



P.- 4552.  
-----  
Case NP. 29-Nº. 38660.-

172377

REPLAZA LA REPRODUCCION  
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

172377

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de HOFFMANN-LA ROCHE, INC., entidad norteamericana, establecida en Roche Park, Nutley, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PREPARAR PENICILINA PURIFICADA".

Este invento se refiere a la elaboración de preparados purificados de penicilina. La elaboración de estos preparados partiendo de productos brutos es cosa relativamente nueva, y poco se sabe acerca de procedimientos técnicamente factibles que den satisfactorios resultados. Los preparados de penicilina impuros obtenidos de mohos que producen penicilina contienen a menudo hasta un 90% de productos secundarios inactivos, la mayoría de naturaleza ácida y algunos de ellos intensamente coloreados, y la separación de la mayoría de, las impurezas, ya que no de todas, es altamente deseable para obtener preparados terapéuticos completamente satisfactorios.

Abraham y Chain, en "The British Journal of Experimental Pathology", vol. XXIII, junio 1942, pag. 103 y siguientes.



172377

tes, describen el uso de óxido de aluminio como absorbente en una columna cromatográfica para la purificación de un preparado bruto de penicilina libre disuelta en éter. Según la experiencia de los presentes inventores, este método no permite una separación suficiente de los productos secundarios intensamente coloreados.

Catch y otro, en "Nature", vol. 150, nº. 3813, pag. 633, 28 de noviembre, de 1942, al decir que sus tentativas de purificar el material por el procedimiento de Abraham y Chain tenían poco éxito, desarrollaron un método para la purificación parcial de penicilina bruta que consiste en hacer pasar una solución de penicilina impura libre en un disolvente orgánico, tal como éter o acetato amílico, por una columna de gel de sílice hidratado que contiene una base inorgánica. Los actuales inventores han comprobado que este método cromatográfico es igualmente insatisfactorio en cuanto a la separación de las impurezas coloreadas como ocurre con el método de Abraham y Chain.

Es, pues, un objeto del invento desarrollar un procedimiento por el cual los preparados impuros de penicilina se purifican suficientemente de manera técnicamente eficaz, para dar preparados incoloros o solo ligeramente coloreados que son menos irritantes, menos tóxicos y más estables que los preparados de penicilina hasta ahora conocidos. Se ha descubierto que este objeto puede conseguirse por la purificación gradual de un preparado impuro, que implica cromatografiar el preparado impuro en orden reversible (1) haciendo pasar una solución de la penicilina libre impura en un disolvente orgánico por una columna de un silicato de magne-



172377

sio, y extrayendo la penicilina del absorbente y (2) haciendo pasar una solución acuosa de una sal de metal alcalinotérrico de la penicilina impura por una columna de óxido aluminico, y aislando la penicilina del producto colado.

5                   Se ha descubierto que o el procedimiento (1) solo o el procedimiento (2) solo, aplicados a preparados de penicilina impuros, rinden un producto purificado que es satisfactoriamente puro para fines terapeuticos y tiene una actividad de hasta 1.000 unidades Oxford por mg. y aun más alta. Combinando los dos procedimientos hemos descubierto  
10 con sorpresa, que, sin tener en cuenta el orden de las operaciones en el método combinado, resulta un producto con un grado de pureza mucho mayor del que puede obtenerse sólo por cualquiera de los procedimientos y que estos preparados  
15 altamente purificados, que sólo tienen ligero color y poseen una actividad de hasta 1.400 unidades Oxford por mg. pueden convertirse fácilmente y con buen rendimiento en la sal sódica de penicilina incolora, anhidra y cristalina.

20                   La técnica anterior no ha puesto en claro la cuestión de si los mohos que producen la penicilina rinden el mismo principio activo en cultivos superficiales y sumergidos en el caso de que se empleen diferentes géneros de mohos productores de penicilina. Cuando se aplica a los métodos  
25 solos o en combinación, con preparaciones impuras obtenidas de cultivos de superficie o sumergidos de diversos géneros de mohos productores de penicilina, nos sorprendió observar que, a pesar de las diferencias en las cantidades y naturaleza de las impurezas contenidas en los materiales brutos de partida, no sólo se obtenían igualmente buenos resulta-



dos de purificación en cada caso, sino que también eran idénticas las respectivas sales sódicas cristalinas. Así, en el siguiente texto y en las reivindicaciones, cuando nos referimos a preparados de penicilina y a las sales sódicas cristalinas obtenidas de los mismos, nos referimos a los preparados y sales obtenidos de soluciones resultantes de cultivos tanto superficial como sumergido de cualquier mocho productor de penicilina.

La purificación cromatográfica de preparados de penicilina impuros en forma de soluciones acuosas de sus sales de metales alcalinotérreos en columnas de óxido de aluminio es nueva, pues Abraham y Chain, como se ha dicho arriba, hicieron pasar preparados brutos de penicilina libre disueltos en éter sobre óxido de aluminio. Hemos descubierto que el procedimiento es muy sencillo y eficaz para la separación de la mayoría de los productos secundarios coloreados e incoloros. Las impurezas quedan retenidas en la columna, al paso que la penicilina purificada pasa por la columna y puede fácilmente aislarse con buen rendimiento del producto colado. Se cree que esto es una observación única. La técnica anterior no ofrece ninguna razón que permita esperarla, y se ha descubierto que las sales de metales alcalinos de preparados de penicilina impuros no dan resultados de purificación satisfactorios cuando se hacen pasar en solución acuosa por columnas de óxido de aluminio.

También se ha descubierto que los silicatos de magnesio son adsorbentes mucho mejores para la purificación cromatográfica de preparados impuros de penicilina libre, que los otros adsorbentes ya descritos en la bibliografía. Usán-



172377

dolos obtenemos rendimientos mucho más altos de penicilina purificada, ya que prácticamente no hay destrucción de actividad en este proceso de purificación. El material activo puede lavarse con facilidad del adsorbente por medio de agua o de un neutralizador acuoso adecuado.

Los preparados de sal sódica de penicilina, altamente purificados, obtenidos por el uso de estos dos procedimientos, al ser tratados con disolventes orgánicos anhidros, por ejemplo de naturaleza cetónica o alcohólica, rinden preparados cristalinos de la sal sódica de penicilina. Se obtienen preparados de sal sódica de penicilina completamente incoloros y cristalinos, en forma anhidra, por recristalización de una mezcla de dichos disolventes orgánicos. Así, empezando con un preparado de penicilina impuro de un cultivo sumergido de *Penicillium notatum*, género nº. 832 (Laboratorio Regional Septentrional de Investigaciones del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos, que en adelante se llamará NRRL), después de purificación cromatográfica usando los dos métodos aquí expuestos, y recristalización de la sal sódica altamente purificada de mezclas de metanol e isopropanol, se obtuvo una sal sódica de penicilina cristalina e incolora, que se comprobó ser anhidra, y que tenía una rotación óptica constante de  $[\alpha]_D^{25} = + 300^\circ$  en una solución acuosa al 1% a pH 6. Una muestra de una sal sódica de penicilina cristalina anhidra obtenida de manera análoga de cultivos superficiales de *Penicillium notatum*, género nº. 1249-B21 (NRRL), resultó ser idéntica por todos conceptos al preparado obtenido de los cultivos sumergidos. La actividad de ambos preparados era de unas 1.600 a 1.700 unidades Oxford



72577

por mg.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento:

Ejemplo 1.

5 6 g. de sal magnésica impura de penicilina de una actividad de 350 unidades Oxford por mg. (un total de 2,1 millones de unidades) se disolvieron en 150 cm<sup>3</sup> de agua. Luego la solución intensamente coloreada se vertió en una columna (3 cm. x 32 cm.) de 200 g. de óxido de aluminio lavado con agua de un grado cromatográfico. Cuando la solución

10 ción hubo pasado a la columna, el cromatograma se desarrolló con agua a 7° C. El producto colado se recogió tan pronto como mostró un vestigio de coloración amarilla, y se tomaron tres fracciones de 260 cm<sup>3</sup>, 240 cm<sup>3</sup> y 236 cm<sup>3</sup> respectivamente. Las tres fracciones se enfriaron luego a 0° C,

15 y cada una de ellas, después de acidificar a pH 3 con ácido fosfórico al 10%, se extrajo con 300 cm<sup>3</sup> de acetato butílico. En lugar de acetato butílico, pueden usarse otros acetatos, cloroformo, éter y disolventes orgánicos similares para extraer la penicilina. Las tres soluciones de acetato butílico, después de secarlas con sulfato sódico, fueron extraídas con pequeñas cantidades de una solución acuosa de hidróxido sódico 0.1 N, hasta que los extractos combinados de cada una de las tres fracciones llegaron a un pH de

20 6.5. Luego se congelaron y secaron en el vacío. Se obtuvieron tres fracciones de una sal sódica de penicilina de amarillo claro, de las cuales las dos primeras contenían prácticamente toda la actividad.

25

<u>Fracción</u>	<u>Sal sódica peso</u>	<u>Actividad Unidades Oxford/mg</u>	<u>Porcentaje recuperación de actividad.</u>
1	1.12 g	1.100	59%
2	0.60 g	1.100	31%
			90%

MALA REPRODUCCION  
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



1945

172377

- 7 -

En vez de hidróxido sódico diluido, pueden emplearse soluciones de carbonato o de bicarbonato sódico para extraer la penicilina purificada de su solución en un disolvente orgánico. Usando soluciones o respectivamente suspensiones acuosas de hidróxido amónico, hidróxido lítico, hidróxido bórico, carbonato cálcico, carbonato estróncico, carbonato magnésico, óxido magnésico u otros hidróxidos, óxidos, carbonatos o bicarbonatos alcalinos o alcalinotérreos se obtienen las correspondientes sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de penicilina purificadas, después de congelar y secar las correspondientes soluciones.

Ejemplo 2.

Una solución de 1 g. de sal magnésica de penicilina bruta, de una potencia de 324 unidades Oxford por mg en 25 cm<sup>3</sup>. de agua se vertió en una columna (1.8 cm. x 15 cm.) de 32 g. de óxido aluminico lavado con agua de grado cromatográfico. Cuando la solución parda oscura hubo pasado a la alumina, el cromatograma se desarrolló a 7° C con agua adicional. El producto colado se recogió en dos fracciones de 45 cm<sup>3</sup> y 50 cm<sup>3</sup> respectivamente, tan pronto como mostró el primer vestigio de color amarillo. El pH de estas soluciones era de 7.5 y se ajustó a 6.5 con ácido fosfórico diluido. Luego las soluciones se congelaron y secaron en el vacío. Así se obtuvieron dos fracciones de sales de penicilina purificada de amarillo claro. La fracción 1 pesaba 0.15 g. y tenía una potencia de 920 unidades Oxford por mg; la fracción 2 pesaba 0.14 g. y dió en el ensayo 1.128 unidades Oxford por mg. Esto representa una recuperación de 90% de la actividad contenida en el material de partida.



1946

112577

Ejemplo 3.

3 g. de sal cálcica de penicilina impura de una potencia de 440 unidades Oxford por mg. (un total de 1,32 millones de unidades) se disolvieron en 60 cm<sup>3</sup> de agua a 7° C. La solución intensamente coloreada se vertió luego en una columna (2.3 cm. x 27 cm.) de 90 g. de óxido aluminico lavado con agua, de grado cromatográfico. Cuando la solución hubo pasado a la columna, el cromatograma se desarrollo con agua. El producto colado se recogió tan pronto como mostró un vestigio de coloración amarilla, recogiéndose en total 360 cm<sup>3</sup>. El producto colado se enfrió luego a 0° C, se acidificó a pH 3 con ácido fosfórico al 10% y se extrajo con 400 cm<sup>3</sup> de acetato butílico. Después de secar con sulfato sódico anhidro, la solución de acetato butílico se extrajo con pequeñas cantidades de una solución acuosa de hidróxido sódico 0.05 N, hasta que el pH del extracto llegó a 6.5. La solución acuosa se congeló luego y secó en el vacío. Se obtuvieron 0.92 g. de una sal sódica de penicilina de amarillo claro, que en el ensayo dió 960 unidades Oxford por mg., y representaba el 67% de la actividad total presente en el material de partida.

Ejemplo 4.

25 g. de sal sódica de penicilina bruta, que en el ensayo daba 380 unidades Oxford por mg. (un total de 9,5 millones de unidades), se disolvieron en 1.000 cm<sup>3</sup> de agua. La solución se enfrió a 0° C, se acidificó con ácido fosfórico diluido a pH 3 y la penicilina libre se extrajo en 1200 cm<sup>3</sup> de acetato butílico. Luego la solución de acetato butílico se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se hizo pasar a pre-



1946

172377

sión de 0.56 Kgs. de nitrógeno por una columna que contenía una mezcla de 150 g. de trisilicato magnésico y 100 g. de un auxiliar filtrante neutro no adsorbente, suspendido en acetato butílico. Las dimensiones de la columna eran 4.5 cm. x 38 cm. Se seccionó mecánicamente sin ulterior desarrollo. La mayor parte del tercio superior de la columna contenía una faja que mostraba una fluorescencia muy ligera a la luz ultravioleta. De esta parte de la columna se obtuvieron 10.46 g. de una sal bárica de penicilina purificada lavando la penicilina con un neutralizador fosfático de pH 7.5, extrayendo de la solución neutralizadora enfriada y acidificada (pH 3) la penicilina en éter y agitándola con pequeñas cantidades de una solución acuosa de hidróxido bárico 0.1 N, hasta que el pH del extracto acuoso hubo llegado a 6.5. Luego la solución acuosa se congeló y secó en el vacío. La potencia de la sal bárica de penicilina purificada era de 780 unidades Oxford por mg. Así se obtuvieron 8.16 millones de unidades Oxford de material purificado que representaban una recuperación de 86%.

20

Ejemplo 5.

16.8 g. de una sal sódica de penicilina bruta, que en el ensayo dió 412 unidades Oxford por mg. (un total de 6.92 millones de unidades) se disolvieron en 1.000 cm<sup>3</sup> de agua. La solución se enfrió a 0° C, se acidificó con ácido fosfórico diluido a pH 3, y la penicilina libre se extrajo en 2.000 cm<sup>3</sup> de éter. Luego la solución de penicilina en éter se secó sobre sulfato sódico anhidro. Se preparó una columna cromatográfica que medía 4.5 cm. x 38 cm., y contenía 150 g. de trisilicato magnésico y 100 g. de un auxiliar

25



1946

112577

filtrante inadsorbente suspendido en éter. La solución de penicilina en éter se hizo pasar por dicha columna a presión de 0.42 Kgs. de nitrógeno y luego la columna se desarrolló con 1500 cm<sup>3</sup> de éter. El tercio superior de la columna contenía todo el material activo. Se seccionó en tres partes, y la penicilina se recuperó en la forma habitual por lavado con un neutralizador fosfático de pH 7.5. De las soluciones neutralizadas frías y acidificadas se extrajo la penicilina con éter, y del éter se extrajo con hidróxido bórico acuoso 0.1 N. Las soluciones de la sal bórica neutra se congelaron y secaron en el vacío. De la sección media del tercio superior de la columna se obtuvieron así 3.89 g. de sal bórica de penicilina purificada que dió en el ensayo 1.015 unidades Oxford por mg. Esto representa un total de 3.95 millones de unidades, o sea una recuperación del 57% de la actividad presente en el material de partida. El resto de la actividad se obtuvo de las dos secciones restantes del tercio superior de la columna en forma de sal bórica de penicilina menos activa.

Ejemplo 6.

Aislamiento de la sal sódica de penicilina cristalina de cultivos sumergidos de *Penicillium notatum* (género n°. 832 NRRL).

El material de partida para estos experimentos fue sal sódica de penicilina bruta de una potencia de 200-300 unidades Oxford por mg. Se preparó de este material en la forma ordinaria una solución de penicilina libre en acetato butílico, disolviéndolo en agua, acidificando la solución fría a pH 3 con ácido fosfórico diluido y extrayendo la penicilina libre con acetato butílico. La solución de acetato



1945 1/2577

butílico, que contenía aproximadamente 3.000.000 de unidades Oxford por litro se empleó para la purificación cromatográfica sobre trisilicato magnésico, como se describe luego en 1.

5

1. Cromatograma sobre trisilicato magnésico.

Trisilicato magnésico de grado cromatográfico, 5 g. por gramo de material de partida, se mezcló en acetato butílico con 2/3 de su peso de un auxiliar filtrante neutro y no adsorbente, y se vertió en un tubo para dar una columna aproximadamente 9 veces tan alta como su diámetro. La solución de penicilina en acetato butílico se hizo pasar por esta columna a una presión de 0.35-056 Kgs. de nitrógeno, y luego la columna se desarrolló con acetato butílico, usando un volumen de disolvente igual al de la solución primitiva. El producto colado era amarillo y no contenía material activo. La columna, que mostraba una serie de fajas, se seccionó mecánicamente, y las partes así obtenidas se lavaron con neutralizador de fosfato de pH 7.5. Las soluciones de neutralizador enfriadas y acidificadas (pH 3) se extrajeron con éter, la penicilina se valoró con hidróxido bórico 0.1 N, y las soluciones acuosas así obtenidas se congelaron y secaron en el vacío dando sales bóricas de penicilina secas.

15

20

25

Las fracciones de penicilina mejores se encontraron en el tercio superior de la columna. Se obtuvieron sales bóricas de una potencia hasta de 1.000 unidades Oxford por mg. La recuperación de material activo en estas fracciones fue tan alta como de 70%. El resto del material activo se encontró en las secciones inferiores de la columna. Los preparados más activos de la sal bórica de penicilina se sigue-

Y  
MALA REPRODUCCION  
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

- 12 -



1946

112577

ron purificando como se describe en el número 2 siguiente:

2. Cromatograma sobre óxido aluminico.

5 Una solución acuosa al 20% de la sal b́arica de penicilina purificada se hizo pasar por una columna de óxido aluminico lavado con agua de grado cromatogŕafico. Se emplearon unos 30 g. de óxido aluminico por gramo de material de partida. La columna se desarrolló con agua, recogiendo-  
10 se un total de unos 100 cm<sup>3</sup> de producto colado por gramo de material de partida. El producto colado era de color amarillo claro y contenía el material activo. La mayor parte de los productos secundarios coloreados de la penicilina quedaron en la columna.

15 Del producto colado frío, que se acidificó a pH 3 con ácido fosfórico diluido, se recogió en éter la penicilina libre, y luego se convirtió, en la forma ordinaria, en la sal sódica seca, extrayéndola con hidróxido sódico acuoso 0.1 N, congelando la solución acuosa neutra y secando en el vacío. Los preparados así obtenidos eran de color amarillo claro. Su potencia era tan alta como de 1.400 unidades Oxford por mg. La recuperación de material activo fué hasta  
20 de 80%.

3. Cristalización de la sal sódica de penicilina.

25 Los preparados de sal sódica de penicilina altamente activos obtenidos en la purificación cromatográfica de la penicilina bruta como antes se describe en 1 y 2 pudieron cristalizarse. Se comprobó que el mejor procedimiento era tratar dichos preparados (potencia 1.100-1.400 unidades por mg) primero con acetona seca o isopropanol seco. Este tratamiento quita usualmente la mayor parte del color amarillo, de-



112577

5 jando un residuo en polvo prácticamente blanco de alta actividad (unas 1.400-1.500 unidades por mg.). Este material se cristalizó disolviéndolo en metanol frío y añadiendo isopropanol. Después de reposar en el refrigerador, se formaron agujas incoloras o grupos de prismas cortos, que se purificaron más repitiendo la recristalización de igual modo hasta que se vió que la rotación óptica permanecía inalterable. El  $[\alpha]_D^{25}$  para los preparados más puros se comprobó ser de + 300° (+ 15°) en una solución acuosa al 1% a pH 6.

10 La potencia de la sal sódica de penicilina cristalina pura así obtenida se comprobó ser de por lo menos 1.600-1.700 unidades Oxford por mg., en comparación con una penicilina normal de la comisaría de Comestibles y Drogas, con una potencia de 370 unidades Oxford por mg. Se comprobó que era anhidra, ya que solo se observó una pérdida de peso muy pequeña, cuando la sal cristalina se secó en el vacío sobre pentóxido fosforoso. No se observó pérdida de actividad después de 24 horas de secar a 56°.

15 Se analizaron dos preparados de sal sódica cristalina. Las siguientes cifras representan los valores más bajos y más altos obtenidos para C, H, N, S y Na, usando los métodos microanalíticos conocidos:

C 53.06 - 53.37%; H 4.73 - 5.30%; N 7.42 - 7.83%; S 8.96 - 9.10%; Na 6.53 - 6.78%.

Ejemplo 7.

25 Aislamiento de sal sódica de penicilina cristalina de cultivos superficiales de Penicillium notatum (género nº. 1.249-B21 NRRL).

1. Cromatograma sobre óxido aluminico.

11 g. de sal bórica de penicilina impura de una po-



1946 172377

tencia de 290 unidades Oxford por mg. (un total de 3,19 millones de unidades) se disolvieron en 290 cm<sup>3</sup> de agua a 20°C, y la solución se hizo pasar por una columna (2.7 cm x 41 cm) de 300 g. de óxido aluminico lavado con agua. El producto colado se recogió tan pronto como mostró el primer vestigio de color amarillo, tomándose tres fracciones. Las fracciones segunda y tercera, lo mismo que una parte alícuota de la primera se congelaron y secaron en el vacío. El siguiente cuadro resume los resultados; el peso de la sal seca en la primera fracción está calculado sobre la parte alícuota. Prácticamente toda la actividad estaba presente en esta fracción. La recuperación fué cuantitativa.

<u>Fracción</u>	<u>Cantidad del producto colado</u>	<u>Peso de la sal seca</u>	<u>Ensayo Unidades Oxford/mg</u>
15    1	1.320 cm <sup>3</sup>	3.5 g	930
2	400 cm <sup>3</sup>	0.25 g	40
3	400 cm <sup>3</sup>	0,15 g	40

La primera fracción se enfrió a 0° C tan pronto como se recogió, se acidificó a pH 2.5 con ácido fosfórico al 10% y la penicilina libre se extrajo con dos litros de éter. Después de secar con sulfato sódico anhidro, la solución de éter se usó para la purificación cromatográfica sobre trisilicato magnésico como se describe en el siguiente 2.

2. Cromatograma sobre trisilicato magnésico.

La solución de penicilina en éter se hizo pasar por una columna (2.6 cm. x 20 cm.) compuesta de una mezcla de 28 g. de trisilicato magnésico y 16 g. de un auxiliar filtrante no adsorbente, a presión de 0.42 Kgs. de nitrógeno. El cromatograma se desarrolló con 400 cm<sup>3</sup> de éter. Después de expulsión a presión la columna de trisilicato se cortó



1946

172577

en tres porciones:

- A = Parte superior 3 cm ----- Amarillo brillante.
- B = Centro 10 cm. ----- Amarillo débil.
- C = fondo 7 cm. ----- Amarillo débil con una feja de amarillo brillante en la parte superior.

5

Cada fracción se agitó con 300 cm<sup>3</sup> de un neutralizador de fosfato 1/15 molar de pH 7.2 y, después de filtrado, se lavó con 200 cm<sup>3</sup> de neutralizador reciente. Luego cada locción y lavado combinados se enfriaron a 0° C, se acidificaron a pH 2.5 con ácido fosfórico al 10% y se extrajeron con 400 cm<sup>3</sup> de éter. Después de secar, las soluciones de éter se extrajeron con pequeñas cantidades de solución acuosa de hidróxido sódico 0.03 N hasta que el pH de los extractos acuosos llegó a 6.5. Las soluciones de sal sódica se congelaron luego y secaron en el vacío dando sales sódicas de amarillo claro.

10

15

Los resultados se resumen en el siguiente cuadro:

20

<u>Fracción</u>	<u>Peso de la sal seca</u>	<u>Ensayo unidades Oxford/mg</u>
A	0.17 g	457
B	1.20 g	1.600
C	0.40 g	246

25

La fracción B contenía un total de 1,92 millones de unidades, o 60% de la actividad presente en la sal bruta de penicilina empleada como material de partida.

Cristalización de la sal sódica de penicilina.

30

La cristalización se realizó como se describe en el ejemplo 6, primero tratando la sal sódica de penicilina altamente purificada con isopropanol, y luego recristalizándola de metanol-isopropanol. Se obtuvieron así prismas inco-



172577

5 coloros de la sal sódica anhidra pura, que tenía una potencia de por lo menos 1.600-1.700 unidades Oxford por mg. La rotación óptica en una solución acuosa a pH 6 se encontró ser prácticamente idéntica a la de la sal sódica cristalina obtenida de cultivos sumergidos de *Penicillium notatum*, género 832.  $[\alpha]_D^{25} = +310^\circ (\pm 15^\circ)$ .

Una muestra seca a 56° en el vacío sobre pentóxido de fósforo dió los siguientes resultados microanalíticos:  
 C 52.82 - 53.23%; H 4.72 - 5.07%; N 7.73%; S 8.80 - 9.22%; Na 6.68 - 6.74%

10 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 27 de Junio de 1944, bajo el Número 542.440, se acoge a los beneficios del artículo 51 del Estatuto vigente sobre Propiedad Industrial.

=====  
 =====  
 N O T A  
 =====  
 =====

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

20 1º. Un procedimiento para purificar un preparado impuro de penicilina, caracterizado por cromatografiar una preparación impura de penicilina libre disuelta en un disolvente orgánico, haciéndola pasar por una columna de un silicato magnésico y extrayendo la penicilina absorbida.

25 2º. Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º., caracterizado por el hecho de que el silicato magnésico es trisilicato magnésico.

3º. Un procedimiento según se reivindica en los



1946

112077

puntos 1º. o 2º., caracterizado por desarrollar la columna con un disolvente orgánico, lavar la penicilina adsorbida en una solución acuosa, y extraer el lavado enfriado y acidificado con un disolvente orgánico.

5           4º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º., 2º. o 3º., caracterizado por aislar la penicilina del extracto como una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.

10           5º. Un procedimiento según se reivindica en el punto 4º., caracterizado por el hecho de que dicha sal se cristaliza de un disolvente orgánico de la misma.

15           6º. Un procedimiento para purificar un preparado impuro de penicilina, caracterizado por cromatografiar una solución acuosa de una sal impura de metal alcalinotérreo de penicilina haciéndola pasar por una columna de óxido alu-  
mínico, y aislar la penicilina purificada del producto co-  
lado.

20           7º. Un procedimiento según se reivindica en el punto 6º., caracterizado por desarrollar dicha columna con agua, acidificar el producto colado frío, extraer la penicilina del producto colado acidificado y aislar la penicilina de la solución así obtenida.

25           8º. Un procedimiento según se reivindica en el punto 6º., caracterizado por el hecho de que la sal se aisla congelando y secando el producto colado.

9º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 6º. o 7º., caracterizado por aislar la penicilina como una sal de metal alcalino o alcalinotérreo.

10º. Un procedimiento para purificar un preparado

MALA REPRODUCCION  
POR DEFECTO DEL ORIGINAL 18 -



112577

5

impuro de penicilina, caracterizado por tratar dicho preparado en dos operaciones por el procedimiento reivindicado en cualquiera de los puntos 1º. a 5º., y por el procedimiento reivindicado en cualquiera de los puntos 6º. a 9º., en orden reversible.

11º. Un procedimiento de preparar penicilina purificada.

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

10

Esta Memoria consta de diez y ocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid a 13 SEP. 1946

P. A.

Alberto de Elzaburu  
For Peder  
*[Handwritten Signature]*

M/L/L.