

**AÑO** 1957

**Expediente núm.** .....

**239132**



**239132**

# **REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

**PATENTE DE INVENCIÓN**

## **MEMORIA DESCRIPTIVA**

*que se acompaña a la solicitud de*

una **PATENTE DE INVENCIÓN** por **VEINTE** años, en España

*a favor de*

**AMERICAN CYANAMID COMPANY,** de nacionalidad  
norteamericana domiciliado en **30 Rockefeller Plaza,**  
~~antes~~ Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América.

*por:*

**UN PROCEDIMIENTO DE EXTRAER ANTIBIOTICOS DE CLOROTETRACICLINA Y/O TETRACICLINA".**

**Nº 4986**

Agente Sr. **ELZABURU**



239132

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 PROCEDIMIENTO DE EXTRAER ANTIBIOTICOS DE CLOROTETRACICLINA  
Y/O TETRACICLINA"

---

Este invento se refiere a la extraccion de antibióticos  
de clorotetraciclina y/o tetraciclina a partir de mostos de  
fermentación que los contengan.

5 Se ha propuesto en el pasado extraer la clorotetraciclina  
a partir de líquidos de fermentación mediante un procedimiento  
que comprende la acidificación del caldo para solubilizar la  
clorotetraciclina seguida de la separación de los micelios só-  
lidos por filtración y extracción de la clorotetraciclina del  
filtrado con un disolvente orgánico y un agente de actividad

239132



superficial. El proceso de extracción que utiliza disolventes orgánicos se ha aplicado hasta ahora solamente a los filtrados que contienen actividad y no a los propios mostos de fermentación.

5 Hasta ahora no se ha considerado posible extraer directamente la clorotetraciclina del mosto porque se pensó que los micelios sólidos actuaban de algún modo reteniendo la clorotetraciclina y evitando así su fácil extracción por medio de disolventes. Por consiguiente, todos los procedimientos antiguos han  
10 filtrado invariablemente el mosto obteniendo un filtrado que contiene actividad antes de efectuar una extracción de la clorotetraciclina.

Consideraciones análogas se aplican a la extracción de tetraciclina de mostos que contengan tetraciclina y asimismo a la  
15 extracción de ambos antibióticos juntos a partir del mismo mosto, puesto que es sabido que se producen ambos, clorotetraciclina y tetraciclina, en una fermentación con S. aureofaciens.

El presente invento se refiere a una simplificación de los procedimientos antiguos mediante la cual se ha descubierto  
20 ahora que en determinadas condiciones es posible extraer clorotetraciclina y/o tetraciclina directamente a partir del mosto sin tener que filtrarlo para separar los micelios sólidos tal como se creyó necesario hasta ahora.

De acuerdo con el invento, se crea un procedimiento de extracción de antibióticos clorotetraciclina y/o tetraciclina a  
25 partir del mosto de fermentación que los contenga, que comprende:

(1) Acidificación del mosto a un pH entre unos 0,5-2,5 para solubilizar los antibióticos contenidos en él.

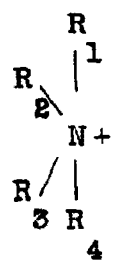
(2) Ajuste del contenido en ion calcio y magnesio del mosto  
30 entre unos 10 y 45 mg por gramo de antibiótico en el mosto.

(3) Adición al mismo de un compuesto de amonio cuaterna-



239132

rio que tenga la fórmula:



5

En la que R<sub>1</sub> es un radical alquilo inferior o bencilo, R<sub>2</sub> es una cadena grasa larga, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son radicales alquilo inferiores, y R<sub>1</sub> y R<sub>4</sub> cuando se consideran juntos representan una cadena carbonada divalente de 2 a 5 átomos de carbono.

10

(4) Ajuste del pH del mosto entre unos 5,5 y 11, y

(5) Adición de un disolvente orgánico polar, inmiscible en agua, para extraer los antibióticos del mosto tratado.

