

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231 279

(11)

(B1)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 24 03 83
(21) PV 2046-83

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/62 //
C 12 R 1/54

(40) Zveřejněno 15 02 84
(45) Vydáno 01 03 87

(75)
Autor vynálezu

MAZÁŇ ŠTEFAN RNDr.,
KLIMENT JÚLIUS ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54)

Způsob izolace antibiotika tylosinu

Vynález řeší způsob izolace antibiotika tylosinu z vyfermentované půdy po skončení kultivace produkčního kmene *Streptomyces fradiae*. Způsob podle vynálezu se vyznačuje tím, že se vyfermentovaná půda upraví přidáním kationaktivního detergentu, s výhodou dimethylbenzylododeciniumbromidu (Ajatinu) v koncentraci 0,03 % obj., vztaženo na 100 % obj. vyfermentované půdy, dále se přidá formaldehyd v koncentraci 0,3 % obj. a síran hlinitý v koncentraci 1,5 % hmot.obj. Potom se oddělí pevná část a filtrát se extrahuje semipolárním organickým rozpouštědlem, s výhodou butylacetátem, z kterého se tylosin vysráží jako sůl acetonovým roztokem kyseliny, s výhodou 1 % roztokem kyseliny vinné, a tento tylosin-tartarát se převede na tylosin-bázi o účinnosti 990 m.j. na 1 mg.

Vynález řeší způsob izolace antibiotika tylosinu z vyfermentované půdy po skončení kultivace produkčního kmene *Streptomyces fradiae*.

Tylosin je makrolidové antibiotikum sumárního vzorce $C_{45}H_{77}NO_{17}$, slabě bázičského charakteru. Je málo rozpustný ve vodě, dobře v polárních a semipolárních organických rozpouštědlech, nerozpustný v nepochárních rozpouštědlech jako je hexan nebo petrolether. Jeho vodné roztoky jsou stálé při pH v rozmezí hodnot 5,5 až 8,0. Kyselou hydrolyzou přechází na tzv. desmykosin, což je látka biologicky podobně aktivní jako tylosin. Tylosin tvoří s kyselinami dobře krystalizující sole, rozpustné ve vodě i v polárních organických rozpouštědlech.

Tylosin je antibiotikum účinné především proti grampozitivním bakteriím a mykoplazmózám /Ose E.E.: J.Am.Vet.A. 137, 421-423, 1960/. Samotný tylosin se využívá zejména při léčbě dysentérií a pneumonií hospodářských zvířat /Curtins R.A.: Can.Vet.J. 3, 285-288, 1962; Doornebal H.: Can.J.Comp.Med.Sci 29, 179-182, 1965; Schovánek V.: Veterinářství 25, 505-507, 1975/. Široce jsou využívány i jeho kombinace, jako např. se sulfonamidy /Ose E.E.: Vet.Med.Small Anim.Clin. 68, 539-543, 1973; Reichel F.: Biol.Chem.Výž.zvířat 10, 343-350, 1974/, furazolidinem /US 3,690,869/, colistinem /Ger.offen 2,327,392/, jakož i s inertními přísadami, např. síranem sodným /US 3,923,993/, polyoxyethylenestery /Brit. 1,219,785/ nebo s močovinou /Ger.offen 1,812,471/. Na přípravu léčebných přípravků se též používají sole tylosinu jako tartarát, chlorid, fosfát nebo síran /Bruszewski W.: Now.Wet. 6, 349-352, 1972/.

V krmných směsích se zase využívá technický tylosin, připravený sprayováním fermentační půdy /Dvořák J., Straková J., Ševčík B.: Biol.Chem.Vet. 18, 77-88, 1982/.

Doposud se tylosin izoloval z fermentační půdy tak, že se odfiltrovalo mycelium, filtrát se extrahoval chloroformem a po oddestilování chloroformu za sníženého tlaku se z olejovitého zbytku vysrážel n-hexanem tylosin /US 3,178,341/. Takto připravený tylosin bylo nutno před dalším použitím přechistit rekryystalizací z vody, a nebo připravit z něho tartarát a z něj potom čistou bázi tylosinu /Hamill R.L.: Antib. and Chemother. 11, 328-334, 1961/.

Preparát tylosin o obsahu 40 % účinné látky je možno připravit vysolením tylosinu z filtrátu fermentační půdy, upravené přídavkem 2 až 5 % síranu zinečnatého, a nebo extrakcí tylosinu alkoholy z vysprayované fermentační půdy, např. 90% propanolem /AO č. 197 600/. Tylosin podobné čistoty je možno též získat azeotropickým oddestilováním vody např. s n-hexylalkoholem /Ger.offen 2,054,085/.

Bylo zjištěno, že tylosin ve formě tartarátu je možno získat ve vysoké čistotě a výtěžku z vyfermentované živné půdy po ukončení kultivace produkčního kmene *Streptomyces fradiae*, způsobem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se vyfermentovaná půda upraví přidáním kationaktivního detergentu v koncentraci 0,01 až 0,5 % obj., vztaženo na 100 % vyfermentované půdy, s výhodou dimethylbenzylododeciniumbromidu /Ajatinu/ v koncentraci 0,03 % obj., formaldehydu v koncentraci 0,1 až 0,5 % obj., s výhodou 0,3 % obj., síranu hlinitého v koncentraci 0,5 až 3,0 % hmot. obj., s výhodou 1,5 % hmot. obj., načež se oddělí pevná část a filtrát se extrahuje semipolárním organickým rozpouštědlem, s výhodou butylacetátem, z kterého se tylosin vysráží jako sůl acetonovým roztokem kyseliny, s výhodou 1% roztokem kyseliny vinné, a převede se dále na bázi tylosinu.

