

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

49977

**Patent dodatkowy
do patentu**

Zgłoszono: 18.II.1963 (P 100 782)

Pierwszeństwo: 27.III.1962 Niemiecka
Republika Demokratyczna

Opublikowano: 10.IX.1965

Kl. 30 h, 6

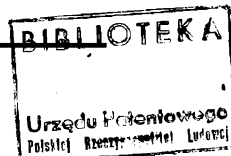
MKP C 12 d

UKD

9/12

Współtwórcy wynalazku: inż. Günter Kammann, dr Hans — Jörg Schmidt, dr inż. Helmut Engelmann, Ludwig Schiedt

Właściciel patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul (Niemiecka Republika Demokratyczna)



Sposób otrzymywania czystej gryzeofulwiny

1

Wynalazek dotyczy uproszczonego sposobu otrzymywania czystej gryzeofulwiny z breczki pofermentacyjnej na drodze ekstrakcji specjalnymi rozpuszczalnikami i adsorbicją substancji towarzyszących.

Gryzeofulwina, produkt przemiany materii, który można otrzymać na drodze fermentacji różnych szczepów *Penicillium* (na przykład *P. gryzeofulvum*, *P. patulum* i inne) zdobyła duże znaczenie w medycynie jako środek hamujący wzrost grzybów oraz przy zwalczaniu chorób roślin.

Szczepy wytwarzające gryzeofulwinę można hodować według znanych sposobów podpowierzchniowo lub powierzchniowo. Po skończonej fermentacji, substancja czynna znajduje się przede wszystkim w miceli, z powodu małej jej rozpuszczalności w wodzie. Poza tym wiadomo, że grzyb, po zaczynającym się rozpadzie miceli może jeszcze tworzyć znaczne ilości gryzeofulwiny. W celu uzyskania gryzeofulwiny micelę oddziela się od roztworu fermentacyjnego przez odsączenie, micelę ekstrahuje odpowiednimi rozpuszczalnikami takimi jak niższe alkohole, ester etylowy kwasu octowego, aceton, trójchloroetylen lub chloroform, a otrzymaną przy tym surową substancję oczyszcza przez wielokrotne przekrystalizowanie. Ponieważ w procesie wyżej opisanym otrzymuje się micelę częściowo zautolizowaną odsączenie jej następuje z trudnością.

Znane są także sposoby polegające na suszeniu na walcach całego środowiska kultury (opis pa-

2

tentowy NRF Nr 1.040.187 i opis patentowy brytyjski Nr 795.039) i nie wydzielanie gryzeofulwiny z grzybni suszonej przez wielokrotną ekstrakcję za pomocą trójchloroetylenu lub chloroformu. W ten sposób można uzyskać do 80% pierwotnie zawartej w całej masie fermentacyjnej substancji czynnej. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika otrzymuje się gryzeofulwinę o czystości do 92%.

Poza tym wiadomo, że w przeciwieństwie do innych antybiotyków gryzeofulwina wykazuje wysoką trwałość na biologiczny rozkład wywołany obcymi zarodnikami tak, że można zrezygnować z utrzymywania środowiska kultury w warunkach sterylnych. Dzięki temu możliwe jest, prowadzenie procesu w sposób ciągły przy stosowaniu stałej pożywki. Otrzymany produkt ekstrahuje się, bez suszenia przy pomocy metyloizobutyloketonu w ekstraktorze przeciwpłądowym pracującym w sposób ciągły. Otrzymaną przez zagęszczenie ekstraktu surową gryzeofulwinę trzeba dalej oczyszczać przez przekrystalizowanie ponieważ wykazuje stopień czystości 80—90% i temperaturę topnienia 220°C.

Ponadto znany jest sposób, według którego brzeczkę przy niskiej wartości pH ogrzewa się do temperatury 60—120°C, oddziela stałą micelę i po dodaniu Ca(OH)_2 otrzymuje się gryzeofulwinę z wilgotnej miceli przez ekstrakcję acetonem. Równocześnie wyekstrahowane substancje towarzyszące oddziela się następnie na drodze prze-

mywania benzyną i adsorpcji na węglu aktywnym lub tlenku glinu. Otrzymywaną przez wytrącenie wodą gryzeofulwinę oczyszcza się przez przemycie wodą, metanolem lub acetonem albo przez powtórne wytrącenie z acetonu. Z powodu długiego procesu oczyszczania, sposób ten jest czasochłonny i uciążliwy.

