



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 17.V.1966 (P 114 613)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 30.XI.1968

Kl. 30 h, 6

MKP A 61 k 2/100

UKD

Współtwórcy wynalazku: mgr inż. Kazimierz Dziegielewski, mgr inż.
Kazimierz Gawle, mgr inż. Katarzyna Zó-
rawska

Właściciel patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polf”,
Warszawa (Polska)

Sposób oczyszczania antybiotyków zasadowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania antybiotyków zasadowych.

Antybiotyki zasadowe jak na przykład streptomycyna, neomycyna, wiomycyna, otrzymywane są na drodze fermentacyjnej.

Znane metody izolacji tych antybiotyków z płynów pofermentacyjnych polegają na sorpcji na kationicie karboksylowym w formie sodowej (Wofatit CP, Zerolit 226, Amberlit IRC-50 i inne) i elucji rozcieńczonymi roztworami wodnymi kwasów mineralnych lub zasad.

Uzyskane w wyniku elucji roztwory wodne antybiotyków zasadowych są następnie oczyszczane różnymi sposobami. Według opisów patentowych CSRS nr 106640 i japońskiego nr 1692 (1964) r.) eluaty antybiotyków zasadowych poddaje się działaniu silnie zasadowego anionitu w formie „wodorotlenowej” oraz odbarwia węglem aktywnym. Autorzy patentu St. Zjedn. Am. nr 2.827.417 polecają zastosowanie powtórnej sorpcji antybiotyku zasadowego na kationicie karboksylowym w formie „sodowej”, elucji, a następnie demineralizacji eluatu na kationicie sulfonowym w formie „wodorowej” i odbarwienia węglem aktywnym.

Z oczyszczonych roztworów wodnych wyodrębnione są następnie sole antybiotyków zasadowych jednym ze znanych sposobów (liofilizacja, suszenie rozpyłowe lub wytrącanie rozpuszczalnikami organicznymi).

Inna metoda oczyszczania podana została w opi-

2

sie patentowym NRD nr 15181, według której z eluatu otrzymuje się sól kompleksową streptomycyny z chlorkiem wapniowym, a następnie przekształca ją na siarczan streptomycyny.

5 W niektórych źródłach patentowych podano substancje redukujące, które dodatkowo stabilizują preparaty antybiotyków zasadowych uzyskane z oczyszczonych roztworów.

10 W eluatach antybiotyków zasadowych otrzymywanych znanymi metodami jonitowymi znajdują się zanieczyszczenia pochodzenia organicznego. Część z nich stanowią substancje barwne, które w czasie oczyszczania są prawie całkowicie usuwane. Pozostałe, bezbarwne zanieczyszczenia organiczne usuwane są wyżej wymienionymi metodami 15 tylko częściowo, a zatem przechodzą do gotowych preparatów soli antybiotyków zasadowych. Zanieczyszczenia te są substancjami nietrwałymi, rozkładającymi się w podwyższonej temperaturze w 20 atmosferze tlenowej z wytworzeniem substancji barwnych. Tego rodzaju warunki istnieją podczas suszenia w suszarniach próżniowych, suszenia rozpyłowego lub liofilizacji.

25 Dalszy rozkład tych substancji następuje podczas przechowywania handlowych preparatów antybiotyków zasadowych. Trwałość tych substancji jest znacznie mniejsza w roztworach wodnych, dlatego też po przyrządzeniu roztworu do iniekcji z handlowego preparatu np. streptomycyny następuje 30 je bardzo szybko pogłębienie jego barwy.

Wśród bezbarwnych zanieczyszczeń towarzyszących antybiotykowi zasadowemu znajdują się substancje posiadające aktywność biologiczną, co można wytłumaczyć podobieństwem ich budowy chemicznej do antybiotyków. W handlowych preparatach antybiotyków zasadowych sumują się więc aktywności biologiczne samego antybiotyku i zanieczyszczeń antybiotykopodobnych. Podczas przechowywania takich preparatów wskutek rozkładu omawianych zanieczyszczeń następuje pogorszenie jakości antybiotyków zasadowych, to znaczy pogłębienie barwy preparatów (roztworów wodnych preparatów) oraz obniżenie ich aktywności biologicznych. Nie wykluczone, że zanieczyszczenia te katalizują rozkład samych antybiotyków, trudno to jednak stwierdzić wobec braku dokładnych metod analitycznych.

Trwałe preparaty streptomycyny można uzyskać za pomocą technologii przedstawionej w opisie patentowym NRD nr 15181. Istotą tego sposobu jest oddzielenie zanieczyszczeń towarzyszących streptomycynie przez selektywne związanie streptomycyny w sól kompleksową z chlorkiem wapniowym. Siarczan streptomycyny uzyskany tą metodą charakteryzuje się wysokim stopniem czystości. Wyżej opisana metoda jest jednak wieloetapowa, uciążliwa i nieekonomiczna z uwagi na niską wydajność.

