



POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

63201

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 07.V.1966 (P 114 457)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 20.VIII.1971

Kl. 12 o, 25

MKP C 07 c, 103/19

CRYTEL NIA

UKD Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Współtwórcy wynalazku: Franjo Kajfez, Peter Jerman

Właściciel patentu: KRKA tovarna zdravil, Novo mesto (Jugosławia)

Sposób wydzielania czystych antybiotyków grupy tetracykliny z roztworów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wydzielania czystych antybiotyków grupy tetracykliny z roztworów, zwłaszcza z cieczy fermentacyjnej, z której grzybnie wydzielono za pomocą zakwaszenia i odsączenia.

Antybiotyki grupy tetracykliny należą do grupy biologicznie czynnych substancji, które wywodzą się z perhydronaftacenu. Wzór podstawowego szkieletu budowy antybiotyków grupy tetracykliny jest przedstawiony na rysunku. We wzorze tym podstawniki znajdują się w pozycjach, które uwidocznił w powyższej tabeli, przedstawiając poszczególne antybiotyki, które można wytwarzać sposobem według wynalazku.

Podstawnik	Potoczna nazwa antybiotyku
4-N(CH ₃) ₂ , 6-OH, 6-CH ₃ , 12a-OH	Tetracyklina (TC)
4-N-(CH ₃) ₂ , 5-OH, 6-OH, 6-CH ₃ , 12a-OH	5-Oksytetracyklina (OTC)
4-N(CH ₃) ₂ , 6-OH, 6-CH ₃ , 7-Cl, 12a-OH	7-Chlorotetracyklina (OCTC)
4-N(CH ₃) ₂ , 6-OH, 6-CH ₃ , 7-Br, 12a-OH	7-Bromotetracyklina (BrTC)
4-N(CH ₃) ₂ , 6-OH, 7-Cl, 12a-OH	6-Demetylochlorotetracyklina (DCTC)
4-N(CH ₃) ₂ , 6-OH, 12a-OH	6-Demetylotetracyklina
4-N(CH ₃) ₂ , 6-CH ₃ , 12a-OH	6-Dezoksytetracyklina

2

Według dotychczas znanych sposobów antybiotyki grupy tetracykliny można było otrzymać z cieczy fermentacyjnej albo z zanieczyszczonych roztworów trzema znanymi metodami, a mianowicie przez wytrącanie antybiotyku odpowiednim środkiem strącającym i następną ekstrakcję wytrąconego osadu odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym, za pomocą ekstrakcji antybiotyku z roztworu wodnego rozpuszczalnikiem, który dobrze rozpuszcza antybiotyk, a z wodą nie miesza się; za pomocą adsorpcji na wymienniku jonowym, węglu aktywowanym itd.

Sposób według wynalazku oparty jest na metodzie pierwszej, polegającej na wydzielaniu antybiotyków tetracyklinowych za pomocą strącania. Do strącania antybiotyku w środowisku alkalicznym stosowano już między innymi sole wapnia lub magnezu. Stwierdzono, że można wytrącać antybiotyk również w środowisku kwaśnym, osiągając prawie ilościowe strącenie antybiotyku, jeśli do wytrącania zastosuje się związki wolframu.

Sposobem według wynalazku wydzielają się antybiotyki grupy tetracykliny korzystnie z cieczy fermentacyjnej, z której grzybnie wydzielono za pomocą zakwaszenia i odsączenia z odpowiednim środkiem filtracyjnym. Do zakwaszenia można stosować kwas solny, siarkowy, azotowy, fosforowy, szczawiowy, chlorooctowy i inne. Najlepsze wyniki otrzymuje się wtedy, gdy wartość pH przed sączeniem wynosi mniej niż 3,0. Antybiotyk można również wydzielać z innych roztworów antybiotyku.

Według wynalazku do roztworów zawierających an-

tybiotyku grupy tetracykliny wprowadza się kwas wolframowy lub jego sole rozpuszczalne w wodzie lub we wspomnianych roztworach wodnych. Rozpuszczalność wolframianu nie ma podczas strącania istotnego znaczenia, ponieważ ze względu na tworzenie się kompleksu między jonem wolframianowym a antybiotykiem wolframian stale jest rozpuszczany i reaguje z obecnym w roztworze antybiotykiem, wskutek czego wolframian zostaje całkowicie rozpuszczony.

Spośród soli kwasu wolframowego stosuje się następujące związki:

Związek	Ciepota cząsteczkowa
Metawolframian amonowy (NH ₄) ₂ W ₄ O ₁₃ · 8 H ₂ O	1123,65
Parawolframian amonowy (NH ₄) ₆ W ₇ O ₂₄ · 6 H ₂ O	1887,36
Borowolframian kadmowy Cd ₂ B ₂ W ₉ O ₃₂ · 18 H ₂ O	2737,49
Kwas fosforowo-wolframowy P ₂ O ₅ · 12 WO ₃ · 42 H ₂ O	3680,00
Ortowolframian potasowy K ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	362,09
Metawolframian potasowy K ₂ W ₄ O ₁₃ · 8 H ₂ O	1165,77
Parowolframian potasowy K ₆ W ₇ O ₂₄ · 6 H ₂ O	2013,72
Wolframian sodowy Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	293,84
Wolframian sodowy, zwykły handlowy produkt Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	329,87
Parawolframian sodowy Na ₆ W ₇ C ₂₄ · 16 H ₂ O	2097,22

Stosunek wagowy soli kwasu wolframowego i antybiotyku powinien wynosić 0,5 : 1 do 4 : 1 w przeliczeniu na Na₂WO₄ · 2H₂O. Stwierdzono, że najlepsze wyniki otrzymuje się przy stosunku wagowym 1,2 : 1 do 1,5 : 1; powstający przy tym osad daje się dobrze sączyć, przeciętna wydajność wynosi 99,3%. Duży nadmiar wolframianu wywiera istotny wpływ na podwyższenie się rozpuszczalności kompleksu wolframian — antybiotyku. Można przypuszczać, że powstaje rozpuszczalny kompleks antybiotyku z wolframianem.

Strącanie prowadzi się przy wartości pH = 0,5 — 7,0, korzystnie 1 — 2,5. Przeważnie stosuje się wolframiany o ciężarze cząsteczkowym powyżej 500, ponieważ przy nich wartość pH roztworu w czasie strącania nie ma istotnego wpływu. W silnie kwaśnych roztworach można stosować proste wolframiany typu Me₂WO₄.

Zakwaszenie powoduje strącanie kompleksu antybiotyku za pomocą soli kwasu wolframowego, przy czym skład kompleksu jest zależny od wartości pH. Wartość pH roztworu wpływa również na skład soli kwasu wolframowego, gdyż w kwaśnym środowisku ciężar cząsteczkowy wolframu parokrotnie wzrasta, ponieważ wolframian przy wartości pH = 6,0 — 8,0 przechodzi w odwracalne jony kwasu sześciowolframowego według równania 6H₂WO₄ ⇌ H₁₂W₆O₂₄.