15

Una ventaja del invento además de la extracción directa de los antibióticos del mosto, es que pueden obtenerse rendimientos aumentados, que ascienden al 10% de aumento o más, sobre la extracción de clorotetraciclina y/o tetraciclina a partir del filtrado que contiene la actividad. Este aumento en el rendimiento es debido, en parte, a la eliminación del tratamiento ácido en caliente de la torta filtrada que era necesario en los procedimientos antiguos para separar la actividad de la torta y que provocaba siempre alguna destrucción de la actividad. El presente invento por tanto, no solo ventajoso económicamente puesto que evita una fase de la práctica antigua que se pensaba hasta ahora que era esencial, sino que al mismo tiempo es fácil de realizar y da lugar a rendimientos elevados de material puro, rendimientos mejores, en efecto, que los que se obtienen ordinariamente cuando la clorotetraciclina o tetraciclina se extrae del filtrado acidulado.

20

25

30

239132

Una ventaja del presente invento reside en el hecho de que evita la necesidad de manejar grandes volúmenes de agua que eran necesarios en los procedimientos antiguos. Con objeto de extraer la actividad máxima de un filtrado acuoso es necesario emplear dos volúmenes y medio de agua sobre el volumen de mosto e incluso esto no produce la extracción completa. En las fermentaciones en gran escala puede observarse que supone una enorme carga para la recuperación de la clorotetraciclina o tetraciclina a partir de un filtrado acuoso semejante.

Otra ventaja más del presente invento es que produce rendimientos elevados de material esencialmente puro, de calidad farmacéutica, esto es, de una pureza de 95-97%. La pureza aumentada puede resultar del tratamiento con un agente reductor según se describe con más detalle en lo que sigue. La clorotetraciclina y tetraciclina producida por los procedimientos antiguos precisa ordinariamente dos recristalizaciones en butanol ácido para que cumpla las normas de especificación.

Una ventaja más de la clorotetraciclina pura producida mediante este invento es que puede reducirse a tetraciclina directamente sin más procedimientos de recristalización o purificación.

Para realizar el invento aplicándolo a la extracción de clorotetraciclina a partir de un mosto que contenga clorotetraciclina, la primera fase es acidular el mosto para solubilizar la clorotetraciclina contenida en él. El mosto se acidula hasta un pH de aproximadamente 0,5 a 2,5, y de preferencia hasta un pH de 1,3-1,4 con cualquier ácido mineral fuerte como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o análogos. Este tratamiento ácido se realiza a temperatura ambiente. El mosto acidulado se agita durante un breve período de tiempo para solubilizar

239132 246



la clorotetraciclina y, a continuación, se añade una cantidad de-  
terminada de ácido oxálico u oxalato amónico para ajustar el con-  
tenido en ion calcio y magnesio del mosto hasta un nivel predeter-  
minado. En relación con esto, se ha encontrado que el proceso de  
5 extracción con vehículo que se está describiendo no resulta bien  
para la extracción de clorotetraciclina del mosto a menos que el  
contenido en ion calcio y magnesio del mosto se ajuste a un nivel  
muy definido. Se ha encontrado que si el contenido ion calcio y  
magnesio del mosto se ajusta entre unos 10 mg a 45 mg por gramo  
10 de clorotetraciclina presente en el mosto, puede obtenerse una  
extracción satisfactoria de la actividad del mosto. Si se dejan  
en el mosto cantidades de estos iones muy por encima o por deba-  
jo de esta cantidad, tiene lugar una extracción ineficaz de la  
actividad.

15 No está completamente claro el por qué de esto, aunque se  
ha observado que no puede extraerse en el disolvente orgánico  
clorotetraciclina pura si se hallan ausentes los iones calcio y  
si está presente demasiado ion calcio en la masa o mosto se for-  
ma un precipitado denso de clorotetraciclina durante la fase de  
20 extracción que no se disuelve fácilmente por el disolvente orgá-  
nico. Sin embargo, según se indicó anteriormente, cuando el con-  
tenido en ion calcio y magnesio de la masa se ajusta dentro de  
los límites anteriormente indicados, la extracción de la cloro-  
tetraciclina por el disolvente orgánico tiene lugar fácilmente  
25 y produce buenos rendimientos de material puro.

