



POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

59365

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 19.X.1968 (P 129 622)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 15.IV.1970

Kl. 12 o, 25/04

MKP C 07 c

164/38

UKD

Współtwórcy wynalazku: mgr inż. Zdzisław Zakrzewski, mgr Anna Groszkiewicz, mgr Sabina Raczkowska, inż. Maria Malinowska

Właściciel patentu: Instytut Farmaceutyczny, Warszawa (Polska)

Sposób wyodrębniania metyloandrostadienolonu z brzezki pofermentacyjnej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania metyloandrostadienolonu z brzezki pofermentacyjnej. Metyloandrostadienolon, cenny lek o działaniu anabolicznym, powstaje z metyloandrostenolonu w wyniku biotransformacji wywołanej drobnoustrojami odwodniającymi. Ze względów ekonomicznych przemiany nie prowadzi się do końca, w związku z czym w brzezce pofermentacyjnej zawarty jest zarówno produkt (w roztworze) jak i substrat (w postaci zawieszonego osadu).

Znany sposób wyodrębniania metyloandrostadienolonu z brzezki pofermentacyjnej czy też jej frakcji polega na wyczerpującej ekstrakcji tych mieszanin rozpuszczalnikami organicznymi i następnej przeróbce otrzymanych ekstraktów na drodze fizykochemicznej lub fizycznej, na przykład metodą chromatografii kolumnowej lub przez wielokrotną krystalizację pozostałości po odparowaniu rozpuszczalnika. Sposób ten związany jest ze znacznym nakładem pracy, czasu i kosztów. Tak więc na przykład przy wielokrotnej krystalizacji pozostałości powstają straty sięgające 10% zawartej w surowym produkcie ilości steroidów, a poza tym znaczne zużycie rozpuszczalnika, przy czym łączna wydajność procesu wyodrębniania z brzezki wynosi około 85%.

Stwierdzono, że w przypadku metyloandrostadienolonu i metyloandrostenolonu można zastosować metodę chemiczną wyodrębniania, opartą na powstawaniu nowych i nie opisanych dotąd w litera-

2

turze trudno rozpuszczalnych połączeń addycyjnych z β -naftolem. Otrzymane połączenia addycyjne w środowisku alkalicznym ulegają łatwo rozkładowi, uwalniając odpowiedni związek steroidowy z niemal ilościową wydajnością i w stanie wysokiej czystości. Sposób ten wpływa na uzyskanie równie wysokiej ogólnej wydajności procesu oraz znacznie upraszcza przerób produktów biotransformacji w porównaniu ze sposobami znanymi.

Według wynalazku z brzezki pofermentacyjnej, zawierającej metyloandrostadienolon oraz nieprzereagowany metyloandrostenolon, sedymentuje się i/lub odwirowuje albo też odsąca części stałe, część ciekłą brzezki poddaje się ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi, ekstrakt zagęszcza się, zagęszczony roztwór zadaje się β -naftolem i ewentualnie częściowo odparowuje się rozpuszczalnik, wytrącony związek addycyjny z β -naftolem oddziela się, rozpuszcza w organicznym rozpuszczalniku, roztwór zadaje się wodnym roztworem wodorotlenku metalu alkalicznego, warstwę wodną zawierającą β -naftolan metalu alkalicznego oddziela się, a z warstwy organicznej po przemyciu wodą wydziela się metyloandrostadienolon przez częściowe odparowanie rozpuszczalnika i oziębienie roztworu.

W analogiczny sposób z oddzielonej części stałej brzezki ewentualnie odzyskuje się nieprzereagowany metyloandrostenolon poprzez jego związek addycyjny z β -naftolem. Można również odzyskać nieprzereagowany metyloandrostenolon z części stałej

brzezki w sposób znany, na przykład przez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi, odparowanie ekstraktu i oczyszczenie surowego produktu przez krystalizację lub metodą chromatograficzną.

Jako rozpuszczalnik ograniczony stosuje się rozpuszczalnik z grupy pochodnych chlorowcowych związków alifatycznych, takich jak chlorek etylenu, chloroform i inne.

Wyodrębniony sposobem według wynalazku metyloandrostadienolon, zarówno jak i odzyskany metyloandrostenolon, charakteryzują się wysoką czystością.

Przykład. Z 2,5 l brzezki pofermentacyjnej zawierającej produkt dehydrogenacji 2,5 g metyloandrostenolonu w pozycji 1,2 przeprowadzonej w sposób standardowy z udziałem odpowiedniego mikroorganizmu, wydzielono części stałe przez odwirowanie. Uzyskany w ten sposób roztwór zawierający produkt reakcji poddano wyczerpującej 7-krotnej ekstrakcji chlorkiem etylenu użytym w porcjach po 350 ml. Połączone ekstrakty przemyto trzykrotnie 1% roztworem kwaśnego węgla sodowego po 250 ml, a następnie wodą do odczynu obojętnego, po czym oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem do osiągnięcia stężenia około 1 g steroidu w 150 ml chlorku etylenu, czyli do około 300 ml. Następnie dodano 1,0 g β -naftolu i oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem do momentu wydzielenia się osadu. Po oziębieniu w ciągu kilku godzin w chłodni w temperaturze około 2°C oddzielono utworzone kryształy i przemyto na sączku kilkakrotnie małymi porcjami czterochlorku węgla. Po wysuszeniu otrzymano 2,7 g związku addycyjnego metyloandrostadienolonu z β -naftolem o temperaturze topnienia 109–110°C, $[\alpha]_D^{20} = +6,8^\circ$ ($c = 1\%$, etanol), $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1650$ przy $\lambda_{\text{max}} = 226 \text{ m}\mu$. Zawartość C obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2 \cdot \text{C}_{10}\text{H}_7\text{OH}$ wynosi 81,04%, znaleziona – 81,37%, zawartość H obliczona wynosi 8,16%, znaleziona – 7,96%.