Stwierdzono, że kompleksy antybiotyków grupy tetracykliny są trwałe nawet przy wartości pH = 0,5 — 1. Przy wartości pH powyżej 4,0 prawdopodobnie tworzą się kompleksy z parawolframianami typu Me₅H₇W₆O₂₄.

w bardziej kwaśnych środowiskach przy wartości pH poniżej 4,0 powstają jednak kompleksy z solami typu Me₃H₉W₆O₂₄.

Zostało to potwierdzone drogą analizy kompleksów, które otrzymano przy różnych wartościach pH.

Tak więc na przykład kompleks tetracykliny z Na₂WO₄

- otrzymany przy pH = 6,0 zawiera 46,4% substancji nieorganicznej
- otrzymany przy pH = 5,0 zawiera 47,0% substancji nieorganicznej
- otrzymany przy pH = 4,0 zawiera 48,0% substancji nieorganicznej
- otrzymany przy pH < 3,0 zawiera 49,9% substancji nieorganicznej.

Te same wyniki z błędem ± 2% wskazuje analiza mikrobiologiczna określająca zawartość antybiotyku w kompleksie.

Oprócz wpływu wartości pH roztworu na skład kompleksu i przez to również na ilość soli kwasu wolframowego, która jest potrzebna do strącenia antybiotyku, wartość pH wywiera jeszcze silny wpływ na ilość antybiotyku, który zostaje wyizolowany z roztworu. Przy wartości pH wyższej niż 4 można z roztworu wyodrębnić tylko 40% antybiotyku, natomiast przy optymalnej wartości pH = 1 — 2,5 po wyizolowaniu antybiotyku pozostaje w roztworze tylko nieznaczna jego ilość, co podano w poniższej tabelicy:

Lp.	Ilość antybiotyku w roztworze	
	przed wyodrębnieniem antybiotyku	po wyodrębnieniu antybiotyku
1	5039 γ/ml CTC	27 γ/ml CTC
2	5039 γ/ml OTC	31 γ/ml OTC
3	3080 γ/ml TC	52 γ/ml TC
4	1820 γ/ml BrTC	14 γ/ml BrTC
5	800 γ/ml DCTC	9 γ/ml DCTC

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że by zapewnić prawidłowe i ekonomiczne prowadzenie sposobu, należy poświęcić dużą uwagę wartości pH roztworu antybiotyku przed strąceniem kompleksu, zwłaszcza, że wartość pH roztworu antybiotyku podczas strącania na skutek doprowadzanego wolframianu silnie się zmienia.

Otrzymany przez strącanie kompleks miesza się ze środkiem filtracyjnym, na przykład „Dicalit” i filtruje. Osad przemywa się wodą, usuwa z filtra i ponownie zawiesza w wodzie. Przez dodanie 10%-owego roztworu wodorotlenku sodowego nastawia się wartość pH na 8,5 i kompleks rozpuszcza się. Zawiesinę filtruje się, osad zawierający środek filtrujący przemywa się wodą o wartości pH = 9,0. Po przemyciu środka filtrującego przesącze łączy się i dla lepszego oczyszczenia antybiotyku ponownie strąca się taką ilością 10 — 20%-owego kwasu solnego, że wartość pH osiąga 1,5 — 2,0. Wydzielony kompleks po dodaniu środka filtrującego ponownie filtruje się i przemywa zakwaszoną destylowaną wodą. Osad ponownie zawiesza się w wodzie, zawiesinę zadaje się 10%-owym roztworem wodorotlenku sodowego do wartości pH = 8,5 — 10 i ponownie filtruje.

Środek filtracyjny przemywa się wodą o wartości pH około 9,0; przesącz łączy się ze sobą i dalej przernabia. Z takiego alkalicznego roztworu można antybiotyk korzystnie wyizolować według następujących dwóch znanych sposobów, a mianowicie przez strącenie solami wapnia lub magnezu albo mieszaninami obu tych materiałów, lub przez izolowanie za pomocą wymienników jonowych.

Reasumując sposób według wynalazku wydzielania czystych antybiotyków grupy tetracykliny z roztworów, zwłaszcza z cieczy fermentacyjnej, z której przez zakwaszenie i filtrację została wydzielona grzybnia, polega na tym, że do roztworu zawierającego antybiotyk dodaje się kwas wolframowy lub jego sole w stosunku wagowym do antybiotyku od 0,5:1 do 4,0:1, korzystnie 1,2:1 do 1,5:1 w przeliczeniu na $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, przy wartości pH = 0,5—7,0, korzystnie przy wartości pH = 1,0—2,5, wytrącony osad odsącza się i zadaje 10—20%-owym roztworem wodorotlenku sodowego aż do osiągnięcia wartości pH = 8,5—10 i z otrzymanego roztworu izoluje się antybiotyk w znany sposób, korzystnie solami wapnia i/lbo magnezu, i/lbo za pomocą wymienników jonowych.

Jako sole wapnia lub magnezu stosuje się przede wszystkim chlorki. Ponieważ tutaj tylko kation ma znaczenie, a anion jest nieistotny, wyizolowanie antybiotyku może również przebiegać z innymi solami wapnia i/lbo magnezu. Można również stosować sole innych metali ziem alkalicznych.

Przy pracy z chlorkiem wapnia lub magnezu do alkalicznego roztworu wolframowego kompleksu antybiotyku o wartości pH 8,5—10 dodaje się w celu osiągnięcia wartości pH około 7,5 10—20%-owego kwasu solnego i następnie jeszcze stały chlorek amonowy w stosunku wagowym od 1:1 do 1:3. Przez dodanie chlorku amonowego przeszkadza się strącaniu się wolframianu wapnia lub magnezu. Po dodaniu chlorku amonowego dodaje się 10—20% roztwór chlorku wapniowego lub magnezowego i następnie wartość pH roztworu nastawia się za pomocą 10%-owego wodorotlenku sodowego na 8,0—8,2; strąca się przy tym sól wapniowa antybiotyku grupy tetracykliny. Stosunek wagowy antybiotyku do chlorku wapniowego lub magnezowego wynosi 1:1 do 1:4.

W czasie prób można było stwierdzić, że szybkość dowadania wodorotlenku sodowego wywiera później wpływ na filtrację. Przy szybkim dodawaniu wodorotlenku sodowego zauważono tendencję do tworzenia subtelnie zdyspergowanego osadu, który później trudno się filtruje. Przy powolniejszym dodawaniu wodorotlenku sodowego otrzymuje się osad o grubszej strukturze, który łatwo filtruje się również bez środka filtrującego.

Sól wapniową antybiotyku filtruje się ze środkiem filtrującym lub bez niego i przemywa wodą destylowaną, do której dodano trochę chlorku wapniowego. Przesącz łączy się z wodą z przemycia i z połączonych przesączów uzyskuje się z powrotem wolframian sodowy. Przemytą sól wapniową antybiotyku wraz ze środkiem filtrującym zdejmuje się z sączka i suszy w temperaturze 40—50°C pod obniżonym ciśnieniem 30—40 mm Hg. Suchą sól wapniową ekstrahuje się metanolem, izobutanolem, metylobutyloketonem lub innym alkoholem lub ketonem, który uprzednio został nasycony wodą i zakwaszony kwasem solnym do wartości pH = 2,0.