Sposób dalszego oczyszczania gryzeofulwiny wstępnie oczyszczonej przez przekrystalizowanie, opisany jest przez Grove i współpracowników. (J. Chem. Soc. 1952; 3955). Według metody Oxford i współpracowników (Biochem. J. 33, 240 (1939)) gryzeofulwinę otrzymuje się na drodze ekstrakcji miceli eterem, ekstrakcji pozostałości po oddestylowaniu eteru za pomocą benzenu i przez przekrystalizowanie z etanolu otrzymanej z gryzeofulwiny. Czystą gryzeofulwinę otrzymuje się z przekrystalizowanego produktu na drodze chromatografowania roztworu benzenowego na aktywnym tlenku glinowym. Sposób ten nie nadaje się jednak do otrzymywania gryzeofulwiny w skali przemysłowej, ponieważ do procesu wprowadza się gryzeofulwinę wielokrotnie przekrystalizowaną, a poza tym stosowany tlenek glinu, trzeba było preparować na drodze specjalnej obróbki. Środki te są czasochłonne, uciążliwe i związane ze stratami substancji.

Stwierdzono, że proces wytwarzania czystej gryzeofulwiny można znacznie skrócić i uprościć przez stosowanie jako środka ekstrahującego dwuchlorometanu lub 1,2-dwuchloroetanu. Niespodziewanie dwuchlorometan i 1,2-dwuchloroetan okazały się szczególnie odpowiednie do ekstrakcji gryzeofulwiny ze względu na szczególnie dobrą i selektywną zdolność rozpuszczania gryzeofulwiny. Stwierdzono mianowicie, że rozpuszczalność gryzeofulwiny w dwuchlorometanie wynosi około 11% a w 1,2-dwuchloroetanie około 6%, podczas gdy w acetonie gryzeofulwina rozpuszcza się w 3,9%-ach. W związku z selektywnym działaniem rozpuszczalnika można ominąć dotychczas konieczne kilkustopniowe oczyszczanie gryzeofulwiny.

Jeżeli bezpośrednio otrzymany surowy nieodtłuszczony wyciąg traktuje się tlenkiem glinu, węglem aktywnym lub innym adsorbentem, wówczas prawie nie następuje, względnie następuje tylko w niewielkim stopniu adsorpcja zabarwiających substancji towarzyszących.

Stwierdzono jednak, że następuje niespodziewanie silna adsorpcja substancji zabarwiających towarzyszących gryzeofulwinie, jeżeli zawarte w miceli tłuszcze, ewentualnie substancje o charakterze tłuszczy usunie się całkowicie przed oczyszczaniem gryzeofulwiny. Tłuszcze można przy tym usunąć z miceli albo przed ekstrakcją gryzeofulwiny sposobem według wynalazku albo także z pozostałości poekstrakcyjnej. Jako środki do usuwania tłuszczy, stosuje się nasycone węglowodory alifatyczne o liczbie atomów węgla C_5-C_{12} .

Ilość potrzebnych do oczyszczania tak odtłuszczonej gryzeofulwiny środków adsorpcyjnych, ewentualnie ich mieszanin wynosi tylko 10–40% ilości oczyszczalnej gryzeofulwiny. Zużyty tlenek

glinu można regenerować przez prażenie w temperaturach nie przekraczających 900°C .

Sposób według wynalazku polega na tym, że micelę oddziela się od cieklej kultury przez odsączenie albo odwirowanie, suszy i ewentualnie rozdrabnia w płynie. Z suchej miceli ekstrahuje się gryzeofulwinę za pomocą dwuchlorometanu lub 1,2-dwuchloroetanu.

Po oddestylowaniu rozpuszczalnika otrzymuje się pozostałość, która po odtłuszczeniu, przy pomocy alifatycznych nasyconych węglowodorów o liczbie atomów węgla C_5-C_{12} zawiera co najmniej 95% substancji czynnej. Usuwanie tłuszczy lub substancji o charakterze tłuszczy można prowadzić przed ekstrakcją lub po ekstrakcji gryzeofulwiny z miceli. Taką surową gryzeofulwinę rozpuszcza się następnie w wymienionych rozpuszczalnikach, prawie do stanu nasycenia, a brunatno zabarwiony roztwór chromatografuje się na tlenku glinowym.

