

229596

3.



P.- 14.685.-

A 18.937 Case 15690 YJR

229596

8. III 1958

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

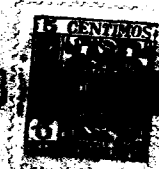
a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN METODO DE REFINACION DE TETRACICLINA"

= O = O = O = O = O = O = O = O = O = O = O = O = O = O = O = O =

Esta invención se refiere a la refinación o la purificación de la tetraciclina. Más particularmente, la presente invención se refiere a un proceso de recuperación mejorado para la extracción de tetraciclina de mostos de fermentación o de sólidos que contienen tetraciclina en asociación con impurezas de fermentación.

5



229596

Se han encontrado considerables dificultades para desarrollar procesos de refinación practicable comercialmente para la recuperación de tetraciclina de mostos de fermentación. Podría suponerse por las semejanzas estructurales que existen entre la clorotetraciclina y la tetraciclina que los procedimientos de purificación que son satisfactorios para la refinación de la clorotetraciclina lo serían también para la refinación de la tetraciclina. Contrariamente a lo esperado, sin embargo, esto no ha resultado ser siempre así. Cuando la tetraciclina se recupera por uno de los mejores procedimientos desarrollados para la recuperación de la clorotetraciclina, es decir, por el procedimiento descrito en la patente americana número 2.655.535, de Pidacks y colaboradores, que implica la extracción de la clorotetraciclina del mosto de fermentación con butanol normal a un pH de 1,3 aproximadamente, seguida de la concentración del extracto de butanol y la recuperación de la clorotetraciclina del mismo en forma de sal ácida, se ha visto que se obtienen recuperaciones muy bajas, del orden del 20%, de productos muy malos. Al parecer, esto se debe a que en la recuperación de la tetraciclina del extracto de butanol ácido, se produce una gran degradación de la tetraciclina y la formación de impurezas muy coloreadas que se recuperan junto con la tetraciclina. Por consiguiente, el proceso de Pidacks y colaboradores no se puede usar para la refinación de la tetraciclina.

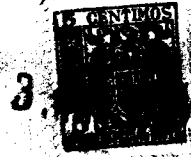
Esencialmente, la presente invención comprende una

229596

extracción por disolvente de la tetraciclina de soluciones acuosas tales como mostos de fermentación, o de sólidos que contienen tetraciclina en asociación con impurezas de fermentación, por el uso de un disolvente orgánico, tal como butanol normal o metil-isobutil-cetona, por ejemplo, en presencia de un compuesto de amonio cuaternario según se describe más adelante. La tetraciclina se disuelve en la fase disolvente orgánica y puede aislarse de ella por cualquiera de los diversos procedimientos que se enumeran más detalladamente a continuación para producir altos rendimientos de tetraciclina de calidad farmacéutica.

La presente invención se realiza preferiblemente ajustando primero el mosto de fermentación a un pH de 0,5 a 3,0 y, preferiblemente, de 1 a 2, para solubilizar la tetraciclina puesto que toda ella no está disuelta en el mosto fermentado. Para este fin se puede emplear cualquier ácido mineral fuerte, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. El mosto acidificado se filtra después para separar la tetraciclina solubilizada. Como una parte considerable de la actividad queda en la torta de filtración, se recupera aquella extrayendo la torta con agua acidificada a un pH de aproximadamente 2,0. Los filtrados se juntan luego para seguirlos tratando.

Es necesario ajustar la concentración del calcio en el mosto o la del filtrado antes de extraer la tetraciclina con el disolvente orgánico. Se ha visto que la cantidad de calcio en el sistema es bastante crítica. Ordinariamente, el calcio debe separarse para evitar la formación de



229596

un pesado precipitado de tetraciclina durante la operación de extracción el cual no es fácilmente disuelto por el disolvente. Por otra parte, no se puede extraer tetraciclina pura en el disolvente orgánico si no hay presentes iones de calcio. Al parecer, se forma un complejo de ión calcio, tetraciclina y compuesto de amonio cuaternario que se extrae fácilmente en la fase disolvente. Afortunadamente, hemos descubierto que las cantidades excesivas de iones de calcio se pueden separar del sistema por precipitación en forma de oxalato calcio sin que se separe, sin embargo, demasiado calcio. Parece ser que la solubilidad del oxalato calcio en las condiciones del proceso es tal que queda en solución bastante calcio para formar el complejo soluble en el disolvente orgánico y que se obtiene una extracción mucho mejor que la que se produciría si se quitase todo el calcio. El exceso de calcio se separa añadiendo ácido oxálico u oxalato amónico bien directamente en el mosto o en el filtrado del mosto o bien en la solución acuosa de la cual se desea extraer la tetraciclina.