Una vez que se ha completado la precipitación de la canti-  
dad deseada de ion, con objeto de ajustar el contenido en calcio  
y magnesio de la masa hasta el grado adecuado, se le añade a la  
masa descalcificada una cantidad adecuada de un compuesto de amo-  
nio cuaternario según se describirá más en particular en lo que  
30

- 5 -

24 DIC



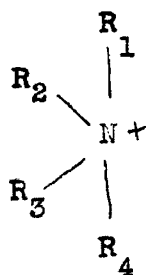
239132

sigue. En general, la cantidad de compuesto de amonio cuaternario puede oscilar desde aproximadamente medio mol de compuesto cuaternario por mol de clorotetraciclina a unos tres molés de compuesto cuaternario por mol de clorotetraciclina. La masa se agita a continuación y el pH de la misma se ajusta a un pH entre 5,5 y 11 y, preferentemente, alrededor de 8,4-8,6, con hidróxido sódico. Se añade entonces a la mezcla con agitación un disolvente orgánico, preferentemente un 10% del volumen de la masa o más. Puede utilizarse hasta 50% o más de disolvente pero no se ha encontrado ninguna ventaja especial con cantidades mayores y en proporciones superiores resulta antieconómico. La mezcla se agita y se filtra, preferentemente por medio de un auxiliar de filtración como la tierra de diatomeas. La clorotetraciclina pasa a la fase disolvente y el filtrado se deja estar hasta que las dos fases se separan y la fase disolvente se decanta a continuación. La torta filtrada se pone en suspensión con nuevo disolvente y se filtra otra vez y los dos extractos de disolvente se reúnan para el tratamiento posterior.

En la fase de extracción puede utilizarse una gran variedad de disolventes orgánicos polares insolubles en agua. Entre los disolventes que pueden emplearse se incluyen el butanol y similares. Son disolventes preferidos las metil-alquil-cetonas, como por ejemplo metil-butil-cetona, metil-propil-cetona, etc. Se han obtenido resultados especialmente buenos con metil-isobutil-cetona, puesto que este disolvente se ha encontrado que es muy selectivo en su capacidad de extracción de clorotetraciclina de la masa y de eliminación de las impurezas.

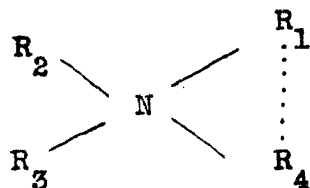
Los compuestos de amonio cuaternario que son de utilidad como portadores en el proceso de extracción con disolventes aquí descrito pueden representarse por la siguiente fórmula general:

239132



5 en la que  $R_1$  es un radical alquilo inferior o bencilo,  $R_2$  es una cadena <sup>1</sup>grasa larga, por lo menos de 8 átomos de carbono,  $R_3$  es un radical alquilo inferior,  $R_4$  es un radical alquilo inferior, y cuando  $R_1$  y  $R_4$  se consideran juntos representan una cadena carbonada <sup>1</sup>divalente <sup>4</sup>de 2 a 5 átomos de carbono. Así, el

10 nitrógeno puede formar parte del anillo heterocíclico como en los compuestos del tipo de la Onamine RO, como los representados a continuación:



15 en donde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  tienen el significado indicado anteriormente.

20 Los compuestos de amonio cuaternario conocidos como "Arquads" son portadores especialmente eficaces en el proceso de extracción con disolventes aquí descrito. Estos compuestos son principalmente cloruros de alquiltrimetilamonio y pueden representarse por la fórmula  $R-N(CH_3)_3 Cl$  en la que R es un grupo alquilo de cadena larga que tenga por lo menos 8 átomos de carbono.