W celu usunięcia zanieczyszczeń na przykład roztwór

metanolowy zadaje się węglem aktywnym. Następnie węgiel odfiltrowuje się i zaadsorbowany antybiotyk przemywa się zakwaszonym metanolem.

W celu oddzielenia jonów metalu z antybiotyku wyciąg metanolowy przepuszcza się przez kolumnę z wymiennicem jonowym, na przykład kationitem takim, jak Amberlite IR 110. Otrzymuje się wówczas antybiotyk o wysokim stopniu czystości. Po przebyciu kolumny metanolowy wyciąg zatęża się pod próżnią do $\frac{1}{4}$ objętości i w znany sposób otrzymuje się chlorowodorek lub zasadę antybiotyku. Stopień czystości otrzymanych kryształów chlorowodoru antybiotyku wynosi około 800—910 γ/mg i wydajność po przekrystalizowaniu 85—90%, w przeliczeniu na ilość antybiotyku w cieczy fermentacyjnej.

Podczas izolowania antybiotyku za pomocą wymiennika jonowego roztwór kompleksu antybiotyku przy wartości pH = 8,5—10,0 przepuszcza się z szybkością 50 ml/minutę przez kolumnę z wymiennikiem kationowym, na przykład Duolite C-25 (kwas polistyrenosulfonowy), przy czym stosuje się stosunek przesączu do wymiennika jonowego od 3:1 do 2:1. Otrzymaną z kolumny ciecz stosuje się do regeneracji wolframianu.

Antybiotyk eluuje się z wymiennika kationowego za pomocą 1 n—4 n roztworu wodorotlenku amonowego. Eluat zatęża się pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 40—45°C do $\frac{1}{3}$ pierwotnej objętości. Stężony roztwór rozcieńcza się destylowaną wodą w stosunku 1:1 i przepuszcza się przez wymiennik anionowy, na przykład Amberlite IRC 411 (usieciowany szkielek polistyrenowy z grupami kwasu sulfonowego) i w ten sposób usuwa się ostatnie ślady jonów wolframianów. Stosunek ilości wymiennika do roztworu winien wynosić około 1:1, zaś szybkość przepływu roztworu przez kolumnę winien wynosić 10—30 ml/minutę. Eluat zatęża się pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 40—45°C do $\frac{1}{3}$ pierwotnej objętości. Z zatężonego eluatu otrzymuje się w znany sposób czysty antybiotyk. Przez przekrystalizowanie z metanolu otrzymuje się kryształy o stopniu czystości 900—1000 γ/mg. Wydajność wynosi 85—90%, w przeliczeniu na ilość antybiotyku w cieczy fermentacyjnej.

Ażeby otrzymać zasadę antybiotyku dodaje się do wodnego koncentratu 10%-owy wodorotlenek sodowy lub wodorotlenek amonowy przy wartości pH = 3,5—4,0. Przez dodanie kilku ziarenek wydzielonej tetracykliny osiąga się lepszą krystalizację zasady antybiotyku. Po upływie 10—24 godzin wydziela się zasada antybiotyku, którą przemywa się wodą i butanolem i suszy się metodą liofilizacji.

Z przesączu otrzymanego po filtracji soli wapniowej lub magnezowej antybiotyku grupy tetracykliny względnie z roztworu odprowadzonego z pierwszego wymiennika wydziela się kwas wolframowy w znany sposób, na przykład stężonym kwasem solnym i stosuje z powrotem w sposobie według wynalazku. Przesącz soli wapniowej antybiotyku można z powrotem stosować do strącania przy następnych szarżach, o ile uprzednio nadmiar wody odparuje się do połowy pierwotnej objętości roztworu.

Stwierdzono, że roztwór wolframianu bez regeneracji można stosować pięciokrotnie bez szkody dla stopnia czystości otrzymanego antybiotyku. Z czasem jednak gromadzą się w przesączu większe ilości chlorku sodowego i chlorku amonowego, który tworzy się przy neu-

tralizacji i wówczas wolframian musi być regenerowany. Regeneruje się go poprzez kwas wolframowy w następujący sposób:

Po strąceniu soli wapniowej antybiotyku przesącz zateża się do $\frac{1}{3}$ objętości i strąca się H_2WO_4 za pomocą nadmiaru stężonego kwasu solnego. Nadmiar kwasu solnego, jak również wysokie stężenie wolframianu w roztworze mają korzystny wpływ na powstawanie kwasu wolframowego, natomiast wpływ temperatury jest minimalny. Przy nadmiarze kwasu solnego sedimentacja osadu przebiega szybciej, a filtracja staje się łatwiejsza. Wydzielony kwas wolframowy odfiltruje się i miesza z 50%-owym wodorotlenkiem sodowym w stosunku stechiometrycznym. Przygotowany w ten sposób roztwór wolframianu można z powrotem stosować do strącania antybiotyku.

Kompleksy antybiotyku grupy tetracykliny z jodem wolframianu są związkami trwałymi i mogą być czyszczone przez kilkakrotne strącanie. Kompleksy działają tak samo antybiotycznie, jednak są o około 50% mniej skuteczne aniżeli czysty antybiotyk.

Otrzymane kompleksy stanowią istotnie nowe związki, a wykazały to widma w podczerwieni, w nadfiolecie oraz widmo rentgenowskie. Tak więc widmo absorpcyjne w podczerwieni kompleksu chlorotetracykliny z $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ w bromku potasowym wskazuje względna przepuszczalność promieniowania podczerwonego w zależności od długości fali względnie częstotliwości.

Antybiotyki otrzymane sposobem według wynalazku nie zawierają wolframu, co zostało stwierdzone za pomocą analizy spektralnej. Próbkę antybiotyków spalono w tyglu kwarcowym, przez co ograniczono rozpraszanie wzorca w łuku elektrycznym i jednocześnie podwyższono dokładność pomiaru. Następnie próbki umieszczono w łuku elektrycznym prądu stałego o 10 A.

Widma emisyjne fotografowano za pomocą spektrografu Jerrel — Ash na płytach Kodak Scientific Plateg 00 przy czasie naświetlania 70 sekund. Za pomocą tych widm emisyjnych udowodniono, że antybiotyki otrzymane sposobem według wynalazku nie zawierają wolframu, dla którego charakterystyczne linie mają długości fal 2944,39 Å, 2946,98 Å i 2947,38 Å.

Dzięki zastosowaniu sposobu według wynalazku uzyskuje się znaczne korzyści, a mianowicie przy strącaniu otrzymuje się antybiotyki z dużą wydajnością, ponieważ przy zastosowaniu korzystnego zakresu pH w cieczy fermentacyjnej, pozostaje maksymalnie tylko 1% nie strąconego antybiotyku. Środek strącający antybiotyk, to znaczy wolframian odzyskuje się i z powrotem stosuje do strącania, gdy tymczasem znane środki strącające odrzuca się. Strącanie antybiotyków solami kwasu wolframowego ma jeszcze tę korzyść, że jony wolframianu w kwaśnym środowisku nie tworzą osadu z żadnym składnikiem cieczy fermentacyjnej albo zanieczyszczonego roztworu, na skutek czego pozostają w roztworze i nie zanieczyszczają antybiotyku.