Metoda oczyszczania antybiotyków zasadowych będąca przedmiotem wynalazku umożliwia usunięcie wszystkich wyżej omawianych zanieczyszczeń i uzyskanie trwałych i bezbarwnych handlowych preparatów antybiotyków zasadowych z wysoką wydajnością.

Sposobem według wynalazku roztwór wodny soli antybiotyku zasadowego o dowolnym stężeniu otrzymywany w procesie produkcyjnym o wartości $\text{pH} = 2,5-9,5$, korzystnie $4,5-7,0$ ogrzewa się pod normalnym lub zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze $40-100^{\circ}\text{C}$, korzystnie w temperaturze $60-70^{\circ}\text{C}$ w ciągu od 20 minut do 10 godzin, korzystnie w ciągu 1-4 godzin. Po tym czasie roztwór soli antybiotyku zasadowego oziębia się do temperatury pokojowej, koryguje się jego pH do wartości $3,0-7,0$, korzystnie do wartości $4,0-5,5$, a następnie odbarwia w znany sposób węglem aktywnym.

Podczas ogrzewania wodnego roztworu soli antybiotyku zasadowego omawiane zanieczyszczenia bezbarwne rozkładają się z wytworzeniem substancji barwnych i usuwane są za pomocą węgla aktywnego łącznie z pierwotnie występującymi substancjami barwnymi. Preparat handlowy soli antybiotyku zasadowego wyodrębniony z tak oczyszczonego roztworu dowolną znaną metodą jest bezbarwny i nie ciemnieje przy przechowywaniu podobnie, jak nie ciemnieje roztwór do iniekcji przyrządzony z tego preparatu. Potwierdzają to dane z dziesięciu kolejnych szarż produkcyjnych streptomycyny podane w tabeli nr 1. W tabeli podano wartości ekstynkcji (E) roztworów produkcyjnych nieoczyszczonych, oczyszczonych dotychczas znanym sposobem oraz oczyszczonych według wynalazku. Podano także ekstynkcję roztworów uzyskanych z odpowiednich preparatów streptomycyny.

L. p.	Wartość ekstynkcji (E)					
	A	B	C	D	E	F
1	0,35	0,015	0,16	0,72	0,018	0,02
2	0,26	0,018	0,2	0,58	0,015	0,015
3	0,15	0,01	0,15	0,4	0,01	0,01
4	0,31	0,02	0,3	0,65	0,015	0,02
5	0,12	0,01	0,18	0,25	0,02	0,01
6	0,41	0,02	0,25	0,90	0,02	0,025
7	0,25	0,012	0,11	0,52	0,02	0,02
8	0,28	0,01	0,12	0,45	0,01	0,01
9	0,3	0,015	0,17	0,6	0,015	0,018
10	0,19	0,01	0,1	0,5	0,015	0,02

A — roztwór produkcyjny

B — roztwór A po odbarwieniu węglem aktywnym

C — roztwór przyrządzony z siarczanu streptomycyny uzyskanego z roztworu B

D — roztwór A po ogrzewaniu w temperaturze 60°C w ciągu 2 godzin

E — roztwór D po ochłodzeniu do temperatury pokojowej i odbarwieniu węglem aktywnym

F — roztwór przyrządzony z siarczanu streptomycyny uzyskanego z roztworu E.

Zabarwienie roztworów (ekstynkcję E) mierzono na fotokolorymetrze „Pulfrich” przy zastosowaniu

filtru L-3-61 w kiuwecie 1 cm. Stężenie streptomycyny w roztworach (A, B, D, E) miało wartości w granicach 200000—220000 j/ml.

Stężenie streptomycyny w roztworach (C i F) miało również wartości w granicach 200000—220000 j/ml (badania kontrolne prowadzi się na roztworach streptomycyny o takim stężeniu, gdyż jest to stężenie leku w roztworach do iniekcji).

Dodatkowo w celu stabilizacji aktywności i barwy soli antybiotyku zasadowego do jego wodnego roztworu oczyszczonego według wynalazku przed krystalizacją i suszeniem w suszarni próżniowej

lub przed liofilizacją czy suszeniem rozpyłowym dodaje się określoną ilość (0,01–5,0% wagowych w odniesieniu do ilości antybiotyku) substancji o właściwościach redukujących np. podsiarczynu sodowego czy rongalitu. Dodatek substancji redukujących może mieć dodatni wpływ zwłaszcza przy przechowywaniu preparatów antybiotyków zasadowych w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności otoczenia np. w krajach tropikalnych.

Substancje o właściwościach redukujących spełniają wówczas rolę czynnika ochronnego przed rozkładem samego antybiotyku.

