



950

187757

tivo de una raza del microorganismo Streptomyces griseus en un medio de cultivo adecuado.

Estos productos contienen, como ingrediente terapéuticamente activo, un compuesto químico desconocido hasta ahora, el cual ha sido designado como vitamina B₁₂.

La nueva combinación química a que nuestro invento se refiere también, la vitamina B₁₂, puede promover el crecimiento del Lactobacillus Lactis Dorner, y tiene una acción marcada y eficaz en el tratamiento terapéutico de la anemia perniciosa de Addison.

En los procedimientos según este invento utilizamos como material de partida un concentrado bruto que contiene una sustancia L.L.D. activa, es decir, una sustancia que es activa al favorecer el crecimiento de Lactobacillus Lactis Dorner. Tal concentrado bruto L.L.D. activo puede prepararse cultivando el microorganismo Streptomyces griseus en un medio nutritivo adecuado, adsorbiendo el material activo del caldo de cultivo, eluyendo el adsorbato con una solución acuosa de piridina o de piridina alcohol-sustituída y recuperando del eluato el concentrado bruto L.L.D. activo.

Considerado en alguno de sus aspectos más amplios un procedimiento según el presente invento, para la preparación de productos con actividad pronunciada en vitamina B₁₂ comprende extraer un concentrado bruto L.L.D. activo compuesto predominantemente de un producto de elaboración de Streptomyces griseus con un disolvente, efectuar un fraccionamiento cromatográfico añadiendo dicha solución de disolvente a una columna de material adsorbente, lavar la



187757

columna con disolvente para lavar fraccionadamente la sustancia activa del agente adsorbente, y recuperar del eluato un concentrado de vitamina B₁₂.

Según una realización de nuestro invento, un concentrado bruto L.L.D./activo compuesto predominantemente de un producto de elaboración de *Streptomyces griseus* se extrae con agua a un alcohol alifático inferior tal como el alcohol metílico. La selección del líquido de extracción se determina por el material adsorbente que se haya de usar en el fraccionamiento cromatográfico.

Pueden utilizarse varios adsorbentes en la práctica de este invento, incluso carbón activo, alúmina activada y similares; siendo la alúmina activada el adsorbente preferido. Las extracciones acuosas se emplean en columnas que contienen carbón activado, y se usan extracciones de alcohol alifático inferior en columnas de alúmina activada. La columna con preferencia se empaqueta en húmedo llenándola con el adsorbente y el disolvente usado en el lavado y dejando luego que el disolvente se salga hasta que su nivel llegue a la parte superior del material de la columna.

El extracto alcoholico, se vierte en la superficie superior del adsorbente en la columna de alúmina y se deja fluir en el adsorbente por gravedad o a presión. Luego la columna se desarrolla con nuevo disolvente y se recogen fracciones adecuadas del lavado. Las fracciones que contienen actividad suficiente como se determina microbiológicamente o en virtud del color rosa, se concentran



187757

5 por separado o combinadas. Luego la solución concentra-
da se mezcla con un disolvente miscible en el cual la sus-
tancia activa es insoluble, tal como acetona, y el preci-
pitado rojo se recupera. El precipitado se disuelve en
agua y se añade en acetona, lo cual da por resultado la
separación de cristales rojos de vitamina B₁₂.

10 El grado de purificación alcanzado en un solo
fraccionamiento cromatográfico, puede no ser suficiente pa-
ra dar un producto cristalino. En estas condiciones el
material amorfo puede purificarse más por disolución en un
alcohol alifático inferior. Luego la solución se añade
a una segunda columna del material adsorbente y las frac-
ciones más activas del lavado, según se determina arriba,
se recogen y concentran a sequedad. El residuo seco se
15 disuelve en alcohol metílico y se añade acetona a la so-
lución, con lo que se separa un precipitado rojo de vite-
mina B₁₂. Este precipitado se disuelve en agua, y se
añade acetona a la solución, haciendo que se separen cris-
tales rojos.

20 La vitamina B₁₂ obtenida en estado virtualmente
puro de acuerdo con nuestro invento, es un compuesto rojo
con una composición aproximada tipificada por el siguien-
te análisis hecho sobre dos muestras sacadas, al vacío du-
rante dos horas a 100°C: C, 56,35, 56.11; H, 6,72, 6,72;
25 N, 14,51, 14.76; P, 2,24, 2.27; Co, 4,42, 4.58. Vir-
tualmente toda la diferencia entre la suma de los porcen-
tajes dados y 100% se cree que es oxígeno, y el análisis
del espectro no indica la presencia de otros metales.



