ C$ și 0,5 h la $-5 \dots 0^\circ C$, când se formează cristale de lactat de eritromicină, care se filtrează,
- 20 se spală cu eter de petrol și se usucă 3 h la presiune redusă și $45^\circ C$, după care lactatul de eritromicină se alcalinizează în mediu anhidru sau apos cu NH_3 25%.
- 25 NaOH 10% sau clorură de metilen și trietilamină până la un $pH = 8,5 \dots 9,0$, urmată de filtrare și uscare 3 h la presiune redusă și $45^\circ C$, când rezultă eritromicina - bază cu activitate de 920 U/mg.

Președintele comisiei de invenții: biolog Nicola Nicolin
Examinator: biochim. Crețu Adina

Grupa 5; 4

Preț lei

Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci

Tehnoredactare, computerizată și multiplicare: "Societatea Autonomă de Informatică SAI" S.R.L.