Na skutek strącania w kwaśnym środowisku antybiotyk nie ulega rozkładowi, natomiast przy strącaniu w alkalicznym środowisku według znanych sposobów następuje częściowa jego odbudowa. Wiadomo, że niektóre antybiotyki grupy tetracykliny są nietrwałe w środowisku alkalicznym, natomiast w środowisku kwaśnym są one jednak trwałe.

Z ekonomicznego punktu widzenia sposób według

wynalazku ma jeszcze jedną korzyść w porównaniu do znanych sposobów, w których odrzuca się środek strącający antybiotyk, ponieważ po wydzieleniu czystego antybiotyku nie można go wyodrębnić, względnie sposób wydzielenia środka strącającego byłby nieekonomiczny. Korzyść ta polega na tym, że w sposobie według wynalazku traci się maksymalnie 10% środka strącającego antybiotyk i tylko tę ilość uzupełnia się.

Przykład I. 20 litrów cieczy fermentacyjnej zakwasza się 20%-owym kwasem solnym do wartości pH = 2,6 i następnie zadaje się środkiem filtracyjnym Dicalit 4108 i filtruje. Strącanie powtarza się i osad zawiesza się w wodzie zakwaszonej kwasem solnym do wartości pH = 1,5 — 2,0 i ponownie filtruje. Pierwszy i drugi przesącz łączy się i 2,5 litra poddaje dalszej obróbce. Ilość chlorotetracykliny w cieczy fermentacyjnej wynosiła 3723 g/ml. Po podniesieniu w cieczy fermentacyjnej wartości pH do 2,0 dodaje się stężonego roztworu $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ w stosunku wagowym do antybiotyku 1,2 : 1 i wartość pH roztworu ponownie nastawia się na 2,0. Osadowi pozwala się osiąść, następnie filtruje. Ilość antybiotyku w przesączu wynosi 28 g/ml. W ten sposób można wydzielić 99,25% ogólnej ilości antybiotyku, względnie 98,6% jeśli uwzględnić zwiększenie objętości.

Otrzymany osad zdejmuję się z sączka i zawiesza w 400 ml destylowanej wody i potem powoli doprowadza się 10% roztworem wodorotlenku sodowego wartość pH do 8,5. Przez podwyższenie pH kompleks przechodzi do roztworu. Na koniec stopniowo zadaje się go 20%-owym kwasem solnym do osiągnięcia wartości pH 1,5 — 2,0. Wydzielony kompleks znów filtruje się i przemywa wodą, zakwaszoną kwasem solnym do wartości pH = 2,5.

Osad zawiesza się w wodzie i zadaje 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 8,5 — 9,0. Otrzymany alkaliczny roztwór zadaje się 20%-owym kwasem solnym do wartości pH 7,5, następnie dodaje 30 g stałego chlorku amonowego i jeszcze 300 ml 10%-owego roztworu chlorku wapniowego; w końcu wartość pH roztworu nastawia się 10%-owym wodorotlenkiem sodowym na 8,0 — 8,2. Dodawanie wodorotlenku sodowego musi następować bardzo powoli, ażeby otrzymać dobrze filtrujący się osad.

Otrzymany osad odfiltruje się i przemywa destylowaną wodą, do której dodano nieco chlorku wapniowego. Przesącz gromadzi się i stosuje do ponownego strącania antybiotyku względnie do regeneracji wolframianu. Przemytą sól wapniową antybiotyku usuwa się z sączka i suszy pod obniżonym ciśnieniem 30 — 40 mm Hg w temperaturze 40 — 45°C. Po wysuszeniu ekstrahuje się ją metanolem zakwaszonym kwasem solnym do wartości pH = 2,0. Wyciąg metanolowy zadaje się węglem aktywnym, węgiel aktywny odfiltruje się i przesącz pod próżnią zateża do $\frac{1}{4}$ pierwotnej objętości, po czym do metanolowego koncentratu dodaje się 30%-owy kwas solny, i ponownie zateża się do $\frac{1}{3}$ objętości. Po odparowaniu nadmiaru metanolu rozpoczyna się krystalizacja chlorowodoru chlorotetracykliny. Po rozpoczęciu się krystalizacji przerywa się destylację; po ostudzeniu chlorowodorek chlorotetracykliny krystalizuje dalej. Wydzielone kryształy antybiotyku odfiltruje się, przemywa zimnym metanolem i suszy.

Otrzymuje się 12,1 g antybiotyku o stopniu czystości 800 g/mg. Po przekrystalizowaniu z metanolem otrzymuje się antybiotyk o stopniu czystości 980 g/mg.

Przykład II. 2,6 litrów przefiltrowanej cieczy fermentacyjnej, którą otrzymano w sposób według przykładu I, poddaje się obróbce jak w przykładzie I, tylko zamiast $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ w tym przypadku stosuje się parawolframian sodowy ($\text{Na}_6\text{W}_7\text{O}_{24} \cdot 16\text{H}_2\text{O}$) w tym samym stosunku wagowym do antybiotyku 1,2 : 1, w przeliczeniu na $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Otrzymuje się 11,3 g antybiotyku o stopniu czystości 850 γ/mg .

Przykład III. 5 litrów przefiltrowanej cieczy filtracyjnej, którą otrzymano w sposób według przykładu I, zadaje się parawolframianem potasowym ($\text{K}_6\text{W}_7\text{O}_{24} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) w stosunku do antybiotyku 1,3 : 1, w przeliczeniu na $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ponieważ ciecz fermentacyjna zawiera 18,62 g antybiotyku, przeto trzeba dodać 22,0 g parawolframianu potasowego, rozpuszczonego w 400 ml destylowanej wody.

Po dodaniu parawolframianu potasowego wartość pH nastawia się na 2,0 przez dodanie 10%-owego kwasu solnego i następnie zawieszinę miesza się ze 100 g Dicalite'u 4108 i filtruje przez sączek Büchner'a. Osad przemywa się 100 ml destylowanej wody, do której dodano 1 ml 10%-owego kwasu solnego. Przemyty osad zdejmuje się z sączka i zawiesza w 800 ml destylowanej wody. Za pomocą 10%-owego wodorotlenku sodowego wartość pH nastawia się na 8,5. Zawieszinę filtruje się i osad zawierający Dicalite przemywa 500 mlami destylowanej wody, do której dodano 200 ml 10%-owego wodorotlenku sodowego, aby nastawić wartość pH na 9,0—10,0.

Po przemyciu Delicate'u, przesącz łączy się i kompleks wolframowy antybiotyku ponownie strąca się 20-procentowym kwasem solnym; kwas solny dodaje się stopniowo, aż do osiągnięcia wartości pH = 1,5—2,0. Wydzielony kompleks ponownie filtruje się z 100 g Dicalite'u i przemywa 100 mlami zakwaszonej destylowanej wody, (1 ml 10%-owego kwasu solnego na 100 ml wody).