950

187757

Basandose en el análisis precedente, la vitamina B₁₂ tiene la fórmula aproximada: C₆₁₋₆₄ H₈₆₋₉₂ N₁₄ O₁₃ PCO₂

La vitamina B₁₂ es esencialmente soluble en agua, alcohol metílico, alcohol etílico, y fenol y virtualmente insoluble en acetona, éter y cloroformo.

La vitamina B₁₂ tiene un coeficiente aparente de partición de aproximadamente 1,46 en el sistema 75% de tolueno - 25% de ortocresol/agua. Se ha comprobado que la vitamina B₁₂ tiene un coeficiente de partición de aproximadamente 1,2 en el sistema agua/alcohol benzílico.

La vitamina B₁₂ cristaliza desde soluciones adecuadas tales como de acetona acuosa en forma de cristales rojos con las siguientes propiedades cristalográficas: índice de refracción α 1,619; β 1,649; γ 1,659. Los cristales de vitamina B₁₂ no tienen un punto de fusión definido, pero se oscurecen a unos 210-220°C.

El espectro de absorción de la vitamina B₁₂ en solución acuosa se caracteriza por máximos a 2780 Å ($E_{1cm.}^{1\%} = 114,7$), a 3610 Å ($E_{1cm.}^{1\%} = 203,5$) y a 5500 Å ($E_{1cm.}^{1\%} = 62,7$). El espectro no cambia marcadamente con un cambio del pH; en solución ácida, la intensidad de la banda de 3610 Å disminuye en aproximadamente 10% y en solución alcalina hay otros pequeños cambios y la fina estructura resulta menos marcada.

El espectro de absorción infrarrojo se determinó con un espectrómetro Perkin-Elmer 12A cuidadosamente calibrado. Los máximos de absorción fueron los siguientes.



850

187757

Longitud de onda en μ (10^{-4} cm.)

	3.05	S (ancho)
	4.62	W
	5.98	S
5	6.13	M
	6.70	S
	7.14	S
	7.35	S
	7.60	W
10	8.15	S
	8.67	S
	9.36	S
	10.00	S
	10.80	W
15	11.10	W
	11.81	M
	12.35	M

designando S, M, y W intensidades de absorción fuerte mediana y débil.

20 Se ha descubierto que la vitamina B₁₂ obtenida según nuestro invento tiene actividades biológicas tal que 0.000013 γ por ml. de agente de cultivo es suficiente para sostener la mitad del crecimiento máximo de *Lactobacillus lactis Dornier* en las condiciones usadas. La vitamina B₁₂

25 tiene alto valor terapéutico en el tratamiento de la anemia perniciosa de Addison, y otras anemias macrocíticas. Los requisitos de la dosificación varían con el caso individual



187757

y dependen de la severidad y de la duración del estado patológico y de la respuesta terapéutica del paciente.

La dosis terapéutica mínima eficaz administrada por vía intramuscular en forma de solución salina acuosa o isotónica se cree que es aproximadamente de 1 microgramo por día o múltiples de esta cantidad a intervalos más largos, por ejemplo, de aproximadamente 7 microgramos por semana.

Las investigaciones clínicas de la terapia por la vitamina B₁₂ en el tratamiento de anemias macrocíticas quedan señaladas en la bibliografía, incluyendo:

Spies, T.D., Stone, R.E., Garcia López, G., Milanés, F., López Toca, H, y Aramburu, T. "Thymine, Folic Acid and Vitamin B₁₂ in Nutritional Macrocytic Anemia, Tropical Sprue, and Pernicious Anemia", Lancet, 2, 519-522, 2 de Octubre de 1948.

Hall, B.R., y Campbell, D.C., "Effect of Vitamin B₁₂ on the Hematopoietic and Nervous Systems in Addisonian Pernicious Anemia", Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 33; 1646, December 1948".