25 Estos compuestos de amonio cuaternario particulares se venden por la Armour and Company con el nombre comercial de "Arquads". Se halla disponible una gran variedad de compuestos de

- 8 - 239132



este tipo en los que varía la longitud y número de grupos alquilo de cadena larga unidos al átomo de nitrógeno. A continuación se relacionan algunos "Arquads" representativos que se hallan disponibles comercialmente y que pueden utilizarse con ventaja en la realización del presente invento.

COMPOSICION MEDIA DE INGREDIENTES ACTIVOS "ARQUADS"

Grupos sustituyentes	Longitud de la cadena carbonada	Arquad 12	Arquad 16	Arquad 18
Octilo	8	-	-	-
Decilo	10	-	-	-
Dodecilo	12	90%	-	-
Tetradecilo	14	9%	-	-
Hexadecilo	16	-	90%	6%
Octadecilo	18	-	6%	93%
Octadecenilo	18	1%	4%	1%
Octadecandienilo	18	-	-	-

COMPOSICION MEDIA DE INGREDIENTES ACTIVOS "ARQUADS"

Grupos sustituyentes	Longitud de la cadena carbonada	Arquad C	Arquad S	Arquad 2C	Arquad 2HT
Octilo	8	8%	-	8%	-
Decilo	10	9%	-	9%	-
Dodecilo	12	47%	-	47%	-
Tetradecilo	14	18%	-	18%	-
Hexadecilo	16	8%	10%	8%	30%
Octadecilo	18	5%	10%	10%	70%
Octadecenilo	18	5%	35%	-	-
Octadecandienilo	18	-	45%	-	-

239132

2401



5 El Arquad 16, que se considera que es un cloruro de alquil-trimetil amonio de cadena larga en el que los grupos alquilo constan de 90% de hexadecilo, 6% de octadecilo y 4% de octadecenilo, se prefiere en particular puesto que parece ser peculiarmente selectivo para producir un producto más puro de clorotetraciclina.

Otro compuesto de amonio cuaternario que es un portador de utilidad en este proceso es el producto conocido como "Onamine RO" que se vende por la Onyx Oil And Chemical Company.

10 Se considera que es un derivado de imidazolina sustituido soluble en aceite que contiene una cadena grasa larga en combinación con grupos amino e hidroxilo.

15 A continuación del proceso de extracción descrito, la clorotetraciclina puede recuperarse del extracto disolvente mediante una serie de procedimientos. Un método preferido es la acidificación directa para recuperar la clorotetraciclina como sal de un ácido mineral, esto es, el clorhidrato. Con objeto de efectuar este procedimiento de aislamiento, al extracto disolvente preparado según se describió en lo anterior se  
20 le añaden unos 5ml de agua por cada gramo de clorotetraciclina presente en la masa. La mezcla se acidula a continuación con ácido clorhídrico concentrado hasta un pH alrededor de 0,4-0,5. Después de agitar durante 18-24 horas para dejar que tenga lugar la cristalización, los cristales de clorhidrato de clorotetraciclina se filtran, se lavan con agua, se lavan con un  
25 Alcoxi inferior)-alcohol inferior, por ejemplo 2-etoxietanol, y a continuación con un alcohol inferior, por ejemplo isopropanol, y a continuación se seca en vacío.

30 Los productos obtenidos mediante el proceso de extracción con disolvente antes descrito son, generalmente, de calidad superior por todos conceptos, excepto en su aspecto visual.