Przemyty osad zawiesza się w 100 ml destylowanej wody; wartość pH nastawia się na 8,5—9,5 za pomocą 10%-owego wodorotlenku sodowego, po czym ponownie filtruje. Osad przemywa się 400 ml wody o wartości pH = 9,0—10,0 (30 ml 10%-owego wodorotlenku sodowego na 400 ml destylowanej wody). Przesącz łączy się i dalej przerabia. Osad na sączku odrzuca się. Przesącz zakwasza się 20%-owym kwasem solnym do wartości pH = 7,5, następnie dodaje się 60 g stałego chlorku amonowego. Na koniec dodaje się jeszcze 200 ml 20% roztworu chlorku magnezowego i następnie wkrapla 10%-owy roztwór wodorotlenku sodowego, aż do osiągnięcia wartości pH = 8,0—8,2.

Wydzieloną sól magnezową chlorotetracykliny filtruje się z pomocą Dicalite'u. Otrzymany osad przemywa się 80 ml wody, do której dodano 1 g chlorku magnezowego. Przesącz przechowuje się i później stosuje do regeneracji wolframianu. Przemytą sól magnezową chlorotetracykliny usuwa się z sączka i suszy pod obniżonym ciśnieniem 30—40 mm Hg w temperaturze 40—45°C. Suchą sól magnezową ekstrahuje się stopniowo 3 litrami metanolu, który zawierał 30 ml stężonego kwasu solnego. Połączone wyciągi łączy się i filtruje w celu usunięcia zawieszonego Dicalite'u.

Przefiltrowany wyciąg zadaje się 4 g węgla aktywnego ogrzewa do temperatury 40°C i szybko filtruje. Otrzymany osad węgla aktywnego przemywa się 80 ml zakwaszonego metanolu. Przesącz łączy się i destyluje

tak długo, aż oddestyluje 2,2 litra metanolu; następnie dodaje się 60 ml stężonego kwasu solnego i destyluje dalej, aż zacznie krystalizować chlorowoderek chlorotetracykliny. Następuje to przeważnie wtedy, gdy zostaje oddestylowane 600—700 ml metanolu. Po ostudzeniu dalej krystalizuje chlorowoderek chlorotetracykliny.

Wydzielone kryształy odfiltruje się i przemywa 20 ml zimnego metanolu. Otrzymuje się 20,8 g chlorowodorku chlorotetracykliny o stopniu czystości 810 γ/mg .

Przykład IV. 10 litrów cieczy fermentacyjnej zakwasza się 20%-owym kwasem solnym do wartości pH = 2,6, zadaje Dicalite'em 4108 i filtruje. Osad zawieszają w wodzie, zakwaszonej kwasem solnym do wartości pH = 1,5—2,5 i powtórnie filtruje. Pierwszy i drugi przesącz łączy się. Ilość chlorotetracykliny wynosi w nim 5039 γ/ml .

5 litrów przefiltrowanej cieczy fermentacyjnej zadaje się 10%-owym kwasem solnym aż do osiągnięcia wartości pH = 2,0. Teraz dodaje się stężonego roztworu $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ w stosunku do antybiotyku jak 1,3 : 1, to znaczy, 32,8 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; następnie przez dodanie 10%-owego kwasu solnego wartość pH z powrotem nastawia się na 2,0. Osadowi pozwala się osiąść i następnie filtruje się. Ilość antybiotyku w przesączu wynosi 27 γ/ml ; w ten sposób izoluje się z cieczy fermentacyjnej 99,47% antybiotyku.

Osad kompleksu chlorotetracykliny z jonami wolframianu zdejmuje się z sączka i zawiesza w 1 litrze destylowanej wody, następnie dodaje się 10%-owy ług sodowy, aż do osiągnięcia wartości pH = 8,5. Roztwór filtruje się i przesącz powoli zadaje się 10%-owym kwasem solnym do wartości pH = 1,5—2,0. Wydzielony kompleks powtórnie filtruje się, osad usuwa się z sączka, zawiesza w 2 litrach wody i zadaje 10%-owym roztworem wodorotlenku sodowego do osiągnięcia wartości pH = 7,5—8,0.

Ten alkaliczny roztwór przepuszcza się przez kolumnę o średnicy 4 cm, wypełnioną 800 gramami kationitu Duolite C-25. Szybkość przepływu wynosi 20 ml/minutę.

Roztwór odprowadzony z kolumny stosuje się do regeneracji wolframianu. Antybiotyk eluuje się z wymiennika za pomocą 4 litrów wodorotlenku amonowego i otrzymany eluat zateża się pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 45° do objętości 1,4 litra. Stężony roztwór rozcieńcza się 1 litrem destylowanej wody i następnie z szybkością 15 ml/minutę przepuszcza przez kolumnę o średnicy 2 cm, zawierającą 300 g anionitu Amberlite IRC 411, ażeby usunąć śladowe ilości jonów wolframianowych.

Eluat zateża się pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 40—45°C do objętości 800 ml. Do zagęszczonego eluatu dodaje się stężony kwas solny do wartości pH = 1,5 i następnie dalej zateża się, aż zacznie wydzielać się kryształy. Następnie roztwór nasycy się chlorkiem sodowym i pozostawia do powolnego ochłodzenia. Wydzielone kryształy chlorowodorku odfiltruje się i przemywa 20 ml zimnej destylowanej wody.

Otrzymuje się 27,1 g chlorowodorku chlorotetracykliny o stopniu czystości 890 γ/mg . Przez przekrystalizowanie otrzymuje się produkt o stopniu czystości 960 γ/mg ; wydajność wynosi 82%, obliczona w stosunku do całkowitej ilości antybiotyku w cieczy fermentacyjnej.

Przykład V. 5 litrów cieczy fermentacyjnej, otrzymanej według sposobu podanego w przykładzie IV, w

której zawartość chlorotetracykliny wynosi 5039 γ /ml, poddaje się przeróbce jak w przykładzie IV, jednak z tą różnicą, że zamiast $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ stosuje się do strącania metawolframian potasowy ($\text{K}_2\text{W}_4\text{O}_{13} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) w stosunku 1,2:1 do ogólnej ilości chlorotetracykliny.

Po przekrystalizowaniu otrzymuje się czysty chlorowodorek tetracykliny o stopniu czystości 980 γ /mg. Wydajność po przekrystalizowaniu wynosi 82%.

Przykład VI. 2 litry cieczy fermentacyjnej oksytetracykliny, z której usunięto grzybnię i która zawiera 6200 γ /ml oksytetracykliny zadaje się 47 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, rozpuszczonego w 100 ml destylowanej wody; następnie wartość pH nastawia się 10%-owym kwasem solnym na 2,0. Strącony osad pozostawia się w spokoju na okres 4 godzin i następnie filtruje. Osad z sączka zawiesza się w 700 ml destylowanej wody i rozpuszcza przez ponowne dodanie 10%-owego wodorotlenku sodowego do wartości pH = 8,5.

Po rozpuszczeniu osadu powtórnie strąca się kompleks wolframian — antybiotyk 20%-owym kwasem solnym, który dodaje się do osiągnięcia wartości pH = 1,5. Strącony kompleks pozostawia się w spokoju w ciągu 6 godzin, następnie osad odfiltrowuje się i przemywa wodą zakwaszoną do wartości pH = 1,5. Przemyty osad zdejmuje się z sączka i zawiesza w destylowanej wodzie, następnie dodaje się 10%-owego wodorotlenku sodowego aż osad całkowicie przejdzie do roztworu i roztwór osiągnie wartość pH = 9,0.

Przez dodanie do otrzymanego roztworu 20%-owego kwasu solnego wartość pH zmniejsza się do 7,5 i następnie dodaje się 40 g stałego chlorku amonowego i natychmiast potem 70 ml 20%-owego roztworu chlorku wapniowego i na koniec wkrapla 10%-owy roztwór wodorotlenku sodowego aż do wartości pH = 8,0 — 8,2.

Wydzielony osad pozostawia się w spokoju w ciągu 6 godzin i następnie filtruje. Osad przemywa się 60 ml destylowanej wody, która zawiera 1 g chlorku wapniowego. Przesącz przechowuje się do świeżego strącenia antybiotyku w następnej szarży lub do regeneracji wolframianu.

Przemytą sól wapniową oksytetracykliny suszy się pod obniżonym ciśnieniem 30 do 40 mm Hg w temperaturze 40°C. Suchą sól wapniową ekstrahuje się 2,5 litrami metanolu, do którego dodano 25 ml stężonego kwasu solnego. Roztwory łączy się, filtruje i zadaje w temperaturze 40°C 10 g węgla aktywnego. Węgiel aktywny odfiltrowuje się i przemywa 100 ml zakwaszonego metanolu, a filtrat przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną 200 g Amberlite'u IR 1100 (szkielet polistyrenowy z czwartorzędowymi grupami amoniowymi) i następnie kolumnę przemywa się 200 ml metanolu. Roztwór odprowadzony z kolumny zatęża się pod próżnią do objętości 1 litra, dodaje 40 ml stężonego kwasu solnego i powtórnie destyluje, aż zaczną wydzielać się kryształy. Po ochłodzeniu przebiega dalsza krystalizacja, która trwa około 10 godzin. Wydajność wynosi 89%, stopień czystości chlorowodoru oksytetracykliny wynosi 900 γ /mg.

Przykład VII. 2 litry cieczy fermentacyjnej, którą otrzymano w sposób podany w przykładzie VI, poddaje się obróbce w taki sam sposób, jednak z tą różnicą, że do strącania stosuje się 14 g metawolframianu amonowego ($(\text{NH}_4)_2\text{W}_4\text{O}_{13} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) i do ekstrakcji soli wapniowej stosuje się zamiast metanolu 2 litry ketonu izobuty-

lowego, nasyconego wodą i 30 ml stężonego kwasu solnego. Wydajność wynosi 92%, stopień czystości 800 γ /mg.

Przykład VIII. Z 10 litrów cieczy fermentacyjnej o zawartości oksytetracykliny 4100 γ /ml, oddziela się grzybnię w sposób opisany w przykładzie I. Do dalszego przerobu bierze się 5 litrów i zmniejsza wartość pH do 1 przez dodanie 10%-owego kwasu solnego, następnie dodaje się jeszcze 30 g stężonego roztworu $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i wartość pH z powrotem nastawia się na 1,0 przez dodanie 10%-owego kwasu solnego.

Osad pozostawia się do odstania w ciągu 4 godzin i następnie filtruje. Przesącz zawiera 41 γ /ml oksytetracykliny, to znaczy że z roztworu wydzielono 99,49% ogólnej ilości antybiotyku. Osad usuwa się z sączka, zawiesza w 800 ml destylowanej wody i zadaje 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 8,5. Roztwór filtruje się i przesącz powoli zadaje się 10%-owym kwasem solnym, aż do osiągnięcia wartości pH = 1,0. Wydzielony kompleks ponownie filtruje się, osad zdejmuje się z sączka i ponownie zawiesza w 1 litrze destylowanej wody i przez dodawanie 10%-owego wodorotlenku sodowego nastawia się na pH = 7,5 — 8,0. Alkaliczny roztwór przepuszcza się z szybkością przepływu 15 ml/minutę przez dwie kolumny wypełnione kationitem Duolite C-25. Ciecz odprowadzoną z drugiej kolumny przechowuje się i stosuje do regeneracji wolframianu.

Antybiotyk eluuje się z wymiennicza 3 litrami 1 n roztworu wodorotlenku amonowego, który najpierw przepuszcza się przez drugą kolumnę i następnie przez pierwszą. Otrzymany odciek zatęża się pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 45°C do objętości 1 litra.

Stężony roztwór rozcieńcza się 500 ml destylowanej wody i następnie z szybkością 15 ml/minutę przepuszcza się przez kolumnę o średnicy 2 cm wypełnioną 300 g Amberlite IRC 411. Ciecz, którą odprowadzono z kolumny, zatęża się pod próżnią do objętości 500 ml. Do tej zatężonej cieczy wprowadza się kwas solny do osiągnięcia wartości pH = 1,5 i zatęża znów do objętości 100 ml. Otrzymany roztwór nasyca się chlorkiem sodowym i powoli studzi. Wydzielone kryształy odfiltrowuje się, przemywa 20 ml zimnej oddestylowanej wody i suszy pod próżnią. Wydajność wynosi 84%, stopień czystości 880 γ /mg.

Przykład IX. 5 litrów cieczy fermentacyjnej zawierającej 6200 γ /ml tetracykliny, oddziela się od grzybni w sposób opisany w przykładzie I. Do odfiltrowanej cieczy fermentacyjnej o wartości pH = 2,0 wprowadza się 42 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, rozpuszczonego w 200 ml wody i następnie dodaje się 10%-owego kwasu solnego aż do osiągnięcia wartości pH = 2,0.

Osad pozostawia się do odstania na okres 4 godzin i następnie filtruje. Osad usuwa się z sączka, zawiesza w 500 ml destylowanej wody i zadaje 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 8,5. Roztwór filtruje się i do przesączu dodaje się powoli 10%-owego kwasu solnego, aż do uzyskania wartości pH = 1,0. Wydzielony kompleks ponownie filtruje się, osad zawiesza się w 200 ml destylowanej wody i zadaje 10%-owym wodorotlenkiem sodowym aż do osiągnięcia wartości pH = 7,5 — 8,0.

Alkaliczny roztwór przepuszcza się z szybkością przepływu 30 ml/minutę przez kolumnę wypełnioną kationitem Duolite C-25. Roztwór, który odprowadzono z ko-

tumny przepuszcza się ponownie przez kolumnę, wypełnioną takim samym kationitem. Odciek odprowadzony z drugiej kolumny przechowuje się do regeneracji wolframianu.

Antybiotyk eluuje się z wymiennika za pomocą 31 g 1n-wodorotlenku amonowego, który przepuszcza się najpierw przez drugą kolumnę i następnie przez pierwszą; otrzymany odciek zatęża się pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 40°C do objętości 400 ml i następnie z szybkością 20 ml/minutę przepuszcza przez kolumnę wypełnioną Amberlite IRC 411. Roztwór, który wypływa z kolumny, zatęża się pod próżnią do objętości 200 ml i nastawia 10%-owym kwasem solnym wartość pH na 3,8; wtedy roztwór nasycy się kryształami tetracykliny.

Otrzymaną mieszaninę miesza się w ciągu 2 godzin i pozostawia na noc w lodówce. Następnie mieszaninę filtruje się, osad zasady tetracykliny suszy się na powietrzu i liofilizuje. Wydajność wynosi 78%, stopień czystości — 830 γ/mg.

Przykład X. 5 litrów cieczy fermentacyjnej otrzymanej według przykładu IX zadaje się 36 g parawolframianu sodowego ($\text{Na}_6\text{W}_7\text{O}_{24} \cdot 16\text{H}_2\text{O}$) i wartość pH nastawia się 10%-owym kwasem solnym na 1,5. Następnie w czasie mieszania dodaje się 150 g Dicalite 4180 i następnie filtruje.

Osad zawiesza się w 1,5 litra destylowanej wody i zadaje 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 8,5. Zawiesinę filtruje się i osad przemywa 500 ml wody o wartości pH = 10,0. Główny przesącz i przesącz z przemywania łączy się i następnie ponownie strąca się kompleks wolfram — tetracyklina przez dodanie 20%-owego kwasu solnego do wartości pH = 2,0. Strącony kompleks ponownie filtruje się ze 100 g Dicalite i przemywa 100 ml destylowanej wody zakwaszonej do wartości pH = 2,0. Przemyty osad zawiesza się w 600 ml destylowanej wody i zawiesinę zadaje 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 9,0 i następnie ponownie filtruje.

Osad przemywa się 400 ml destylowanej wody o wartości pH = 9,0 — 10,0. Przesącz łączy się, zakwasza się 10%-owym kwasem solnym do wartości pH = 7,5 i następnie dodaje 60 g chlorku amonowego. Następnie dodaje się jeszcze 160 ml 20%-owego roztworu chlorku wapniowego i 10 ml 1%-owego alkoholowego roztworu chlorku dodecylokarbamylometylo- benzylo-dwumetylo- amoniowego i wkrapla 10%-owy roztwór wodorotlenku sodowego do wartości pH = 8,0 — 8,2. Wydzieloną sól wapniową tetracykliny filtruje się przy użyciu 50 g Dicalite'u. Osad przemywa się 80 ml destylowanej wody zawierającej 1 g chlorku wapniowego.

Przesącz stosuje się do regeneracji wolframianu. Przemytą sól wapniową tetracykliny suszy się pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 40—45°C. Suchą sól wapniową ekstrahuje się stopniowo 2 litrami metanolu, zawierającego 25 ml stężonego kwasu solnego. Wyciągi łączy się i filtruje. Przefiltrowany wyciąg zadaje się 5 g węgla aktywnego, podgrzewa do temperatury 40°C i szybko filtruje. Przefiltrowany wyciąg zadaje się 5 g węgla aktywnego, przemywa 100 ml zakwaszonego metanolu. Przesącz łączy się i metanol oddestylowuje się pod próżnią.

Destylację prowadzi się tak długo, aż oddestyluje 1,5 litra metanolu. Następnie wprowadza się 200 ml destylowanej wody i destyluje dalej, aż do oddestylowania

600 ml metanolu. Pozostałość podestylacyjną zadaje się 10%-owym wodorotlenkiem sodowym aż do uzyskania wartości pH = 3,8 — 4,0 i zaszczepia kryształami izoelektrycznej tetracykliny. Otrzymaną mieszaninę miesza się w ciągu 2 godzin i pozostawia do krystalizacji na okres 14 godzin w lodówce. Wydzielone kryształy zasady tetracykliny przemywa się n-butanolem i wodą i suszy na powietrzu. Wydajność wynosi 92%, stopień czystości 800 γ/mg.

Przykład XI. 5 litrów cieczy fermentacyjnej poddaje się obróbce w sposób opisany w przykładzie X, z tym, że stosunek wagowy parawolframianu sodowego, który potrzebny jest do strącania, obliczony jako $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, do tetracykliny zmienia się z 0,5 : 1 na 4,0 : 1. Wyniki podane są w następującej tablicy.

$\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: tetracyklina	Wydajność %	Stopień czystości γ/mg
0,5 : 1	38,5	890
0,7 : 1	59,4	870
0,8 : 1	75,4	820
1,0 : 1	80,2	840
1,2 : 1	91,5	860
1,3 : 1	92,0	840
1,5 : 1	89,0	870
1,7 : 1	78,0	710
2,0 : 1	76,0	730
2,4 : 1	72,0	700
2,8 : 1	77,0	650
3,0 : 1	70,2	690
3,5 : 1	65,0	700
4,0 : 1	63,5	700

Wydajność jest przeliczona na produkt końcowy a nie na tetracyklinę wydzieloną z cieczy fermentacyjnej.

Przykład XII. 2 litry cieczy fermentacyjnej według przykładu X obrabia się w sposób opisany w tym przykładzie, przy czym jednak odmiennie od niego wartość pH roztworu przed strąceniem parawolframianem sodowym wynosi od 0,5 do 7,0. Wyniki są podane w następującej tablicy:

pH	Wydajność %	Stopień czystości γ/mg
0,5	95,0	880
0,7	94,3	890
0,9	93,5	870
1,1	95,0	800
1,3	93,0	850
1,5	92,0	860
1,7	93,0	850
2,0	92,0	840
2,5	89,0	820
3,5	70,0	700
4,0	70,8	750
4,5	58,0	700
5,0	40,0	700
6,0	40,0	580
7,0	25,0	380

Przykład XIII. 10 litrów zanieczyszczonego wodnego roztworu zawierającego 800 γ /ml bromotetracykliny, zakwasza się 10%-owym kwasem solnym do wartości pH = 2,0 i zadaje 12 g $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i silnie miesza w ciągu $\frac{1}{2}$ godziny.

Wydzielony osad kompleksu wolframanu z bromotetracykliną pozostawia w spokoju na okres 2 godzin i następnie filtruje. Osad zawiesza się w 300 ml wody, zawiesinę zadaje się 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 9,0 i następnie szybko filtruje. Przesącz zadaje się 10%-owym kwasem solnym do wartości pH = 2,0, pozostawia w spokoju na okres 4 godzin i następnie filtruje. Osad przemywa się 400 ml wody zakwaszonej 10%-owym kwasem solnym.

Przemyty osad rozpuszcza się przez dodanie 10%-owego wodorotlenku sodowego aż do osiągnięcia wartości pH = 9,5; następnie dodaje się 20%-owego kwasu solnego do wartości pH = 7,5 i 20 g chlorku amonowego i natychmiast potem 150 ml 20%-owego roztworu chlorku wapniowego.