La vitamina B₁₂ puede también aumentar la velocidad de crecimiento de los pollos. Por ejemplo en un experimento, la adición de treinta partes por mil millones de vitamina B₁₂ a una dieta básica que contenía caseína purificada (llamada sin vitaminas) como fuente de proteína, causó un aumento en la velocidad de crecimiento tal que el peso en promedio de los pollos a los dieciséis días de alimentarlos con la dieta suplementaria era de 127 gr. al paso que el de los pollos que recibían la dieta sin suplemento



187757

era de 99 gr.

5 La actividad de los productos a que se hace referencia en esta solución fue determinada por un método de ensayo de respuesta al crecimiento microbiológico que emplea Lactobacillus Lactis Dorner como organismo de ensayo. A continuación se da una breve descripción del método de ensayo que empleamos.

10 Se ha informado que el Lactobacillus Lactis Dorner requiere dos factores de crecimiento, T.J. y L.L.D. Las modificaciones del medio incorporadas en la fórmula abajo descrita, han eliminado el requisito del uso del factor T.J. y el ensayo, según se presenta, es específico para L.L.D. Este microorganismo muestra respuesta del factor L.L.D. a la vitamina B₁₂. La vitamina B₁₂ pura cristalizada se usa como patrón del ensayo y todas las incógnitas se evalúan en función de la actividad microbiológica favorecedora del crecimiento, equivalente a la actividad microbiológica de la vitamina B₁₂.

15 El organismo Lactobacillus Lactis Dorner, A.T. C.C., 10, 697, usado en este método de ensayo, está disponible en la Colección americana de cultivos tipo. Los cultivos del organismo se mantienen en un medio de crecimiento que consiste en:

- 20
- 1% de extracto de levadura Difco
 - 0,02% de suero de jugo de tomate
 - 1% de dextrosa anhidra
 - 1,5% de agar
- 25

El medio usado para el inóculo consiste en el me-



187757

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

5 dio base o de ensayo al cual se le añade 1 unidad por c.c. de vitamina B₁₂. Las células del inóculo se lavan con agua destilada estéril y se diluyen para formar una suspensión que da entre 90% y 95% de transmisión de la luz en el fotómetro de Evelyn con un filtro de 520 mμ.

La composición del medio de ensayo, doble fuerza, se da abajo. Los ingredientes pueden tomarse convenientemente de soluciones de reserva:

	<u>DL</u> isoleucina	200 mgrs.	Dextrosa	10	grs.
10	<u>DL</u> alfa-alanina	200 mgrs.	Acetato sódico	6	grs.
	<u>DL</u> ácido aspártico	200 mgrs.	Acido fumárico	0,5	grs.
	<u>DL</u> Valina	200 mgrs.	Etiloxalacetato sódico	0,5	grs.
	<u>DL</u> metionina	200 mgrs.	Riboflavina	200	mcgrs.
	<u>DL</u> ácido glutámico	200 mgrs.	Pantotenato calcio	200	mcgrs.
15	<u>DL</u> treonina	200 mgrs.	Tiamina HCl	200	mcgrs.
	<u>DL</u> serina	200 mgrs.	Acido nicotínico	200	mcgrs.
	<u>DL</u> fenilalanina	200 mgrs.	Piridoxamina	400	mcgrs.
	<u>DL</u> leucina	200 mgrs.	Acido para-aminoben-		
			zoico	40	mcgrs.
20	<u>L</u> histidina	200 mgrs.	Biotina	0,4	mcgrs.
	<u>DL</u> triptofana	400 mgrs.			
	<u>L</u> arginina	200 mgrs.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200	mcgrs.
	<u>L</u> lisina	100 mgrs.	NaCl	10	mcgrs.
	Acido aminoacético	200 mgrs.	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	mcgrs.
25	<u>L</u> cistina	200 mgrs.	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10	mcgrs.
	<u>DL</u> norleucina	200 mgrs.	K ₂ HPO ₄	500	mcgrs.
	<u>L</u> tirosina	200 mgrs.	KH ₂ PO ₄	500	mcgrs.
			Acido fólico	2	mcgrs.



187757

Hidrolisado de caseína 1 gr.

Agua, hasta 500 c.c.

5 El medio basal se prepara combinando los aminoácidos, añadiendo luego dextrosa, acetato sódico, ácido fórmico, calentando para disolver, y reajustando inmediatamente a pH 7.

El etiloxalacetato sódico y las vitaminas se añaden luego, se disuelven, y las soluciones se ajustan de nuevo a pH 7. Finalmente, las sales, el ácido fólico y los hidrolisados de caseína se añaden, disuelven y se ajustan al pH a 6,6.