- 9 -

239132

24



5      Aparentemente, algunas de las impurezas coloreadas que normalmente se separarían por filtración de la masa acidulada se arrastran conjuntamente en este proceso y le comunican un aspecto grisáceo o pardo al producto cristalino. Esta dificultad que surge como resultado de la extracción directa de la masa puede eliminarse fácilmente por tratamiento del extracto en el disolvente con un agente reductor como el hidrosulfito sódico. Se prefiere realizar este tratamiento en condiciones ácidas. Por tanto, el extracto en metil-isobutil-cetona, después de la adición de agua, se  
10     ajusta a un pH entre 1 y 4, aproximadamente, y de preferencia alrededor de 1,8 con ácido sulfúrico. Es esencial que esta acidificación se realice con un ácido que no provoque la cristalización prematura del producto. El hidrosulfito sódico se agrega entonces en una proporción de unos 0,3 a 0,6 gramos por 100 ml. Esta  
15     proporción es bastante crítica puesto que un exceso tiende a provocar una coloración parda en el producto final. La mezcla tratada se agita a continuación enérgicamente durante un breve periodo de tiempo antes del nuevo tratamiento. A continuación se efectúa una acidificación hasta un pH alrededor de 0,5 mediante la  
20     adición de ácido clorhídrico concentrado. Entonces se añaden aproximadamente 0,5 gramos de cloruro sódico por 100 ml de extracto de metil-isobutil-cetona para compensar la falta de ion cloruro existente a causa de la acidificación preliminar con ácido sulfúrico. La mezcla se abandona algún tiempo y los cristales se recogen según se describió anteriormente en relación con la fase de  
25     aislamiento.

El invento no está limitado al hidrosulfito sódico como agente reductor pudiendo utilizarse otros agentes reductores como por ejemplo dióxido de azufre, sulfito sódico etc.

30     Los procesos de extracción y aislamiento descritos ante-



239132

riormente en relación con masas que contengan clorotetraciclina pueden aplicarse sin cambio sustancial a la recuperación de tetraciclina a partir de masas que contengan tetraciclina, así como en la recuperación de ambos antibióticos a partir de la misma masa. Las condiciones generales de la extracción, esto es, pH, proporción de disolvente, cantidades de portador, etc. se ha encontrado que, en general, son esencialmente análogas a las descritas con detalle en relación con la extracción de clorotetraciclina directamente de la masa.

Se ha encontrado, sin embargo, que mientras la clorotetraciclina, producida por extracción directa de la masa precisa un tratamiento con agente reductor con objeto de conseguir un producto de un aspecto visual satisfactorio, dicho tratamiento no es necesario en el caso de la tetraciclina. El proceso de extracción directa de la tetraciclina de la masa cuando se realiza en las condiciones de operación preferidas, anteriormente descritas, produce en general un producto de aspecto visual satisfactorio sin tratamiento con un agente reductor. Se ha encontrado que esto es particularmente cierto cuando la masa se somete a tratamiento poco después de la recogida y no se deja estar durante un periodo de tiempo considerable antes de la extracción.

La tetraciclina puede aislarse del extracto en disolvente por acidificación directa recuperando el clorhidrato de tetraciclina esencialmente del mismo modo que se ha descrito refiriéndose al método preferido de recuperación de clorotetraciclina a partir del extracto en el disolvente. Además, la tetraciclina puede aislarse como base libre poniendo en contacto el extracto de tetraciclina en metil-alquil-cetona con agua acidulada a un pH en el intervalo de 1,5 a 2,0, separando la fase

239132

2415



✓ acuosa resultante que contiene la tetraciclina de la fase disolvente, ajustando el pH de la fase acuosa en el intervalo de 2 a 4 y recuperando la tetraciclina neutra por cristalización de la fase acuosa. Este proceso que se describe más en particular y se reivindica en la solicitud Patente española n° 236.407 es particularmente ventajoso para la obtención de productos de un color superior.

5  
10  
15  
Otro procedimiento para aislar la tetraciclina del extracto en el disolvente, y que puede utilizarse ventajosamente aquí supone el contacto del extracto en el disolvente con urea acuosa y la separación de la tetraciclina en forma de compuesto de tetraciclina-urea del que puede regenerarse con facilidad la tetraciclina pura. El proceso, que es el objeto principal de la solicitud de Patente española n° 232.357 permite un camino excelente de aislamiento de tetraciclina a partir del extracto en el disolvente.