El filtrado ácido descalcificado se mezcla después con una cantidad apropiada de un compuesto de amonio cuaternario, esto es, con un haluro de alquil-trimetil-amonio o un haluro de dialquil-dimetil-amonio, y un disolvente orgánico tal como butanol normal, o preferiblemente metil-isobutil-cetona, y el pH del filtrado se ajusta dentro de la zona de pH de 8 a 12 y preferiblemente de 9 a 10, por la adición de hidróxido sódico. La tetraciclina pasa de la

3.11  
229596

fase acuosa a la fase disolvente. La distribución de la tetraciclina se realiza preferentemente en el disolvente orgánico, de manera que un pequeño volumen de disolvente con respecto al volumen acuoso basta para el traslado completo. En general, hemos hallado que se puede usar satisfactoriamente una cantidad de disolvente orgánico comprendida entre alrededor de 5% y alrededor de 50%. Preferiblemente, se usa de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, pero el límite superior viene fijado únicamente por consideraciones de coste. La fase disolvente que contiene la tetraciclina se separa luego de la fase acuosa que contiene las impurezas de fermentación por medios corrientes.

Se pueden usar diversos disolventes orgánicos en la operación de extracción. Son disolventes preferidos los alcoholes alifáticos inferiores que no son miscibles con el agua tales como butanol, alcohol amílico, etc., también podemos usar disolventes tales como el cloroformo. En general, los disolventes preferidos son orgánicos, polares e inmiscibles con el agua. La metil-isobutil-cetona es un disolvente muy preferido puesto que se ha visto que es extremadamente selectiva en su facultad para extraer la tetraciclina del filtrado ácido acuoso y para dejar las impurezas en la fase acuosa.

Hemos encontrado que los compuestos de amonio cuaternario conocidos por el nombre de "Arquads" son particularmente eficaces como soportes para el proceso de extracción por disolventes que aquí se describe. Como se ha indicado anteriormente, estos compuestos son cloruros

229596

de alquil-trimetil-amonio o cloruros de dialquil-dimetil-amonio y se pueden representar por la fórmula  $R-N(CH_3)_3Cl$  o  $R,R'-N(CH_3)_2Cl$ , en las cuales R es un grupo de cadena larga que tiene por lo menos 8 átomos de carbono. R' puede ser un grupo alquilo que tenga de 2 a 20 átomos de carbono.

Estos compuestos de amonio cuaternario particulares son vendidos en el mercado por la Armour Company bajo la marca registrada de "Arquads". Existen diversos compuestos de esta clase que se diferencia en cuanto a la longitud y al número de grupos alquilo de cadena larga unidos al átomo de nitrógeno. En el cuadro siguiente se da una lista de algunos "Arquads" representativos existentes en el comercio y que pueden usarse ventajosamente en la realización de la presente invención:

Composición media de ingredientes activos de diversos Arquads (a)

Grupo sustituyente	Longitud de la cadena de carbono.	Arquad 12	Arquad 16	Arquad 18	Arquad 0	Arquad 8	Arquad 20	Arquad 2HT
Octilo	8	-	-	-	8%	-	8%	-
Decilo	10	-	-	-	9%	-	9%	-
Dodecilo	12	90%	-	-	47%	-	47%	-
Tetradecilo	14	9%	-	-	18%	-	18%	-
Hexadecilo	16	-	90%	6%	8%	10%	8%	30%
Octadecilo	18	-	6%	93%	5%	10%	10%	70%
Octadecenilo	18	1%	4%	1%	5%	35%	-	-
Octadecadienilo	18	-	-	-	-	45%	-	-



3.11

229596

(a) Los "Arquads" 2C y 2HT son cloruros de dialquil-dimetil-amonio. Todos los demás son cloruros de alquil-trimetil-amonio.