Pro úpravu vyfermentované půdy je možno použít jako kationaktivního detergentu /kromě již uváděného Ajatinu/ i trimethyldodecyl-hexadecylamoniumchloridu /Tetrasalu/, cetyltri-

methyllumoniumchloridu nebo cetylpyridiniumbromidu. Úprava fermentační půdy se provádí při teplotě 20 až 70 °C. Místo síranu hlinitého je možno použít i síran hlinitodraselný. Z upravené fermentační půdy se oddělí mycelium společně s vysráženými balastními látkami filtrací nebo odstředěním. Filtrát, který je takto možno získat až v 90% výtěžku, se extrahuje ve vodě nerozpustným rozpouštědlem, kromě butylacetátu je možno použít i propylacetát, ethylacetát nebo methylisobutylketon. Extrahovaný filtrát má pH v rozmezí hodnot 7,5 až 9,5. Vyextrahovaný tylosin se sráží z filtrátu vhodnou anorganickou či organickou kyselinou, rozpustnou v polárním či semipolárním organickém rozpouštědle. Oproti dosud používaným způsobům výroby tylosinu se způsobem podle vynálezu získá přímo čistý tylosin-tartarát, který lze využít buď přímo k přípravě léčivých přípravků, nebo se známými postupy převede připravený tylosin-tartarát na tylosin-bázi. Kromě výše uvedené výhody přináší způsob podle vynálezu i řadu technologických výhod. Účinkem kationaktivního detergentu se snižuje viskozita fermentační půdy, čímž se zlepšuje její transportovatelnost. Formaldehyd zvyšuje stabilitu fermentační půdy, což má význam zejména při průmyslové výrobě tylosinu, kdy není vždy možno najednou zpracovat všechnu vyfermentovanou půdu. Síran hlinitý sráží balastní látky bílkovinné povahy, čímž se zlepšuje filtrovatelnost fermentační půdy a zvyšuje se výtěžek a čistota získaného tylosinu. Použitím butylacetátu místo chloroformu se zvyšuje selektivita extrakce, získaný extrakt není nutno zahušťovat za sníženého tlaku, ale je možno ho přímo srážet vhodnou kyselinou a po odfiltrování soli tylosinu je možno regenerovat organické rozpouštědlo běžnými způsoby.

Následující příklad provedení způsob podle vynálezu pouze dokládá, ale nijak neomezuje.

Do 4 000 ml fermentační půdy o účinnosti 2 890 m.j. na 1 ml půdy se přidají 4 ml trimethyldodecylhexadecylammoniumchloridu /Tetrasalu/ a směs se 2 hod míchá. Pak se přidá 12 ml 38% formaldehydu, míchá se dalších 30 minut a pak se do směsi pomalu přilévá 40 g okta-dekahydrátu síranu hlinitého - $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18 H_2O$, rozpuštěného ve 100 ml vody, směs se míchá další

1 hodinu. Z takto upravené fermentační půdy se získá odstředěním 3 650 ml filtrátu, ke kterému se přidá 800 ml butylacetátu a za míchání se upraví pH směsi na hodnotu 8,9 až 9,0. Po 30 min míchání se oddělí organická fáze a vodná fáze se ještě jednou extrahuje 400 ml butylacetátu. Spojené butylacetátové extrakty se přidají za míchání do 800 ml acetonu, ve kterém je rozpuštěno 5 g kyseliny vinné. Vzniklá směs se 2 h^{od} míchá a vysrážený tylosin-tartarát se odfiltruje, promyje 50 ml acetonu a vysuší volně na vzduchu. Získá se 11 g čistého tylosin-tartarátu o účinnosti 850 m.j. na 1 mg substance, což je 82% výtěžek. 10 g tylosin-tartarátu se rozpustí ve 100 ml vody, přidají se 2 g aktivního uhlí a 15 min se směs míchá. Potom se aktivní uhlí odfiltruje, promyje se na filtru 20 ml vody, která se přidá k filtrátu a ten se zahřeje na 45 °C. K zahřátému filtrátu se po kapkách přidává 10% roztok hydroxidu sodného až do hodnoty pH 8,8. Po přidání roztoku hydroxidu sodného se ke směsi přidá 15 g chloridu sodného, přičemž směs intenzivně mícháme a udržujeme teplotu na 45 °C. Směs po přidání chloridu ještě 30 min mícháme, potom odfiltrujeme vysrážený tylosin a promyžeme ho na filtru 30 ml teplé vody. Tylosin se vysuší ve vakuové sušárně při teplotě max. 60 °C. Získá se 8,2 g báze tylosinu o účinnosti 990 m.j. na 1 mg.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

231 279

Způsob izolace antibiotika tylosinu z vyfermentované půdy po skončení kultivace produkčního kmene *Streptomyces fradiae* vyznačující se tím, že se vyfermentovaná půda upraví přidáním kationaktivního detergentu v koncentraci 0,01 až 0,5 % obj^{emových}, vztaženo na 100 % vyfermentované půdy, s výhodou dimethylbenzylododecíniumbromidu v koncentraci 0,03 % obj^{emových}, formaldehydu v koncentraci 0,1 až 0,5 % obj^{emových}, s výhodou 0,3 % obj^{emových}, síranu hlinitého v koncentraci 0,5 až 3 % hmot^{nostně} obj^{emových}, s výhodou 1,5 % hmot^{nostně} obj^{emových}, načež se oddělí pevná část a filtrát se extrahuje semipolárním organickým rozpouštědlem, s výhodou butylacetátem, z kterého se tylosin vysráží jako sůl acetonovým roztokem kyseliny, s výhodou 1% roztokem kyseliny vinné, a převede se dále na bázi tylosinu.