Przeprowadzone próby przyspieszonego starzenia preparatów antybiotyków zasadowych (ogrzewanie preparatów handlowych do temperatury 105° trzykrotnie po 8 godzin, każdorazowo z przerwami po 16 godzin) wykazały, że aktywność preparatów stabilizowanych po zastosowaniu testu jest wyższa niż analogicznie sprawdzonego preparatu nie zawierającego substancji ochronnej (zwłaszcza w przypadku neomycyny).

W tabeli 2 podano aktywności preparatów neomycyny uzyskanych z roztworów oczyszczonych dotychczas znaną metodą oraz metodą według wynalazku. Do roztworów oczyszczonych według wynalazku dodano substancje redukujące przed wyodrębnieniem preparatów neomycyny.

Tabela 2

Oczyszczony siarczan neomycyny	Aktywność biologiczna przed zastosowaniem testu 9 / j (mg)	Aktywność biologiczna po zastosowaniu testu / j (mg)
I	629	570
II	630	625
III	628	619

I — Siarczan neomycyny oczyszczony w sposób dotychczas znany

II — Siarczan neomycyny oczyszczony według wynalazku z dodatkiem 0,75% podsiarczynu sodu

III — Siarczan neomycyny oczyszczony według wynalazku z dodatkiem 0,75% rongalitu.

Dane przytoczone w tabeli 2 są średnią z pięciu prób. W przypadku streptomycyny różnice aktywności analogicznie sprawdzonych preparatów były niewielkie.

Należy zaznaczyć, że test powyższy jest bardzo ostrym sprawdzianem, który daje przybliżony obraz jakości preparatów handlowych antybiotyków zasadowych po kilkuletnim przechowywaniu.

Przykład I. Wodny roztwór siarczanu streptomycyny w ilości 400 ml o stężeniu 250000 j/ml i wartości pH = 6,0 uzyskany po zagęszczeniu eluatu ogrzano do temperatury 60°C, przetrzymano

w tej temperaturze w ciągu 2 godzin, następnie ochłodzone do temperatury 20°C i obniżono pH do wartości 5,0. Do ochłodzonego roztworu soli antybiotyku dodano 10 g węgla aktywnego Carbol H-ekstra i mieszano, po 45 minutach węgiel odsączono, przemyto małą ilością wody destylowanej i przemywki dołączono do przesączu. Przesącz powtórnie potraktowano 10 g węgla aktywnego H-ekstra i postępowano jak wyżej. Do bezbarwnego roztworu siarczanu streptomycyny dodano 2,0 g podsiarczynu sodowego, wartość pH skorygowano trójetyloaminą do wartości 6,5 i sól antybiotyku wytrącono metanolem i acetonem i suszono w próżni najpierw w temperaturze pokojowej, a następnie w temperaturze około 55°C. Uzyskano preparat o aktywności biologicznej 742 j/mg w ilości 128 g. Roztwór o stężeniu 200000 j/ml przyrządzony z tego preparatu jest bezbarwny i nie zmienia się podczas stania w temperaturze pokojowej w ciągu 72 godzin. Siarczan streptomycyny uzyskano z wydajnością 95% wagowych w odniesieniu do ilości antybiotyku zasadowego.

Przykład II. 400 g surowego siarczanu neomycyny rozpuszczono w wodzie destylowanej otrzymując 1225 ml roztworu o stężeniu 200000 j/ml i wartości pH = 5,9. Roztwór ogrzano do temperatury 60°C, przetrzymano w tej temperaturze w ciągu 2 godzin, następnie ochłodzone do temperatury 20°C i obniżono pH do wartości 5,5 za pomocą kwasu siarkowego. Do ochłodzonego roztworu dodano 50 g węgla aktywnego Carbol H-ekstra i mieszano w ciągu 30 minut. Węgiel odsączono, przemyto małą ilością wody destylowanej i przemywki dołączono do przesączu. Do bezbarwnego roztworu dodano 3 g rongalitu i wytrącono siarczan neomycyny metanolem używając 6-krotnej objętości metanolu w stosunku do roztworu wodnego siarczanu neomycyny. Osad odsączono, przemyto metanolem i acetonem i wysuszono w próżni w temperaturze 50°C.

Uzyskano 370 g siarczanu neomycyny o mocy 630 j/mg i zawartości wilgoci 4,5% wagowych. Wydajność ca 95% wagowych w odniesieniu do ilości antybiotyku zasadowego.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób oczyszczania antybiotyków zasadowych, **znamienny tym**, że roztwór wodny soli antybiotyku zasadowego o dowolnym stężeniu i wartości pH = 2,5–9,5, korzystnie 4,5–7,0, ogrzewa się pod normalnym lub zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40–100°C, korzystnie w temperaturze 60–70°C w ciągu od 20 minut do 10 godzin, korzystnie w ciągu 1–4 godzin, po czym ochłodzony do temperatury pokojowej roztwór odbarwia się w znany sposób węglem aktywnym i stabilizuje się w znany sposób środkiem redukującym takim jak podsiarczyn sodowy lub rongalit.