5 La composición que nosotros preferimos usar y con la cual hemos obtenido los mejores resultados es el "Arquad"16", que se tiene entendido que es un cloruro de monoalquil-trimetil-amonio en el que los grupos alquilo consisten en 90% de hexadecilo, 6% de octadecilo y 4% de octadecenilo. Por alguna razón desconocida, este compuesto cuaternario particular parece que es especialmente selectivo para dar un producto de tetraciclina más puro. La cantidad de los anteriores compuestos de amonio cuaternario que ha resultado ser útil en el proceso de extracción por disolventes descrito oscila entre aproximadamente medio mol de compuesto cuaternario por mol de tetraciclina y 3 moles de compuesto cuaternario por mol de tetraciclina.

10 El procedimiento de extracción por soporte descrito conduce a una excelente separación de la tetraciclina del mosto de fermentación. Aunque no es completamente seguro, es probable que la tetraciclina se encuentre realmente presente en la fase disolvente en forma de complejo ión de calcio-tetraciclina-Arquad puesto que, como se ha dicho antes, es necesaria una cantidad definida de ión de calcio para que se produzca la extracción y el "Arquad" actúa de lazo de unión para la tetraciclina de alguna manera desconocida con el fin de facilitar su traslado desde la fase acuosa a la fase disolvente.

229596

Después del procedimiento de extracción, el extracto de disolvente se puede tratar de diversos modos para aislar de él la tetraciclina. Uno de estos tratamientos implica la cristalización del clorhidrato de tetraciclina directamente por la adición de un alcohol inferior o un alcohol inferior de alcoxi inferior, por ejemplo, 2-etoxi-etanol, seguida de acidificación con ácido clorhídrico. Además de 2-etoxi-etanol se pueden usar en este procedimiento otros disolventes orgánicos tales como 2-propanol, butanol, etc.

Si se desea, se puede aislar tetraciclina neutra del extracto de disolvente por adición de agua y ajuste del pH dentro de la gama comprendida entre 3 y 7. El volumen de agua no es crítico, siendo satisfactoria una proporción de 5% a 50% del volumen de disolvente.

Otro procedimiento de aislamiento se describe en la solicitud de EE.UU. de Mendelsohn y colaboradores, número de serie 518.961, presentada el 29 de junio de 1.955. En pocas palabras, este proceso consiste en poner en contacto un extracto en disolvente orgánico de tetraciclina, por ejemplo, butanol normal, con agua acidulada a un pH de 1,5 a 2,5. Las dos fases se mezclan y se separan y la sal ácida de tetraciclina pasa a la fase acuosa. Este extracto en agua ácida se neutraliza luego mediante la adición de una base a un pH de 4 a 8 después de lo cual cristaliza de la solución tetraciclina neutra bruta.

Un procedimiento especialmente preferido para el

229596

aislamiento de tetraciclina del extracto en disolvente constituye el objeto de la solicitud co-pendiente de Smith, Mars y Muller solicitada al tiempo que ésta. Este proceso consiste en separar la tetraciclina del extracto en disolvente en forma de compuesto de tetraciclina y urea mediante la adición de una solución acuosa de urea. La mezcla se agita y el pH se ajusta dentro de la zona 2,5 a 6,0 mediante la adición de un ácido apropiado. El compuesto de tetraciclina y urea se separa por precipitación. El compuesto de tetraciclina y urea tiene una relación molar de tetraciclina a urea de uno a uno. El compuesto de tetraciclina y urea puede tratarse de diversos modos según se describe en la solicitud de EE.UU. antes mencionada con el fin de recuperar de él la tetraciclina.

Los cristales de antibiótico producidos por los anteriores procesos de aislamiento comprenden ordinariamente de 97 a 100% de tetraciclina pura neutra y se pueden transformar en clorhidrato de tetraciclina de calidad conforme a las especificaciones pertinentes por un sencillo proceso en una sola fase que consiste en formar un lodo o papilla de tetraciclina neutra con butanol, 2-etoxietanol y ácido clorhídrico.