20  
Los cristales de antibiótico producidos por medio del proceso de aislamiento anterior contienen ordinariamente de 97 a 100% de tetraciclina neutra pura y pueden convertirse en clorhidrato de tetraciclina de calidad de las especificaciones mediante un proceso sencillo en una fase que supone la suspensión de la tetraciclina neutra con butanol, 2-etoxietanol y ácido clorhídrico.

25  
El invento se describirá con más detalle en relación con los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO I.

EXTRACCION DE CLOROTETRACICLINA DIRECTAMENTE DE LA MASA .

30  
Una porción de 3 Kg de masa de clorotetraciclina que da un ensayo de 5.000 gammas por ml se ajusta a un pH 1,4 por adición de ácido sulfúrico al 25%. Después de agitar durante 30 minutos,

239.32

24



se añaden 75 g de oxalato amónico monohidratado y la mezcla se agita durante 45 minutos. A la mezcla se le añaden 54 ml de Arquad 16 en forma de solución en isopropanol a 50%, y el pH se ajusta a 8,5 con hidróxido sódico al 25%. La masa se extrae a continuación agitando enérgicamente durante 20 minutos con 600 ml de metil-isobutil-cetona. A la mezcla se le añaden 120 g de Hyflo y la mezcla se filtra. El filtrado se deja sedimentar durante 3 horas al cabo de las cuales se separa la fase disolvente. La torta filtrada se vuelve a poner en suspensión en 450 ml de metil-isobutil-cetona, se filtra y se lava con 50 ml de metil-isobutil-cetona. Los extractos en el disolvente se combinan dando un volumen total de 980 ml que dan un ensayo de 16.000 gammas por ml lo que representa una recuperación de 90,2%

#### EJEMPLO II

#### RECUPERACION DE CLORHIDRATO DE CLOROTETRACICLINA.

A 654 ml de extracto en metil-isobutil-cetona preparado como en el ejemplo I que da un ensayo de 16.000 gammas por ml, se le añaden 65 ml de agua y el pH se ajusta a 0,5 por adición de 8 ml de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 17 horas, después de lo cual los cristales resultantes se filtran, se lavan con 15 ml cada vez de agua, 2-etoxietanol e isopropanol y se seca a vacío a 40°C durante 16 horas. Se obtiene un rendimiento de 9,74 g de clorhidrato de clorotetraciclina que da un ensayo de 987 gammas por mg, lo que representa un rendimiento total del 82% de la masa. El producto, que es de aspecto pardo, algo verdoso tiene una  $\frac{1}{\text{cm}}$  de 0,13 a 460 milimicras.



239132

EJEMPLO III

TRATAMIENTO CON AGENTE REDUCTOR.

A 100 ml de extracto en metil-isobutil-cetona, preparado como en el ejemplo I que dá un ensayo de 17.800 gammas por ml, se le añaden 15 ml de agua y el pH se ajusta a 1,8 con ácido sulfúrico al 25%. A la mezcla se le añaden 0,3 g de hidrosulfito sódico y la mezcla se agita energicamente durante 10 minutos, después de lo cual el pH se ajusta a 0,5 con ácido clorhídrico concentrado. Para suministrar más iones cloruro se añaden 0,5 g de cloruro sódico. La mezcla se agita durante 20 horas, se filtra, se lava con agua, 2-etoxietanol e isopropanol y se seca en vacío. Se obtiene un rendimiento de 1,68 g de clorhidrato de clorotetraciclina que dá un ensayo de 973 gammas por mg, lo que representa un rendimiento de esta etapa de 92%. El producto, que es de aspecto amarillo brillante, tiene una  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  de 0,22 a 460 milimicras.

EJEMPLO IV

EXTRACCION DE TETRACICLINA DIRECTAMENTE DE LA MASA .