Zabarwiające substancje towarzyszące zostają przy tym znacznie zaadsorbowane. Jako eluat otrzymuje się bezbarwny roztwór, z którego przez zagęszczenie lub wytrącenie otrzymuje się prawie ilościowo czysto białą, krystaliczną gryzeofulwinę, która po oznaczeniu spektrofotometrycznym wykazuje 99–100% substancji czynnej. Z oczyszczonego roztworu można wytrącić gryzeofulwinę przez dodanie do niej 20–50% alifatycznego węglowodoru o liczbie atomów węgla C_5-C_{12} i następną destylację. Gryzeofulwina wskutek tego, że jest trudno rozpuszczalna w alifatycznych węglowodorach przy oddestylowaniu dwuchlorometanu krystalizuje w postaci jedwabistych miękkich igieł.

Poza tym stwierdzono, że gryzeofulwinę można wytrącić pomijając oddestylowanie rozpuszczalnika. W tym celu odtłuszczoną pozostałość poekstrakcyjną rozpuszcza się w dwuchlorometanie lub dwuchloroetanie, traktuje węglem aktywnym w ilości 10–30% w stosunku do oczyszczonej gryzeofulwiny, po czym przez dodanie węglowodoru alifatycznego, o liczbie atomów węgla C_5-C_{12} , o objętości 3–5 razy większej od objętości dwuchlorometanu lub dwuchloroetanu, wytrąca gryzeofulwinę. Sposób ten ze względu na swoją prostotę nadaje się do przemysłowego zastosowania i prowadzi do otrzymania czysto białej, krystalicznej gryzeofulwiny.

Poniższe przykłady wyjaśniają bliżej sposób według wynalazku.

Przykład I. Z 50 litrów roztworu kultury o zawartości 3000 mg/l gryzeofulwiny otrzymano przez odciągnięcie na materiale filtracyjnym, takim jak ziemia okrzemkowa 12,0 kg wilgotnej miceli, z której po wysuszeniu otrzymano 6,1 kg suchej miceli. Przesącz kultury oddzielony od miceli zawierał jeszcze 8% gryzeofulwiny. Suchą micelę zmielono a następnie całkowicie odtłuszczono za pomocą benzyny w aparacie ekstrakcyjnym pracującym w sposób ciągły. Następnie suchą micelę uwolnioną od benzyny ekstrahowano w sposób ciągły za pomocą dwuchlorometanu. W 19,4 litrach wyciągu znajdowało się według oznaczenia spek-

trofotometrycznego 136,5 g gryzeofulwiny. Wyciąg zagęszczony do 2 litrów chromatografowano w kolumnie zawierającej 30 g tlenku glinu, o średnicy 2,5 cm. Z bezbarwnego eluatu oddestylowano całkowicie dwuchlorometan, po uprzednim dodaniu 1 litra ciężkiej benzyny o temperaturze wrzenia 150°C. Z ługu macierzystego zawierającego ciężką benzynę wytrąciło się 121 g (= 80,5 % w odniesieniu do zawartości roztworu kultury) czysto białej gryzeofulwiny o temperaturze topnienia 220—221°. Zawartość 99,9% gryzeofulwiny.

Przykład II. 1 kg zmielonej suchej miceli o zawartości 22,5 g gryzeofulwiny i zawartości 12% tłuszczu, mieszano w ciągu 5 minut z 3 litrami dwuchlorometanu, wyciąg oddzielono od miceli na drodze sączenia ciśnieniowego, a micelę przemyciło 1 litrem dwuchlorometanu. Wyciąg dwuchlorometanowy zagęszczono do 500 ml, dodano 200 ml ciężkiej benzyny o temperaturze wrzenia około 150°, i całkowicie oddestylowano dwuchlorometan. Surową gryzeofulwinę wydzielającą się przy tym z roztworu ciężkiej benzyny odsączono i odłuszczone benzynę. Otrzymano 21,8 g gryzeofulwiny o temperaturze topnienia 218—221° i zawartości substancji czynnej 96%.