La invención se describe más detalladamente en unión de los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO 1

Dos litros de mosto de tetraciclina que dió en el análisis 5100 gammas por mililitro se acidificaron con

229596

ácido sulfúrico al 25% a pH 1,8, se agitaron durante 40 minutos y se filtraron con ayuda de 200 gramos de "Hyflo Super-cel". Los sólidos se convirtieron en una papilla en 1,5 litros de agua a 45°C., se ajustaron a pH 1,85 con 2,5 mililitros de ácido sulfúrico al 25%, se agitaron durante 40 minutos y se filtraron. Los filtrados se juntaron, se trataron con 88,2 gramos de oxalato amónico, se agitaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente, se almacenaron a 4°C. durante 2 horas y se filtraron. La torta de filtración se lavó con 50 mililitros de agua para lograr la recuperación completa de la actividad. A los 2,97 litros de extracto acuoso, se añadieron 300 mililitros de metil-isobutil-cetona y 15 mililitros de cloruro de cetil-trimetil-amonio (Arquad 16) al 50% y la mezcla se ajustó a pH 8,8 por tratamiento con 23 mililitros de NaOH 18N. Después de agitar durante 20 minutos, se separaron las dos fases. La fase acuosa se trató con 100 mililitros de metil-isobutil-cetona, 5 mililitros de cloruro de cetil-trimetil-amonio (Arquad 16) al 50% y 2 mililitros de NaOH 18N para ajustar el pH a 8,8. La mezcla se agitó durante 20 minutos, se separó y la fase acuosa se extrajo con otra porción de 100 mililitros del mismo disolvente. Los extractos reunidos se agitaron con 40 mililitros de agua y el lavado acuoso se separó y se tiró. Se efectuó un segundo lavado con 40 mililitros de agua, usando hidróxido sódico para ajustar el pH a 11,5, antes de filtrar y separar. La solución en metil-isobutil-cetona

229596

lavada con agua se extrajo con 125 mililitros de agua, utilizando 5 mililitros de ácido clorhídrico concentrado para ajustar el pH a 1,6. Se realizaron dos extracciones más, cada una de ellas con 55 mililitros, añadiendo ácido para ajustar el pH a 1,6. Los extractos acuosos reunidos se lavaron dos veces agitándolos con 20 mililitros de cloroformo. Al extracto lavado se añadieron 3,5 mililitros de butanol y la mezcla se trató con 10 gramos de "Versene" (sal tetrasódica del ácido etileno-diamina-tetra-acético) al 80% para obtener un pH de 5,8. Después de envejecimiento durante 6 horas a la temperatura ambiente y 16 horas a 42°C., el producto se filtró, se lavó dos veces con 9 mililitros de "Versene" al 5%, se ajustó a pH 5,8 con HCl, se lavó dos veces con 5 mililitros de agua y se secó en el vacío a 40°C. Se obtuvo un rendimiento de 6,55 gramos de tetraciclina neutra que en el análisis dió 1032 gammas por milígramo.

#### EJEMPLO 2

Doscientos setenta y ocho litros de mosto de tetraciclina que dió en el análisis 4450 gammas por mililitro se ajustaron a pH 1,8 por la adición de ácido sulfúrico concentrado, se trataron con 1,8% (peso/volumen) de oxalato amónico y se filtraron mediante el uso de un auxiliar de la filtración (Hyflo). La torta de filtración se volvió a convertir en papailla en un volumen de agua a 45°C. mitad del volumen del mosto, se reajustó a pH 1,8 y se filtró. Los filtrados reunidos se trataron con 2,1 equiva-

229596

lentes de cloruro de cetil-trimetil-amonio (Arquad 16) (yo-  
mando como base el contenido de tetraciclina) y 12% (volumen/  
volumen) de metil-isobutil-cetona. La mezcla se ajustó a pH  
10 con solución de hidróxido sódico al 50%, se agitó duran-  
te 30 minutos y se dejó sedimentar durante 30 minutos, pa-  
sado cuyo tiempo la fase disolvente se decantó, se filtró  
y se lavó con 20% de su volumen de agua a pH 10. Una vez  
separada el agua, quedaron 32 litros de extracto. A 1 litro  
del extracto se añadieron 300 mililitros de 2-etoxi-etanol  
y 145 mililitros de ácido clorhídrico concentrado para ajus-  
tar el pH a 1,8. La mezcla resultante se envejeció con agi-  
tación durante 48 horas a la temperatura ambiente. Los cris-  
tales de clorhidrato de tetraciclina se filtraron, se lavaron  
con 0,5% (volumen/volumen) de disolvente nuevo de la misma  
composición que las aguas madres, luego con 60 mililitros de  
2-propanol y, finalmente, con 60 mililitros de éter. El pro-  
ducto se secó en vacío durante 4 horas a 50°C. para dar  
30,9 gramos de clorhidrato de tetraciclina crudo que en el  
análisis acusó 904 gammas por miligramo, lo que representa  
un rendimiento de 69,5% a partir del mosto.