A 2 litros de masa de tetraciclina que dá un ensayo de 6.200 gammas por ml se le añaden 40 g de ácido oxálico para ajustar el pH a 1,5 y la mezcla se agita durante 30 minutos. Referido a la potencia de la masa, se añaden 24 ml (un equivalente) de Arquad 16 en forma de solución al 50% en isopropanol. Después de agitarlo durante 15 minutos se añaden 400 ml de metil-isobutil-cetona y el pH se ajusta a 9,5 con hidróxido sódico. La mezcla se agita energicamente durante 20 minutos después de lo cual se añaden 80 g de Hyflo y la mezcla se filtra. El extracto en el disolvente se separa después de la fase acuosa agotada. La torta filtrada se vuelve a poner en suspensión en la fase

239132



acuosa agotada y se añaden a ella 200 ml de metil-isobutil-cetona fresca. Después de agitado durante 30 minutos, la mezcla se filtra y el extracto se separa. Los extractos combinados, en total 575 ml dan un ensayo de 18.600 gammas por ml, que representa un rendimiento de 87,8%.

EJEMPLO V

LAVADO CON AGUA DEL EXTRACTO EN METIL-ISOBUTIL-CETONA

Una porción de 555 ml de extracto en metil-isobutil-cetona, preparado como en el ejemplo Iv, se lava con 272 ml de agua, previamente ajustada a un pH de 9,5 con hidróxido sódico por agitación durante 20 minutos y separación. El extracto lavado 520 ml, da un ensayo de 19.450 gammas por ml, un rendimiento de esta fase de 98,3%.

EJEMPLO VI

EXTRACCION POSTERIOR CON AGUA DEL EXTRACTO EN DISOLVENTE LAVADO

A 500 ml de extracto en metil-isobutil-cetona, preparado como en el ejemplo V se le añaden 150 ml de agua y el pH se ajusta a 1,2 por adición de ácido sulfúrico, después de agitar durante 30 minutos las fases se separan. El extracto acuoso 165 ml, así obtenido da un ensayo de 56.000 gammas por mililitro, que representa un rendimiento de esta fase del 95%.

EJEMPLO VII

RECUPERACION DE TETRACICLINA NEUTRA

Una porción de 145 ml del extracto acuoso obtenido como en el ejemplo VI se ajusta sucesivamente a pH 1,6, 2,0, 2,6, 3,09 y finalmente 3,6 por adición de hidróxido sódico al 15%, agitando la mezcla durante 15 a 20 minutos en cada caso. Después de abandonarlo con agitación a pH 3,6 durante 16 horas a temperatura ambiente, el producto cristalino se filtra, se lava con agua y se seca en vacío a 40°C. Con ello se obtiene un rendimiento de 7,4 g

-14-

239132



24876.1857

de tetraciclina neutra que da un ensayo de 1.003 gammas por miligramo, un rendimiento de esta fase de 92,1%. El producto así obtenido es de aspecto visual amarillo brillante.

### EJEMPLO VIII

#### EXTRACCION DE CLOROTETRACICLINA DIRECTAMENTE DE LA MASA

1.500 mililitros de una masa de clorotetraciclina que da un ensayo de 6.600 gammas por mililitro se ajusta a pH 1,5 con ácido sulfúrico al 25%. Se añaden 36 g de oxálato amónico y la mezcla se agita durante 45 minutos. A la mezcla se le añaden 26 mililitros de Onamine RO<sup>1</sup>. Se añaden 600 ml de metil-isobutil-cetona y el pH se ajusta a 8,5 con hidróxido sódico al 25%. La masa se agita durante 20 minutos. A la mezcla se le añaden 45 g de Hyflo y la mezcla se filtra. El filtrado se deja sedimentar y la fase disolvente se separa. La torta filtrada se pone en suspensión con 300 ml de metil-isobutil-cetona y se filtra. Los filtrados se combinan y los extractos en el disolvente se separan de la fase acuosa dando un volumen total de 780 ml que dan un ensayo de 10.250 gammas por ml, lo que representa un rendimiento del 77,8%.