Surowy produkt rozpuszczono w 200 ml dwuchlorometanu a roztwór przefiltrowano przez warstwę filtracyjną, która składała się z 5 g mieszaniny tlenku glinu i węgla aktywowanego w stosunku 1:1 i której średnica wynosiła 1 cm. Z bezbarwnego przesączu po oddestylowaniu rozpuszczalnika otrzymano 20,5 g gryzeofulwiny (= 91% zawartości oznaczonej w suchej miceli) o temperaturze topnienia 220—221° i zawartości powyżej 99% substancji czynnej.

Przykład III. 20 kg suchej miceli o zawartości 0,690 kg gryzeofulwiny i 13% substancji o charakterze tłuszczowym, ekstrahowano w zamkniętym urządzeniu w sposób ciągły za pomocą 73,0 kg dwuchlorometanu o temperaturze wrzenia $760 = 39-42^{\circ}\text{C}$ $d_{20} = 1,322$), w ciągu 5 godzin.

Wyciąg odparowano do sucha a otrzymane kryształy odłuszczone za pomocą benzyny o temperaturze wrzenia (80—110°C $d_{20} = 0,720$) a następnie suszono. Otrzymano 0,690 kg surowej gryzeofulwiny o zawartości 92% substancji czynnej. Surowy produkt rozpuszczono w 11,0 kg dwuchlorometanu traktowano 0,160 kg węgla aktywnego i odsączono. Z bezbarwnego roztworu bez oddestylowania dwuchloroetanu wytrącono gryzeofulwinę za pomocą

24,0 kg benzyny. Produkt przemyciło tym samym rozpuszczalnikiem i suszono.

Otrzymano 0,620 kg czysto białej, krystalicznej gryzeofulwiny (= 90% substancji czynnej zawartej w suchej miceli) o zawartości 99,4% substancji czynnej i temperaturze topnienia 220—221°C.

Przykład IV. 1 kg suchej miceli o zawartości 29 g gryzeofulwiny, ekstrahowano w sposób ciągły za pomocą 3 litrów 1,2-dwuchloroetanu. Po usunięciu rozpuszczalnika i odłuszczeniu pozostałości poekstrakcyjnej otrzymano 28 g surowej gryzeofulwiny o zawartości 95%. Tę surową gryzeofulwinę rozpuszczono w 400 ml 1,2-dwuchloroetanu, odsączono i chromatografowano na kolumnie z tlenkiem glinu, która zawierała 12 g tlenku glinu w warstwie o grubości 4 cm. Z bezbarwnego eluatu otrzymano 26 g czysto białej, krystalicznej gryzeofulwiny o temperaturze topnienia 220—221° i zawartości powyżej 99% gryzeofulwiny, co odpowiada wydajności 89% w odniesieniu do zawartości substancji czynnej w suchej miceli.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania czystej gryzeofulwiny na drodze ekstrakcji miceli zawierającej gryzeofulwinę i następne oczyszczanie wyciągu za pomocą tlenku glinu lub węgla aktywnego, **znamienny** tym, że jako środek do ekstrakcji stosuje się dwuchlorometan lub 1,2-dwuchloroetan a micelę przed ekstrakcją lub pozostałość otrzymaną po odpędzeniu rozpuszczalnika z wyciągu odłuszcza się za pomocą węglowodorów alifatycznych o liczbie atomów C_5-C_{12} a wyciąg z surowej gryzeofulwiny uzyskany z odłuszczonej miceli, względnie surową gryzeofulwinę uzyskaną po odłuszczeniu pozostałości poekstrakcyjnej, po uprzednim rozpuszczeniu w dwuchlorometanie lub dwuchloroetanem traktuje się tlenkiem glinu lub węglem aktywnym, po czym z uzyskanego oczyszczonego roztworu wydziela się gryzeofulwinę przez zagęszczenie roztworu albo wytrąca ją za pomocą węglowodorów alifatycznych o liczbie atomów węgla C_5-C_{12} , przy czym jeśli dodatek węglowodorów wynosi 20—50% ilości oczyszczonego roztworu, wówczas dodatkowo oddestylowuje się dwuchlorometan lub dwuchloroetan, a gdy dodatek ten stosuje się w objętości 3—5 razy większej od objętości roztworu, wówczas gryzeofulwinę wytrąca się bez potrzeby oddestylowywania dwuchlorometanu lub dwuchloroetanu.