Wydajność 90%. Otrzymany związek addycyjny rozpuszczono w 270 ml chlorku etylenu i zadano taką samą objętością 1% wodnego roztworu wodorotlenku sodowego, po czym warstwy rozdzielono. Roztwór w chlorku etylenu przemyto wodą do odczynu obojętnego, po czym oddestylowano częściowo rozpuszczalnik do momentu wydzielenia się kryształów steroidu i mieszaninę pozostawiono w ciągu około 16 godzin w temperaturze około 2°C. Po odsączeniu i wysuszeniu otrzymano 1,8 g metyloandrostadienolonu, co odpowiada 98,7% wydajności teoretycznej. Łączna wydajność procesu wyodrębniania steroidu z brzezki wyniosła 84%. Otrzymany produkt był chromatograficznie czysty i wykazywał skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{20} = +9,7^\circ$ ($c = 1\%$, etanol), $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 509$ przy $\lambda_{\text{max}} = 244 \text{ m}\mu$.

Osad z odwirowania brzezki zawierający nieprzereagowany metyloandrostenolon zawieszono w 500 ml wody wodociągowej i poddano wyczerpującej 7-krotnej ekstrakcji chlorkiem etylenu użytym w porcjach po 70 ml. Połączone ekstrakty przemyto

trzykrotnie 1% roztworem kwaśnego węgla sodowego, a następnie wodą do odczynu obojętnego, po czym ekstrakt przerabiano dalej w sposób opisany powyżej otrzymując 0,32 g związku addycyjnego metyloandrostenolonu z β -naftolem o temperaturze topnienia 117–118°C, $[\alpha]_D^{20} = +55,2^\circ$

($c = 1\%$, etanol), $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1,650$ przy $\lambda_{\text{max}} = 226 \text{ m}\mu$.

Zawartość C obliczona dla wzoru $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2 \cdot \text{C}_{10}\text{H}_7\text{OH}$ wynosi 80,67%, znaleziona – 79,67%, zawartość H obliczona wynosi 8,58%, znaleziona – 8,29%. Wydajność 92% w stosunku do zawartości w ekstrakcie. Z otrzymanego związku addycyjnego otrzymano w sposób powyżej opisany 0,21 g metyloandrostenolonu, co odpowiada 97,0% wydajności teoretycznej. Łączna wydajność procesu wyodrębniania nieprzereagowanego substratu steroidowego wyniosła 84,7%. Otrzymany produkt był chromatograficznie czysty i wykazywał skręcalność właściwą $[\alpha]_D^{20} = +79^\circ$, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 521$ przy $\lambda_{\text{max}} = 242 \text{ m}\mu$.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyodrębniania z brzezki pofermentacyjnej metyloandrostadienolonu, otrzymanego z metyloandrostenolonu na drodze mikrobiologicznej, **znamienny tym**, że brzezkę pofermentacyjną sedymentuje się i/lub odwirowuje bądź przesącza, po czym otrzymaną część ciekłą brzezki ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi, następnie z ekstraktu częściowo odparowuje się rozpuszczalnik, zagęszczony roztwór zadaje się β -naftolem i ewentualnie częściowo odparowuje się rozpuszczalnik, wytrącony związek addycyjny oddziela się i przemywa, rozpuszcza się go w organicznym rozpuszczalniku, roztwór zadaje się wodnym roztworem wodorotlenku metalu alkalicznego, warstwę wodną oddziela się, a z warstwy organicznej uzyskuje się metyloandrostadienolon przez częściowe lub całkowite odparowanie rozpuszczalnika, przy czym z oddzielonego z brzezki osadu odzyskuje się ewentualnie nieprzereagowany metyloandrostenolon.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że osad oddzielony z brzezki ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi, z otrzymanego ekstraktu częściowo odparowuje się rozpuszczalnik, zagęszczony roztwór zadaje się β -naftolem i ewentualnie odparowuje się częściowo rozpuszczalnik, wytrącony związek addycyjny oddziela się i przemywa, rozpuszcza się go w organicznym rozpuszczalniku, roztwór zadaje się wodnym roztworem wodorotlenku metalu alkalicznego, warstwę wodną oddziela się, a z warstwy organicznej uzyskuje się wolny metyloandrostenolon przez częściowe lub całkowite odparowanie rozpuszczalnika.

3. Sposób według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się rozpuszczalnik z grupy pochodnych chlorowcowych związków alifatycznych, taki jak chlorek etylenu, chloroform.