Podczas mieszania dodaje się 10%-owego roztworu wodorotlenku sodowego aż do wartości pH = 8,5 i miesza jeszcze dalsze pół godziny. Osad odfiltrowuje się, przemywa 200 ml destylowanej wody i suszy pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 30—45°C. Osad ekstrahuje się 800 ml metanolu zakwaszonego 200 ml stężonego kwasu solnego.

Wyciąg filtruje się i zatęża pod obniżonym ciśnieniem 30 mm Hg w temperaturze 30°C do objętości 200 ml. Pozostałość po odparowaniu rozcieńcza się 100 ml destylowanej wody i w czasie silnego mieszania zadaje się jeszcze 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 4,5—5,0; następnie mieszanie pozostawia w spokoju na okres 1 godziny. Wydzielony osad filtruje się, przemywa destylowaną wodą i suszy przez liofilizację. Wydajność wynosi 86%, stopień czystości zasady bromotetracykliny — 750 γ /mg.

Przykład XIV. 10 litrów roztworu, zawierającego 1000 γ /ml bromotetracykliny poddaje się obróbce w taki sposób jak opisano w przykładzie XIII, jednak z tą różnicą, że metanolową pozostałość po destylacji w próżni zaszczenia się 20 g chlorku sodowego i następnie dodaje 15 ml stężonego kwasu solnego i na noc pozostawia w spokoju.

Wydzielone kryształy chlorowodoru bromotetracykliny przemywa się zimną wodą i suszy w próżni. Wydajność wynosi 80%, stopień czystości 700 γ /mg.

Przykład XV. 10 litrów cieczy fermentacyjnej, zawierającej 980 γ /ml demetylochlorotetracykliny, z której usunięto grzybnię w sposób opisany w przykładzie I, zadaje się 12 g parawolframanu potasowego. Po dodaniu parawolframanu potasowego wartość pH nastawia się 10%-owym kwasem solnym na 1,5. Mieszanie pozostawia się w spokoju na okres 4 godzin i następnie filtruje. Osad przemywa się wodą zakwaszoną do wartości pH = 1,5, zawiesza w 300 ml destylowanej wody i powoli zadaje się 10%-owym wodorotlenkiem sodowym do wartości pH = 8,5 i filtruje; do przesączu doprowadza się 10%-owy kwas solny do wartości pH = 7,5, 30 g chlorku amonowego i 65 ml 20%-owego roztworu chlorku wapniowego. Następnie podczas silnego mieszania dodaje się 20%-owego kwasu solnego do wartości pH = 6,5.

Wydzieloną sól wapniową demetylochlorotetracykliny filtruje się i przemywa 40 ml wody. Przesącze przecho-

wuje się do późniejszej regeneracji wolframanu. Przemytą sól wapniową suszy się w próżni, następnie stopniowo ekstrahuje się 1,5 litra metanolu, do którego dodano 20 ml stężonego kwasu solnego. Przesącze łączy się, zadaje 8 g węgla aktywnego, podgrzewa do temperatury 40°C i szybko filtruje. Osad węgla aktywnego przemywa się 50 ml zakwaszonego metanolu. Metanolowy wyciąg z szybkością przepływu 10 ml/minutę przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną Amberlite'm IRC 50. Kolumnę przemywa się 100 ml zakwaszonego metanolu. Po przemyciu kolumny ciecz odprowadzoną zatęża się w próżni do objętości 400 ml; następnie dodaje się 10 ml stężonego kwasu solnego, po czym mieszaninę zatęża się do objętości 100 ml i pozostawia w spokoju na okres 24 godzin. Wydzielone kryształy chlorowodoru demetylochlorotetracykliny przemywa się metanolem i odfiltrowuje się. Wydajność wynosi 86%, stopień czystości 680 γ /mg.

Przykład XVI. 5 litrów zanieczyszczonego wodnego roztworu, zawierającego 1200 γ /ml dezoksytetracykliny poddaje się obróbce w taki sam sposób, jak opisano w przykładzie XV, z tym, że do strącenia kompleksu wolfram — antybiotyk stosuje się 16 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Wydajność wynosi 91%, stopień czystości 740 γ /mg.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wydzielania czystych antybiotyków grupy tetracykliny z roztworów, zwłaszcza z cieczy fermentacyjnej, z której oddzielono grzybnię za pomocą zakwaszenia i odsączenia, **znamienny tym**, że do roztworu zawierającego antybiotyk dodaje się kwas wolframowy albo jego sole w stosunku wagowym do antybiotyku od 0,5:1 do 4,0:1, korzystnie 1,2:1 do 1,5:1 w przeliczeniu na $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, przy wartości pH = 0,5—7,0, korzystnie 1,0—2,5, po czym wytrącony osad odsącza się i zadaje 10—20%-owym roztworem wodorotlenku sodowego aż do osiągnięcia wartości pH = 8,5—10 i z otrzymanego roztworu wydziela się antybiotyk w znany sposób, korzystnie solami wapnia i/albo magnezu, i/albo za pomocą wymieniaczy jonowych.

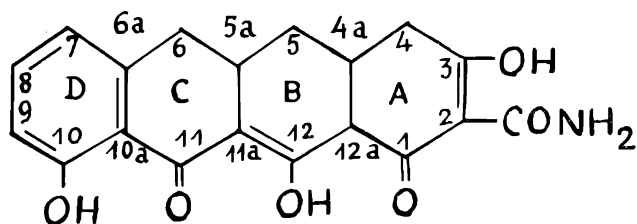
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że z otrzymanego roztworu o wartości pH = 8,5—10 wydziela się antybiotyk przez dodanie 10%—20%-owego roztworu kwasu solnego aż do wartości pH około 7,5 i następnie stałego chlorku amonowego w stosunku wagowym od 1:1 do 1:3, i 10—20%-owego roztworu chlorku wapniowego lub chlorku magnezowego w stosunku wagowym od 1:1 do 1:4, po czym z wydzielonego przez filtrację osadu ekstrahuje się antybiotyk organicznym rozpuszczalnikiem, takim jak metanol lub keton metyloizobutyloowy.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że metanolowy wyciąg antybiotyku przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną kationitem, na przykład Amberlite IR 110.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że z otrzymanego roztworu o wartości pH = 8,5—10 wydziela się antybiotyk za pomocą kationitu, na przykład Duolite C-25, po czym antybiotyk eluuje się 1n — 4n roztworem wodorotlenku amonowego, a następnie odciek przepuszcza się przez anionit, na przykład Amberlite IRC 411.

5. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że do roztworu zawierającego antybiotyk dodaje się kwas wolframowy, zregenerowany w znany sposób, z przesączu otrzymanego po odfiltrowaniu soli wapniowej lub mag-

nezowej antybiotyku grupy tetracykliny przez zakwaszenie tego przesączu stężonym kwasem solnym lub kwas wolframowy odzyskany w postaci odcienku po oddzieleniu antybiotyku na kationicie.



WZÓR