### EJEMPLO 3

Una porción de 200 mililitros de extracto de metil-  
isobutil-cetona clarificado (preparado como en el Ejemplo 1)  
que daba 40.500 gammas por mililitros se trató con 32 mili-  
litros de solución acuosa saturada de urea y 32 mililitros  
de agua. Se añadió ácido clorhídrico concentrado para reba-  
jar el pH desde 9,0 a 5,5. La mezcla se colocó en un agitador

229596

rotatorio durante 16 horas, se ajustó el pH a 3,0 por  
nueva adición de ácido clorhídrico y se agitó durante  
otras 48 horas más. El producto que precipitó se filtró,  
se lavó con agua y se secó en el vacío a 50°C. Se obtuvo  
5 un rendimiento de 7,80 gramos de compuesto de tetraciclina  
y urea que en el análisis dió 938 gammas por miligrama,  
lo que representa 90,3% del rendimiento calculado.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América el 11 de Mayo de 1.956,  
10 bajo el número 584.169, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15 =O = O = . N O T A . = O = O =

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de  
20 Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1º.- Un método de refinación de tetraciclina que incluye la acidificación del mosto de fermentación para solubilizar la tetraciclina contenida en él, las operaciones que comprenden ajustar el contenido de ión de  
25 calcio con el fin de reducir la concentración del ión de calcio, añadirle un compuesto de amonio cuaternario elegido del grupo que forman los haluros de alquil-trimetil-

3. 61

229596

amonio y los haluros de dialquil-dimetil-amonio, ajustar el pH de la solución acuosa entre 8 y 12, extraer la tetraciclina de la solución acuosa con un disolvente orgánico y aislar después la tetraciclina del extracto de disolvente orgánico.

5

2º.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el disolvente orgánico es un alcohol alifático inferior.

3º.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el disolvente orgánico es el butanol.

10

4º.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el disolvente orgánico es una metil-alquil-cetona inmiscible con el agua.

5º.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico es la metil-isobutil-cetona.

15

6º.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto de amonio cuaternario es el cloruro de cetil-trimetil-amonio.

7º.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la tetraciclina se aísla del extracto de disolvente orgánico por contacto del extracto de disolvente con una solución acuosa de urea y separando luego el compuesto de tetraciclina y urea así formado del extracto de disolvente.

20

25

8º.- En un método de refinación de tetraciclina que incluye la acidificación del mosto de fermentación



229596

para solubilizar la tetraciclina contenida en él, las operaciones que comprenden ajustar el contenido de ión de calcio a un nivel correspondiente al de la solubilidad del oxalato cálcico, añadirle un compuesto de amonio cuaternario elegido del grupo que forman los haluros de alquil-trimetil-amonio y los haluros de dialquil-dimetil-amonio, 5 ajustar el pH de la solución acuosa entre 8 y 12 aproximadamente, extraer la tetraciclina de la solución acuosa con un disolvente orgánico y aislar después la tetraciclina del extracto de disolvente orgánico. 10

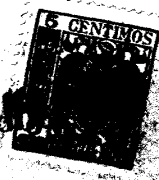
9º.- El método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el disolvente orgánico es el butanol.

10º.- El método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el disolvente orgánico es la metil-isobutil-cetona. 15

11º.- El método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el cloruro de amonio cuaternario es el cloruro de cetil-trimetil-amonio.

12º.- El método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que la tetraciclina se aísla del extracto de disolvente orgánico por contacto del extracto de disolvente con una solución acuosa de urea y separando luego el compuesto de tetraciclina y urea así formado del extracto de disolvente. 20

13º.- Un método de refinación de tetraciclina. Tal y como se ha descrito en la Memoria que 25



229596

antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de quince hojas y la presente, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 3. III 1956

P. A.  
Alberto de Elzaburu  
*[Handwritten signature]*