10 Una solución o suspensión en agua de la muestra a ensayar se diluye de modo que la solución contenga aproximadamente 0,2 unidades tipo L.L.D. por c.c., que se añade luego a los tubos de ensayo en cantidades de 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 c.c. Todos los tubos se ajustan luego a un volumen de 2,5 c.c. con agua, se añaden 2,5 c.c. del medio base, y los tubos se taponan finalmente y se esterilizan calentando a 120°C durante 13 minutos. Después de enfriar a la temperatura ambiente, los tubos se inoculan con una gota de suspensión normalizada de L. Lactis y luego se incuban a 37°C, durante 40 horas. Después de la incubación, los tubos se titulan directamente con hidróxido sódico 0,05N al punto extremo del azul verde de azul de bromotimol.

25 La actividad de la muestra puede determinarse entonces por la curva normal por la cantidad requerida de hidróxido sódico.

La curva normal se prepara con vitamina B₁₂ cristalizada. Un miligramo de vitamina B₁₂ cristalizada pura contiene 11×10^6 unidades. Una solución de reserva se dilue



187757

5 ye y se añaden 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8, 1 y 2 unidades a series duplicadas de tubos. Se añaden agua para ajustar el volumen a 2,5 c.c. El procedimiento arriba descrito para las muestras en ensayo se sigue con el patrón. Valores de titulación típicos para la serie patrón señalada arriba son 1,5 2, 2,7, 4,3, 5,7, 6,6, 7,5, 7,9, 8 y 8,4 respectivamente, en términos de mililitros de hidróxido sódico 0,05N requeridos para neutralizar el ácido producido por el cultivo de L. Lactis.

10 Los ejemplos siguientes representen métodos a realizar el invento presente, pero debe entenderse que serán primariamente por vía de ilustración y no de limitación.

E j e m p l o I

15 Se obtiene un concentrado seco cultivando una raza del microorganismo Streptomyces griseus en un agente nutritivo adecuado y recuperando el material activo absorbiendo-lo de dicho caldo, lavando el adsorbido con una solución acuosa de piridina o una piridina Alkil-sustituída, y recuperando el concentrado bruto del lavado. El concentrado seco tiene un poder microbiológico de unas 1500 a 2000 unidades L.L.D. mg. 750 gra. de este concentrado seco se añaden a unos 2,5 litros de alcohol metílico seco. La mezcla se agita durante unos treinta minutos y luego se filtra. Luego se añaden unos 2.5 litros de alcohol metílico seco al residuo sólido y la mezcla se agita y filtra. Este procedimiento se repite con dos porciones sucesivas de 2.5 litros de alcohol metílico seco.

20

25



1950

187757

Los filtrados combinados tienen una actividad microbiológica de aproximadamente 1.2 mil millones de unidades L.L.D.

5 Los filtrados combinados se fraccionan cromatográficamente por adsorción sobre alúmina activada humedecida con alcohol etílico. Este se hace pasar luego por

la columna y se recoge un número de fracciones de lavado. Estas fracciones, que contienen actividad suficiente (usualmente de por lo menos 10.000 unidades L.L.D.

10 ml) según se determina microbiológicamente, y usualmente se indica por una coloración rosa, se combinan y concentran a temperatura inferior a 30°C., y a presión menor de la atmosférica hasta una décima parte aproximadamente del volumen primitivo. Si se forma una pequeña cantidad

15 de material insoluble blanco. La mezcla concentrada se filtra. El filtrado se concentra luego en el vacío

hasta un jarabe denso. Se añade a este jarabe alcohol etílico absoluto y se separa el precipitado blanco insoluble que se disgrega de la solución. Luego se

20 añade un volumen igual de acetona a la solución roja difusa de alcohol etílico, haciendo que se separe de la solución un precipitado rojo en copos.

El material activo precipitado de alcohol etílico por la adición de acetona se disuelve en unos 2 ml. de

25 agua y se vuelve a precipitar en forma de un aceite rojo añadiendo unos doce volúmenes de acetona. El aceite se separa, se disuelve en 1 ml. de agua aproximadamente y la solución se trata con acetona hasta que se observa



187757

turbiedad. En el reposo se separa de la solución vitamina B₁₂ en racimos de cristales pequeños aciculares rojos.