1) La Onamine RO se vende por la Onix Oil And Chemical Company y se cree que es un derivado sustituido de imidazolina soluble en aceite que contiene una cadena grasa larga en combinación con grupos amino e hidróxilo.

### EJEMPLO IX

#### RECUPERACION DE CLORHIDRATO DE CLOROTETRACICLINA

El extracto en metil-isobutil-cetona del ejemplo VIII se le añaden 100ml de agua y el pH se ajusta a 0,9 con ácido clorhídrico concentrado la mezcla se deja estar durante 24 horas se filtra y se lava con un volumen de 2-etoxietanol, 1 volumen de agua y a continuación 1 volumen de isopropanol. Se obtiene un rendimiento de 7.2 gramos que tiene una  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  de 0,19 a 460 milimicras.

-16-



Esta solicitud que corresponde a la presentada en E.U.A. el 21 de Diciembre de 1.956, bajo el número 629.773, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

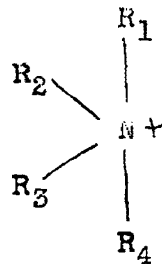
Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1º.- Un procedimiento de extracción de los antibioticos clorotetraciclina y/o tetraciclina a partir de una masa o mosto de fermentación que los contenga, caracterizado por

(1) acidificación de la masa a un pH aproximadamente de 0,5-2,5 para solubilizar los antibioticos contenidos en ella

(2) ajuste del contenido en iones calcio y magnesio de la masa entre unos 10 y 45 miligramos por gramo de antibiotico en la masa,

(3) Adición a la misma de un compuesto de amonio cuaternario que tenga la fórmula:



en la que  $R_1$  es un radical alquilo inferior o bencilo,  $R_2$  es una cadena grasa larga,  $R_3$  y  $R_4$  son radicales alquilo inferiores, y cuando  $R_1$  y  $R_4$  se consideran juntos representan una cadena carbonada divalente de 2-5 átomos de carbono,

(4) ajuste del pH de la masa entre 5,5 y 11 aproximadamente, y



(5) adición de un disolvente orgánico polar, inmisible con agua, para extraer los antibióticos de la masa tratada.

2<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que en la fase (1) la masa se acidula a un pH de 1,3 a 1,4.

3<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por el hecho de que en la fase (1) la masa se acidula con un ácido mineral fuerte a temperatura ambiente.

4<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que el contenido en ión calcio y magnesio de la masa se ajusta en la fase (2) por adición de una cantidad predeterminada de iones oxalato.

5<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que la cantidad de compuesto de amonio cuaternario añadida en la fase (3) es aproximadamente de 1/2 a 3 moles de dicho compuesto por mol de antibiótico.

6<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que el pH de la masa se ajusta en la fase (4) aproximadamente a 8,4 a 8,6.

7<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que la cantidad de disolvente añadida en la fase (5) es por lo menos el 10% del volumen de la masa.

8<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por el hecho de que el disolvente añadido en la fase (5) es una metil-alkil-cetona.

9<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por el hecho de que cuando el

239 132



extracto en el disolvente orgánico contiene clorotetraciclina se  
somete a la nueva serie de etapas siguientes para mejorar el as-  
pecto visual del producto final: ajuste del extracto en el disol-  
vente orgánico a un pH entre 1 y 4, adición de un agente reductor  
5 al extracto acidulado, aislamiento del antibiótico del extracto en  
el disolvente por acidificación del extracto y a continuación re-  
cuperación del antibiótico.

10<sup>a</sup>.- Un procedimiento de extraer antibioticos de clorotetra-  
ciclina y/o tetraciclina.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con  
los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de dieciocho hojas escritas a máquina  
por una sola cara.

Madrid, 24 DIC. 1957

P.A.

Alberto de Elzaburu  
Per. P. A.

18