

176753

P - 5522

Nº. 11/9/1690.
Primary Organic Bases
Part II.

MALA REPRODUCCIÓN
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



FEB. 1947

10 FEB. 1947

176753

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de GLAXO LABORATORIES LIMITED, entidad británica,
establecida en Greenford, Middlesex, Inglaterra, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PURIFICAR SALES DE
PENICILINA".

-0-

Este invento se refiere a perfeccionamientos
introducidos en la preparación de sales metálicas purifi-
cadas de penicilina.

5 El vocablo penicilina se emplea un tanto va-
gamente, a veces para denotar la substancia o substancias
ácidas activas producidas en la solución nutritiva sobre
la cual, o en la cual, se cultivan ciertos mohos, especial-
mente el Penicillium notatum, y a veces para denotar una



EB. 1947

76753

5 sal metálica, generalmente la sal sódica o cálcica de dicha substancia o substancias, forma en la cual se prepara y usa normalmente el material activo. En esta Memoria el vocablo será usado con la primera de estas dos significaciones y a las sales de la substancia o substancias activas se les hará referencia como sales de penicilina.

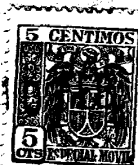
10 En el método usual de fabricación, la penicilina es extraída de la solución nutritiva mediante un disolvente orgánico adecuado, y la penicilina así extraída es convertida en una sal metálica adecuada, generalmente la sal sódica o la cálcica. Con miras a la purificación, la solución acuosa de la sal es a menudo acidificada, la penicilina se somete a nueva extracción y se vuelve a convertir en la sal deseada en solución acuosa, a partir de la

15 cual se prepara la sal sólida. La sal sódica o cálcica de penicilina preparada de este modo va invariablemente acompañada de impurezas, algunas de las cuales están coloreadas, que hacen que el preparado no sólo sea de estabilidad reducida y variable, sino que tenga también ciertos efectos

20 secundarios desagradables, tales como dolor al ser inyectado. La sal sódica o cálcica pura de penicilina es un compuesto blanco, de estabilidad mucho mayor que el producto bruto arriba mencionado y produce menos molestia al ser

25 inyectada.

La purificación de la penicilina o de sus sales metálicas, es decir, la separación de los materiales activos de las impurezas que usualmente los acompañan, es una operación difícil y engorrosa, y el objeto del presen-



1947

176753

te invento es crear un procedimiento nuevo y perfeccionado para la preparación de sales purificadas de penicilina.

En la Memoria de la Patente española No. 176.397 hemos descrito un procedimiento para la preparación de sales metálicas purificadas de penicilina en el cual una solución de penicilina bruta en un disolvente se hacía reaccionar con una o más bases orgánicas primarias adecuadas, como allí se definen, de modo que se formen sales de penicilina de tales bases, las cuales podían obtenerse fácilmente en un estado de gran pureza y ser convertidas con facilidad en sales metálicas, por ejemplo, de sodio o de calcio, correspondientemente puras. En un método preferido de llevar a cabo el procedimiento según se describe en dicha Patente anterior, una solución acuosa de una sal bruta sódica o cálcica de penicilina se acidificaba, y la penicilina bruta resultante se extraía de la solución acuosa en un disolvente adecuado, como allí se define, siendo metilisobutil quetona el disolvente usualmente empleado. Luego, esta solución se utilizaba para preparar la sal de penicilina y de la base primaria.

En el curso de ulteriores investigaciones hemos descubierto que las sales metálicas brutas de penicilina, por ejemplo, las sales del sodio o del calcio, pueden ser convertidas fácilmente en sales virtualmente puras de bases orgánicas primarias, como aquí se definen, mediante un simple procedimiento que no implica la liberación de penicilina libre desde las sales metálicas y, consiguientemente, evita el uso de disolventes, tales como, por ejemplo, metilisobutil quetona. Las sales de bases orgánicas primarias y de penicilina, así

10 FEB



176753

obtenidas, pueden convertirse fácilmente en sales metálicas, por ejemplo, de sodio o de calcio.

5 Hemos descubierto que cuando una solución acuosa de una sal metálica bruta (por ejemplo, sódica o cálcica) de penicilina que preferible, pero no necesariamente, contiene una sustancia desplazadora ("saladora"), se trata con una sal adecuada de una base orgánica primaria adecuada, ambas como aquí se definen, se produce una doble descomposición, dando por resultado la precipitación de la correspondiente sal de penicilina y de base orgánica primaria. Esta sal puede recogerse como tal; si se desea, puede purificarse y convertirse fácilmente en sales metálicas (por ejemplo, de sodio o de calcio) de penicilina, cuya pureza será mayor que la de la sal metálica de penicilina original.

15 Mediante la expresión "base orgánica primaria adecuada" tal como se usa en esta Memoria, denotamos un compuesto de la fórmula $R.NH_2$, donde R es un residuo de hidrocarburo cicloalifático, cuyo residuo puede contener substituyentes alcohólicos, no excediendo de 8 el número total de átomos de carbono, el cual tiene un valor pKH de no menos de 10.2 y que, bajo las condiciones del procedimiento, no destruye rápidamente la penicilina. Ejemplos de tales bases son la ciclohexilamina y la metilciclohexilamina, de las cuales actualmente preferimos usar la primera.

25 Mediante la expresión "una sal adecuada de una base orgánica primaria adecuada" denotamos el producto formado por combinación entre una base orgánica primaria adecuada, como arriba se define, y un ácido enérgico o mo-



1947

170753

5 deradamente enérgico, entendiéndose que ni el ácido ni la sal, en las condiciones del proceso, tendrán un efecto destructor sobre la penicilina o sobre sus sales. Preferimos emplear sales adecuadas de bases orgánicas primarias de ácidos minerales fuertes, tales como el clorhídrico.

10 Consiguientemente el invento consiste, entre otras cosas, en un procedimiento para preparar sales de penicilina, en el cual una solución acuosa de una sal metálica (por ejemplo, de sodio o de calcio) de penicilina, es tratada con una sal adecuada de una base orgánica primaria adecuada, de modo que precipite una sal de penicilina y de dicha base.

15 De acuerdo con otra característica del invento, creamos un procedimiento para la purificación de sales metálicas brutas (por ejemplo, de sodio o de calcio) de penicilina, en el cual una solución acuosa de la sal metálica bruta se trata con una sal adecuada de una base orgánica primaria adecuada, la sal de base orgánica precipitada se purifica si es necesario y se vuelve a convertir en una sal metálica (por ejemplo, de sodio o de calcio) de penicilina.

20 La sal de base orgánica primaria puede ser añadida a la solución acuosa, ya en forma de la substancia esencialmente pura, ya como solución concentrada acuosa, y la mezcla de reacción debe regularse a un pH de 6-7 por la adición de un ácido tal como, por ejemplo, ácido fosfórico
25 o de una base inorgánica, tal como, por ejemplo, sosa cáustica. Hemos descubierto que es preferible llevar a cabo la precipitación de la sal de penicilina y de base primaria



176753

en presencia de una substancia "saladora" como luego se describe.

La siguiente es una descripción más general de cómo el invento se lleva a efecto preferiblemente:

5 Como material de partida usamos una solución acuosa enfriada de sal metálica bruta (por ejemplo, de sodio o de calcio) de penicilina. La actividad de la penicilina con preferencia, pero no necesariamente, no es menor de 400 unidades Oxford por Mgr. y su concentración en su solución acuosa es, con preferencia, de 2-10% p/v. (peso-volumen)

Es deseable que esta solución contenga también una substancia "saladora", es decir, una sal que tenga una alta solubilidad en agua, y cuya solución sea preferible, pero no necesariamente, neutra. Preferimos usar substancias tales como el cloruro sódico, sulfato sódico, cloruro potásico y similares, pero las sales amónicas no son adecuadas al paso que, evidentemente, no deben ser usadas sales que tengan una acción destructiva sobre la penicilina o sus sales. La cantidad de substancia "saladora" presente en la solución debe con preferencia ser tal que sature casi la solución.

Si se desea usar sal cálcica es necesario añadir la sal básica primero, antes del medio "salador", yaque, de otro modo es probable que sea "salado" un precipitado que contiene la penicilina.

A esta solución se le añade con agitación y enfriamiento; bien como substancia esencialmente pura, bien como solución acuosa concentrada, una cantidad de una sal

10 FEB



176753

adecuada de una base orgánica primaria adecuada, al menos
equivalente a la cantidad de penicilina presente, y la mez-
cla se lleva a un pH 6-7 por adición cuidadosa, con agita-
ción, de un ácido, por ejemplo, ácido fosfórico, o de una
5 base inorgánica, por ejemplo, sosa cáustica. Esta mezcla
se agita y enfria hasta que ya no se produce más precipita-
ción. El producto, que es la sal bruta de penicilina y de
la base orgánica primaria empleada, se recoge por filtra-
ción o centrifugación; puede lavarse con una pequeña canti-
10 dad de una solución acuosa casi saturada de una sustancia
"saladora". La última daría en este caso una solución acuo-
sa neutra y el producto se liberta todo lo posible de agua
por filtración o centrifugación continuadas.

El producto húmedo puede ser tratado en di-
15 versas formas. La mayor cantidad posible del agua subsis-
tente puede eliminarse del material así obtenido dejándolo
permanecer durante varias horas sobre un agente secador,
tal como pentóxido de fósforo en un desecador en el que se
ha hecho el vacío. Cuando está seco, puede lavarse con ace-
20 tona o metiletil quetona. El producto, con o sin esta etapa
de lavado, puede ser entonces convenientemente recristali-
zado como sigue:

El producto seco se calienta con ligeramente
más cloroformo del que es suficiente a unos 30°C para disol-
25 ver el material orgánico. La mezcla caliente se filtra rápi-
damente para separar el material inorgánico no disuelto. Al
filtrado se le añade suficiente acetona o metiletil quetona
para precipitar, al enfriar, sal purificada de penicilina y

10



76753

base orgánica primaria.

Alternativamente, el material húmedo puede ser recristalizado inmediatamente sin secarlo. Puede ser disuelto directamente en cloroformo y la solución puede ser filtrada de las pocas gotas de fase acuosa presente; al diluir con dos o tres volúmenes de acetona o metiletil cetona, la sal purificada de base primaria se separa por cristalización. Debe hacerse notar, por supuesto, que las combinaciones particulares de disolventes aquí descritos para fines de cristalización no son, desde luego, de ningún modo las únicas mezclas posibles. Puede determinarse fácilmente en el laboratorio si cualquier otro disolvente o mezcla de disolventes son satisfactorios. Si el producto resultante no es tan puro como se desea, el mencionado tratamiento de purificación puede repetirse.

Otro procedimiento alternativo es disolver el material húmedo en un pequeño volumen de alcohol etílico, por ejemplo, 3-5 ml. por cada unidad mega de penicilina usada originariamente. Después de filtrar de los vestigios de cualquier agente "salador" que pudiera haberse empleado, la sal purificada de penicilina y de base orgánica puede ser precipitada por adición a la solución alcohólica de unas tres a cinco veces su volumen de éter dietílico, disopropílico o dibutílico.

El producto purificado puede convertirse fácilmente por diversos métodos en sales metálicas puras (por ejemplo, de sodio o de calcio) de penicilina, verbigracia, por adición, con vigorosa agitación, de una mezcla de éter



176753

o cloroformo y ácido fosfórico acuoso que contenga una cantidad de ácido fosfórico al menos equivalente a la cantidad de base orgánica contenida en la sal a tratar, separación del extracto orgánico, regulación de la solución acuosa a un pH de 2,5, extracción con más disolvente orgánico, mezcla de los extractos, extracción de esta mezcla con una solución acuosa de un hidróxido metálico (por ejemplo, hidróxido sódico) que contenga una cantidad de hidróxido metálico equivalente a la cantidad de penicilina (ácido libre) en la base orgánica y desecación por congelación del extracto acuoso.

Los ejemplos siguientes, que se dan únicamente como ilustraciones, y en los cuales "u.m." representa "unidad mega", es decir, 1.000.000 de unidades Oxford, y "u.o." denota "unidad Oxford", describen cómo de acuerdo con el invento puede prepararse una sal de penicilina y de base orgánica primaria esencialmente pura:

EJEMPLO 1.

2.5 u.m. de sal sódica de penicilina que daban en el análisis 910 u.o./mgr. se disolvieron en 32 ml. de agua saturada a 0°C con nitrato sódico. Se añadió hidrocloreuro de ciclohexilamina en solución acuosa al 50%, en cantidad equivalente al doble de la cantidad de penicilina presente. La solución se reguló a un pH de 6 y se dejó reposar como una media hora antes de la filtración. El sólido se lavó con unos pocos mls. de solución saturada de nitrato sódico.

El sólido húmedo se calentó ligeramente con 25 ml. de cloroformo y la solución se filtró a través de un filtro seco para separar unas pocas gotas de solución acuosa.

MALE REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



176753

5 sa presente. Al filtrado se le añadieron 75 ml. de acetona. Después de reposar como una hora en el refrigerador, la mezcla se filtró. Se recuperó una segunda recogida concentrando el filtrado bajo presión reducida y dejándolo cristalizar. El rendimiento fué de 1.53 gr. (primera recogida) y 0.1 gr. (segunda recogida) de sal esencialmente pura de penicilina y ciclohexilamina.

10 Esta sal se convirtió en sal sódica de penicilina agitándola en agua de hielo (1 parte en volumen) y cloroformo (2 partes) y añadiendo suficiente ácido fosfórico al 10% con agitación para llevar el pH a 2.1. El extracto en cloroformo se agitó con agua y solución de hidróxido sódico N/1 para llevar el pH a 5.9. Después de separación, el cloroformo se agitó con otra pequeña cantidad de agua y solución de hidróxido sódico para llevar el pH a 7.4. Las soluciones acuosas se extendieron y se secaron por congelación, siendo recristalizado el sólido resultante desde acetona, momento en el cual cristalizó rápidamente sal sódica de penicilina pura.

20 EJEMPLO 2.

2 u.m. de penicilina (1.100 u.o./mgr.) en 21.5 ml. de agua se saturaron con nitrato sódico a unos 0°C. A esta solución se le añadió 1 ml. de metilciclohexilamina previamente neutralizada con ácido clorhídrico concentrado. 25 La mezcla, que tenía un pH de 6.8, se dejó reposar durante dos horas en el refrigerador antes de la filtración. El sólido se secó dejándolo durante la noche en un secador al vacío y luego se lavó con acetona y se secó de nuevo. El peso



1947

176753

de este producto era de 0.85 gr. Se disolvió en 15 ml. de cloroformo caliente, la solución se filtró y se añadieron 45 ml. de metiletil quetona. Después de enfriar durante media hora en el refrigerador, la mezcla se filtró y el sólido se lavó con un poco de metiletil quetona y se secó. La sal recristalizada de penicilina y metilciclohexilamina pesaba 0.45 gr.

EJEMPLO 3.

20 u.m. de sal sódica de penicilina (1.100 u.o./mgr.) en 215 ml. de agua se saturaron con cloruro sódico a unos 0°C. 20 mls. de solución acuosa al 50% de hidrocloruro de ciclohexilamina se añadieron a la mezcla, que tenía un pH de 6.2 y se dejó reposar a unos 0°C durante 1 hora. Luego se filtró bajo vacío y el sólido se secó todo lo posible por aspiración. El producto se disolvió en 100 ml. de alcohol etílico y se filtró de los vestigios de cloruro sódico. Se añadieron 400 ml. de éter isopropílico, momento en el cual la sal de penicilina y ciclohexilamina cristalizó rápidamente en finas agujas. Se separó por filtración después de permanecer media hora a unos -10°C. El filtrado se sometió a evaporación hasta sequedad bajo vacío, el residuo se disolvió en 30 ml. de cloroformo y se añadieron 80 ml. de metiletil quetona. Después de enfriamiento en una mezcla de congelación se filtró y la sal se lavó con metiletil quetona. Los rendimientos de sal pura de ciclohexilamina y penicilina fueron de 11.2 grs. en la primera recogida y 2.85 grs. en la segunda. Un 24% de la penicilina original quedó en el líquido madre acuoso.

Esta solicitud, que corresponde a la presen-



176753

tada en Gran Bretaña el 11 de Febrero de 1946, bajo el nº 4202/46, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

5 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:

10 1º. - Un procedimiento de preparar sales de penicilina en el cual una solución de una sal metálica, por ejemplo, sódica o cálcica, de penicilina se trata con una sal adecuada de una base orgánica primaria adecuada, como aquí se define, de modo que se precipite una sal de penicilina y de dicha base.

15 2º. - Un procedimiento para purificar sales metálicas brutas, por ejemplo, de sodio de calcio, de penicilina en el cual una solución acuosa de la sal metálica bruta se trata con una sal adecuada de una base orgánica primaria adecuada como aquí se define, siendo purificada, si es necesario, la sal de base orgánica precipitada, y vuelta
20 a convertir en una sal metálica, por ejemplo, sódica o cálcica, de penicilina.

3º. - Un procedimiento según se reivindica



1947

176753

en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual la sal de la base primaria es añadida en forma de la substancia esencialmente pura.

5 4º. - Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º o en el 2º, en el cual la sal de la base orgánica primaria se añade en forma de solución acuosa.

10 5º. - Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual la reacción se lleva a cabo en presencia de una substancia "saladora" como aquí se define.

6º. - Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual la sal de base orgánica primaria y penicilina se purifica por reestabilización.

15 7º. - Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 2 - 6, en el cual la sal de base orgánica primaria y penicilina se trata con una mezcla de éter o cloroformo y una cantidad de ácido fosfórico acuoso al menos equivalente a la cantidad de base orgánica contenida en la sal, siendo el líquido orgánico separado y sometido a extracción con una solución acuosa de un hidróxido metálico, por ejemplo, hidróxido sódico, que contiene una cantidad de hidróxido metálico equivalente a la cantidad de penicilina libre en el líquido orgánico, siendo el extracto acuoso se-
20 cado por congelación.

25 8º. - Un procedimiento para la preparación de sales de penicilina, esencialmente como se ha descrito con referencia a los ejemplos aquí mencionados.

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



1947

176753

9º. - Un procedimiento para la preparación de sales de penicilina, esencialmente como aquí se describe.

10º. - Un procedimiento de purificar sales de penicilina.

5

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

Esta Memoria consta de catorce hojas escritas por una sola cara.

Madrid,

10 FEB. 1947

P. A.

Alcorno de Elizabury

Dr. Feder