Ejemplo 2

5 Alternativamente, un precipitado rojo en copos formado añadiendo acetona a la solución roja y diáfana de alcohol etílico se obtiene como en ejemplo 1. Después de lavar el precipitado con acetona y secarlo, se obtiene una sustancia que tiene un poder microbiológico de unos 4 millones de unidades L.L.D. por mg. Se recupera una segunda cosecha de poder similar añadiendo al líquido madre un segundo volumen de acetona. La adición ulterior de acetona a los líquidos madres da por resultado la precipitación de un aceite rojo que se recupera. El aceite se trata con una mezcla de alcohol etílico y acetona, y se precipita y recupera un sólido rojo amorfo de poder microbiológico de 1.5 millones de unidades L.L.D. mg. aproximadamente.

10
15
20 Las diversas fracciones insolubles en acetona secas, combinan, se disuelven en unos 4 ml. de alcohol metílico, y la solución se absorbe en unos 10 gr. de alúmina activada humedecida con alcohol metílico en una columna cromatográfica. La columna se desarrolla luego con alcohol metílico y una banda roja oscura pasa por la columna. Al aparecer el color rojo en el lavado, se toman fracciones sucesivas de 10 ml. hasta que el afluente es virtualmente

25



187757

incolores. Las tres primeras fracciones, que contienen la mayor parte del color rojo, se combinan y evaporan a sequedad a presión inferior a la atmosférica y a temperatura por debajo de 25°C.

5 El residuo seco, se disuelve en unos 2 ml. de alcohol metílico y la solución se trata con unos 8 volúmenes de acetona haciéndose que se separe de la solución un precipitado rojo amorfo. Este precipitado se recupera por centrifugación y se vuelve a precipitar de igual modo de una mezcla de alcohol metílico y acetona. Una
10 porción de este material (5 mg. de un total de 21.8 mg) se disuelve en unos 0,5 ml. de agua y la solución se trata con unos 5 ml. de acetona. En el reposo se separan de la solución y se recuperan grupos de cristales aciculares rojos de
15 vitamina B₁₂ con un poder microbiológico de unos 11 millones de unidades L.L.D. por mg.

Ejemplo 3

20 Unos 1388 gr. de un concentrado seco compuesto de un producto de elaboración de Streptomyces griseus y que tiene un poder microbiológico de unas 2000 unidades L.L.D. por mg. se añade a unos 16 litros de alcohol metílico seco. La mezcla se agita unos 30 minutos y se filtra.

25 El filtrado se absorbe en unos 15 kg. de alúmina activa humedecida con alcohol metílico de una columna cromatográfica. Luego la columna se desarrolla con alcohol metílico y se recoge un número de fracciones de lavado.

Las fracciones cromatográficas que tienen la ac-



187757

5
10
15

tividad microbiológica más pronunciada se combinan y concentran al vacío hasta una décima parte aproximadamente del volumen primitivo. La mezcla concentrada se filtra y el filtrado se sigue concentrando en el vacío hasta un jarabe denso. Se añade alcohol etílico a este jarabe y la mezcla se filtra. Luego el filtrado se trata con acetona suficiente, agitando para determinar la precipitación completa del material rojo en él contenido. El precipitado rojo se recupera y se redisuelve en unos 100 ml. de alcohol metílico. Esta solución se vierte luego lentamente con agitación en 1 litro aproximadamente de acetona. De la solución precipitada un material en copos de rojo claro y se recupera. Después de lavar y secar el precipitado, se obtiene 7.8 g. de un polvo rojo con un poder microbiológico de unas 65.000 unidades L.L.D. por mg., o aproximadamente 0,6% vitamina B₁₂.

20
25

Se hace observar que en este ejemplo el contenido en vitamina B₁₂ del producto obtenido en una operación cromatográfica (0,6% de vitamina B₁₂) fue mucho menor que en los otros ejemplos y muchísimo menor de lo que sería necesario. El ejemplo se da para ilustrar el hecho de que nuestro tratamiento, incluso cuando no se lleva a cabo para obtener la máxima potencia del tratamiento cromatográfico, da un producto que es mucho más potente que cualesquiera concentrados anteriormente conocidos para tratar la anemia perniciosa, con los cuales estemos familiarizados y que, si se desea, puede usarse para fines clínicos sin ulterior concentración.



50

Ejemplo 4

187757

5
10.0 gr. de concentrado del tipo descrito en el ejemplo precedente de un poder en promedio de 86.000 unidades L.L.D. por mg. se disuelven en alcohol metílico y la solución se absorbe en unos 500 gr. de alúmina activada humedecida con alcohol metílico en una columna cromatográfica. La columna se desarrolla luego con alcohol metílico y se recogen fracciones separadas del lavado.

15
Las fracciones que tienen actividad microbiológica pronunciada se seleccionan, combinan y evaporan a sequedad a presión inferior a la atmosférica. El residuo se extrae con alcohol etílico absoluto y se separa la sustancia blanca que deja de disolverse. La solución roja de alcohol etílico se trata con un exceso de acetona haciendo que se separe un aceite rojo insoluble. Este aceite se recupera y disuelve en unos 10 ml. de agua. El material activo, con algo de material inerte que la acompaña, se precipita de nuevo con un aceite añadiendo un exceso de acetona. El material rojo altamente activo se vuelve a disolver en unos 3 ml. de agua y la solución se trata con acetona hasta que se observa una débil turbiedad. En el reposo se separan de la solución cristales soculares rojos de vitamina B₁₂.

20
25
Pueden hacerse modificaciones en la realización del presente invento, sin apartarse de su espíritu y finalidad, y el invento solo debe limitarse por las reivindicaciones anexas.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 10 de Abril de 1948, bajo



1950

187757

el número 20.356, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de 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 para la preparación de productos con actividad pronunciada en vitamina B₁₂, que comprenda someter a extracción un concentrado bruto con actividad L.L.D. compuesto predominantemente de un producto de elaboración de Streptomyces griseus, con un disolvente, efectuar el fraccionamiento cromatográfico añadiendo la solución en disolvente resultante a una columna de material adsorbente, lavar la columna, con disolvente para eluir la sustancia activa del material adsorbente y recuperar del eluato un concentrado de vitamina B₁₂.

15



187757

2º.- El procedimiento según se reivindica en el punto 1º. en el cual el disolvente para extraer dicho concentrado bruto es alcohol alifático inferior.

5 3º.- El procedimiento según se reivindica en el punto 2º., en el cual el disolvente para extraer dicho concentrado bruto es alcohol metílico.

10 4º.- El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual dicha columna de material adsorbente es una columna de alúmina activada.

15 5º.- El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual el disolvente para lavar dicha columna después del fraccionamiento cromatográfico es un alcohol alifático inferior.

6º.- El procedimiento según se reivindica en el punto 5º., en el cual el disolvente para lavar dicha columna después de fraccionamiento cromatográfico es alcohol metílico.

20 7º.- El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores que incluye una o más operaciones adicionales de fraccionamiento cromatográfico en cada una de las cuales se usa como material de partida el eluato del fraccionamiento cromatográfico precedente.

25 8º.- El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, que incluye las operaciones de disolver nuevamente el concentrado de vitamina B₁₂ recuperado del eluato en un alcohol alifático inferior, añadir a la solución alcoholada un disolvente miscible en el cual



187757

es insoluble el material activo, y recuperar el material activo que precipita.

5 9º.- El procedimiento según se reivindica en el punto 8º., en el cual el alcohol alifático inferior usado para disolver de nuevo el concentrado de vitamina B₁₂ es alcohol etílico.

10 10º.- Un procedimiento se reivindica en el punto 9º., en el cual el disolvente miscible añadido a la solución alcohólica es acetona.

10 11º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 8 a 10., que incluye las operaciones ulteriores de disolver en agua el material activo recuperado, tratar la solución con acetona y aislar vitamina B₁₂ cristalizada.

15 12º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 11º., que incluye las operaciones de disolver repetidamente el material activo en agua y precipitar con acetona.

20 13º.- Un procedimiento para la preparación de concentrados ricos en vitamina B₁₂, en esencia como se ha descrito en esta memoria.

14º.- Un procedimiento de preparación de vitamina B₁₂.

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

Entre líneas "activo". Vale.

Este Memoria -



50

187757

consta de veinte hojas escritas por una sola cara.

Madrid a

1 SEP 1950

P.A.

Alberto de Elzaburu

Por Poder

Alb. de Elzaburu

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL