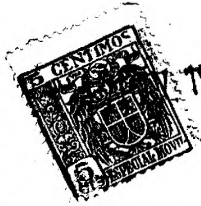


P - 8.585.-

1-05333

Case no 3.046.-



195333

0561 NOV 11

11 NOV. 1950

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de MERCK & CO., INC., entidad norteamericana, establecida en 126, East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE
VITAMINA B₁₂ ".-

Este invento se refiere a la producción de vitamina B₁₂, y especialmente a la obtención de mayores rendimientos de vitamina B₁₂ partiendo de primeras materias que contienen sustancias íntimamente relacionadas con dicha vitamina, pero que tienen actividad fisiológica notablemente menor (por ejem-

5



195333

7
plo actividad contra la anemia perniciosa y actividad de factor de proteína animal) que la de la vitamina B₁₂. Más especialmente, el invento se refiere a nuevos procedimientos por los cuales sustancias similares a dicha vitamina se convierten en ella.-
5

Varios procedimientos se han descrito en la literatura para obtener vitamina B₁₂ de hígado y de caldos de fermentación. Por ejemplo, Rickes y otros expusieron en Sciencia 108, 634-35 (3 de Diciembre de 1.948) que la vitamina B₁₂ puede obtenerse de caldos de fermentación producidos por Streptomyces griseus. Aunque los caldos de fermentación ofrecen una fuente práctica para la producción comercial de vitamina B₁₂, se ha descubierto que estos caldos contienen productos de fermentación que aquí se llamarán materias análogas a la vitamina B₁₂, y que están íntimamente relacionadas con ella, pero solo poseen una fracción de la actividad contra la anemia perniciosa y de factor de proteína animal de la que tiene la misma vitamina B₁₂. Al producir esta vitamina de pureza uniforme, la separación de dichas materias análogas a ella ha ofrecido un problema difícil. Debido a la estrecha relación entre estos materiales y la vitamina B₁₂, solo usando procedimientos complicados y costosos ha sido posible separar dicha vitamina cristalina pura.-
10
15
20

25
Ahemos descubierto ahora que se pueden convertir estas materias análogas a la vitamina B₁₂, hasta ahora indeseables, casi cuantitativamente en la misma, simplificando con ello considerablemente el procedimiento para obtenerla pura,



195333

2
y al mismo tiempo aumentando en gran manera el rendimiento de vitamina B₁₂ obtenible de caldos de fermentación.-

5
Considerado en algunos de sus mas generales aspectos, el nuevo procedimiento según el presente invento comprende hacer reaccionar materias análogas a la vitamina B₁₂, con una sustancia que suministre iones cianuro, convirtiendo así dichas materias en vitamina B₁₂. Así, por ejemplo, tratando caldos de fermentación, o concentrados adecuados de los mismos, que contienen vitamina B₁₂ y sustancias análogas a ella con una fuente de iones cianuro, hemos descubierto
10 que se obtienen rendimientos muy aumentados de vitamina B₁₂ pura. Además, como se ha dicho antes, el aislamiento de esta se facilita en gran manera.-

15
Como otra realización de nuestro invento, hemos descubierto que la conversión puede efectuarse en varias condiciones utilizando diversas fuentes de ion cianuro. En general la reacción se efectúa teniendo en contacto íntimo sustancias similares a la vitamina B₁₂ con iones cianuro, para convertirlas en vitamina B₁₂. Por ejemplo, soluciones
20 de dichas sustancias análogas pueden tratarse con combinaciones que den iones cianuro (entre otras cianuros metálicos, cianuro amónico o cianuro de hidrógeno). Medios disolventes adecuados comprenden mezclas disolventes acuosas, orgánico-acuosas o disolventes orgánicos que contienen iones
25 cianuro y en los cuales son solubles las sustancias análogas a la vitamina B₁₂. Para fines prácticos consideramos lo más conveniente realizar la reacción en un agente acuoso.-



195333

También se ha descubierto que la reacción de ciertas sustancias análogas a la vitamina B₁₂ que se han preparado, con una sustancia que suministra ion cianuro en la forma arriba descrita, conduce en cada caso a la conversión de dicha sustancia en la vitamina B₁₂, que puede recuperarse en forma esencialmente pura. Sustancias especiales que se ha comprobado se convierten en vitamina B₁₂ por reacción con una sustancia que da ion cianuro comprenden las sustancias que se han identificado como vitamina B_{12a}, vitamina B_{12b}, vitamina B_{12c} y vitamina B_{12d}.-

La vitamina B_{12a} que en forma pura existe como cristales ortorómbicos rojos, puede prepararse de la vitamina B₁₂ haciendo reaccionar esta con hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación tal como óxido de platino, óxido de paladio o níquel Raney. Este procedimiento de hidrogenación se describe detalladamente y se reivindica en la solicitud pendiente con esta de Kaczka, Wolf y Folkers, número de serie 108.421, presentada el 2 de Agosto de 1.949. La vitamina B_{12a} ofrece un coeficiente de distribución característico de aproximadamente 1.48 (Cagua/C disolvente) en un sistema de disolvente orgánico y agua, en el cual el disolvente orgánico es una mezcla de 2.5 de o-cresol y tetracloruro de carbono.-

La vitamina B_{12b} puede prepararse de concentrados de vitamina B₁₂ obtenidos de un caldo de fermentación de Streptomyces griseus por distribución en contracorriente entre 2 : 5 O-cresol:tetracloruro de carbono y agua, sistema en el cual



195333

la vitamina B_{12b} muestra un coeficiente de distribución característico de unos 2.4 (Cv/Cs) al paso que la vitamina B_{12} muestra un coeficiente de distribución de casi cero. Este método de preparar vitamina B_{12b} se describe más detalladamente en la solicitud pendiente con esta de Kaczka y Folkers, nº de serie , presentada el

(caso nº 2.343).-

La vitamina B_{12c} puede prepararse haciendo reaccionar vitamina B_{12} con un exceso de un sulfuro ionizable, tal como los sulfuros de metales alcalinos, sulfuro amónico y sulfuro de hidrógeno, con preferencia en solución acuosa o alcohólico-acuosa. La reacción tiene lugar a la temperatura ambiente y se completa en un breve periodo de tiempo, y la vitamina B_{12c} puede recuperarse evaporando a sequedad la mezcla de reacción, disolviendo el residuo en agua y cristalizando de una mezcla de agua y acetona. Los cristales pueden purificarse más por distribución en contracorriente entre 2:5 de o-cresol:tetracloruro de carbono y agua, sistema en el cual la vitamina B_{12c} muestra un coeficiente de distribución característico de unos 0.10 (Cv/Cs).-

La vitamina B_{12d} puede prepararse haciendo reaccionar vitamina B_{12} con bióxido sulfúrico en soluciones acuosas alcohólicas o acuoso-alcohólicas, con preferencia empleando un exceso considerable de bióxido sulfúrico y calentando suavemente la mezcla de reacción para asegurar la máxima conversión de vitamina B_{12} en vitamina B_{12b} . Esta última puede recuperarse evaporando a sequedad la mezcla de reacción



7
5
disolviendo el residuo en agua y cristalizando de una mezcla de agua y acetona. Los cristales pueden purificarse más por distribución en contracorriente entre 2:5 o-cresol:tetracloruro de carbono y agua, sistema en el cual la vitamina B_{12d} muestra el coeficiente de distribución característico de unos 1.63 (Cw/Cs).-

10 Aunque estudiando la reacción parecería que se necesita un mol de ion cianuro por mol de sustancia análoga a la vitamina B₁₂, ordinariamente preferimos usar un exceso de ion cianuro para asegurar que sea completa la conversión. Tratando una solución acuosa de sustancias análogas a B₁₂ con un exceso de un cianuro metálico, tal como cianuro sódico o cianuro amónico que den por resultado una solución alcalina, se forma un complejo intermedio de color de púrpura. Este complejo de púrpura parece ser la misma sustancia que se forma cuando se añade cianuro sódico a una solución acuosa de vitamina B₁₂. Después de acidificar una solución que contiene este complejo de púrpura, la solución vuelve al color rojo que es característico de la vitamina B₁₂. Sin embargo, en la ausencia de un exceso de un cianuro metálico o de un pH alcalino, esta acidificación no es necesaria, porque no se forma el complejo purpúreo. Cuando se utiliza cianuro de hidrógeno como fuente del ion cianuro, el complejo purpúreo no se forma ni aún empleando un exceso considerable.-

15
20
25

La vitamina B₁₂ obtenida por esta reacción es en todos respectos idéntica a la obtenida directamente de caldos



1950

195333

de fermentación. Esta identidad se ha establecido por comparación de los espectros de adsorción ultravioleta, visible e infrarrojo, rotación óptica, análisis elementales, estructura cristalina, puntos de fusión o descomposición, solubilidad de fase, conducta polarográfica y coeficiente de distribución, así como por la actividad microbiológica y clínica.-

Al realizar el procedimiento del presente invento, materias análogas a la vitamina B_{12} en varios periodos de recuperación de caldos de fermentación pueden hacerse reacciones con una sustancia que suministre iones cianuro. Así, por ejemplo, el caldo de fermentación puede tratarse con una pequeña cantidad de un cianuro adecuado, tal como cianuro potásico o sódico; o alternativamente, concentrados de los materiales análogos a la vitamina B_{12} , solos o en combinación con esta vitamina, pueden tratarse con una sustancia que suministre iones cianuro.-

Cuando un caldo de fermentación que contiene la vitamina B_{12} y sustancias análogas se trata según el presente invento, se añade al caldo una cantidad de una sustancia que da un exceso de iones cianuro para efectuar la conversión de las materias análogas a la vitamina B_{12} en esta última. La vitamina B_{12} se adsorbe luego de este caldo en un adsorbente adecuado, tal como tierra de batan, carbón vegetal etc. Este adsorbido puede usarse con un suplemento de B_{12} para fortificar alimentos animales, o alternativamente como material de partida para aislar la vitamina B_{12}

195333



pura.-

5 Pero al realizar el procedimiento del presente invento, es preferible emplear un concentrado de las materias análogas a la vitamina B₁₂, porque esto aminora el volumen de materias a tratar y reduce al mínimo la dificultad y peligros que implica el deshacerse del cianuro no reaccionado. También es preferible tratar con concentrado que contenga vitamina B₁₂ y materias análogas a ella, porque, como se ha indicado arriba, una de las ventajas prácticas del nuevo procedimiento es la de eliminar los difíciles y complicados procedimientos necesarios para separar estos materiales.-

10 La solución de concentrado sólido que contiene materias análogas a la vitamina B₁₂ se trata con una sustancia que de un exceso de iones cianuro de manera que asegure el íntimo contacto de los reactivos, y la terminación de la reacción. Con preferencia, la mezcla se agita a fondo y se deja en reposo durante breve tiempo, por ejemplo, de unos 15 a 45 minutos. Puede emplearse cualquier sustancia que de un exceso de iones cianuro, por ejemplo, ácido cianhídrico, una sal metálica o amónica del mismo, o mezclas de un cianuro metálico y un ácido que forme ácido cianhídrido in-situ. El cianuro metálico empleado en un medio neutro o alcalino solo necesita ser uno que de iones cianuro en las condiciones de reacción empleadas. Llenan este requisito los cianuros alcalinos y los de metales alcalino-térreos. Hemos descubierto, por ejemplo, que los cianuros de sodio, potásio, bario, calcio y estroncio pueden emplearse eficazmente.-

1950

195333

5 Cuando un concentrado sólido se trata con ácido cianhídrico líquido o gaseoso, hay suficiente ionización del ácido para que la reacción se realice en ausencia de un disolvente, aunque el empleo de este puede ser ventajoso. Sin embargo, la reacción entre las materias análogas a la vitamina B₁₂ y las sales de ácido cianhídrico, se realiza con preferencia en presencia de un disolvente que favorezca la ionización de la sal, por ejemplo alcoholes de uno a tres carbonos y mezclas de disolventes orgánicos y agua en los cuales sean solubles las materias análogas a la vitamina B₁₂ y la sustancia que da iones cianuro. En la operación en gran escala la reacción se realiza con la máxima conveniencia y economía en solución alcalina acuosa.-

15 Al decir que se emplea un exceso de ion cianuro, debe entenderse que esto significa más de la cantidad por debajo de la cual empieza a disminuir el rendimiento de la vitamina B₁₂ pura.- Esta cantidad se determina mejor experimentalmente para cada material de partida bruto, porque es evidente que la composición de varios caldos y concentra-
20 dos puede variar considerablemente. También puede obtenerse una aproximación a la cantidad de ion cianuro requerida midiendo la densidad óptica de una muestra de material a tratar, empleando la luz de 5.500 μ de longitud de onda, uno de los picos característicos de adsorción para la vitamina pura B₁₂. El valor obtenido, que representa color debido a la vitamina B₁₂, cuando está presente, más el debido a las sustancias análogas a la misma, se calcula como vita-

mina B₁₂ potencial. Por cada mg., de vitamina B₁₂ potencial así calculado, es preferible usar aproximadamente de 0.6 a 2 mg., de ion cianuro, lo cual parece ser exceso considerable.-

5 Se comprenderá que hay ordinariamente muchas impurezas no identificadas junto con las materias análogas a la vitamina B₁₂. Como estas impurezas pueden también reaccionar con ion cianuro, es preciso emplear un exceso suficiente del ion para satisfacer sus requisitos, así como lo bastante para asegurar la conversión completa de las materias análogas a la vitamina B₁₂.-

10 Cuando se realiza una reacción en solución acuosa empleando un cianuro metálico a pH alcalino, la formación del mencionado complejo de púrpura es una indicación visual adecuada de que se ha añadido un exceso de cianuro. El complejo purpúreo que se forma se convierte en vitamina B₁₂ acidificando la mezcla de reacción a un pH de unos 5 o más bajo. Para la acidificación pueden emplearse ácidos comunes tales como el clorhídrico, el sulfúrico y el acético.-

20 Debe entenderse que la cantidad de ion cianuro a emplear para convertir materiales análogos a la vitamina B₁₂ en esta vitamina, depende primariamente del tipo de producto deseado. Como la adición de ion cianuro en cantidades menores que la cantidad equivalente sobre una base molecular a la cantidad de materias análogas a la vitamina B₁₂ presentes produce una conversión parcial y proporcionada de dichas materias en la vitamina B₁₂, será evidente que cantidades de

ion cianuro tan bajas como un 10% aproximadamente de la cantidad requerida para reaccionar con todas las materias análogas a la vitamina B₁₂ presentes producirán un ventajoso aumento en el contenido en vitamina B₁₂ del producto resultante. Para efectuar la conversión completa de dichas materias en dicha vitamina, es importante usar por lo menos una cantidad de ión cianuro equivalente sobre una base molecular a la cantidad de materias análogas a la vitamina B₁₂ presentes. Como antes se ha indicado, las ventajas del presente invento aplicadas a la producción comercial de vitamina B₁₂ son de dos clases, que incluyen un notable aumento en la recuperación de vitamina B₁₂ de concentrados que la contengan en asociación con materias análogas a la misma y también la eliminación de operaciones difíciles que de otro modo serían necesarias para separar la vitamina B₁₂ de materias análogas a la misma asociadas. Claro es que la última de estas ventajas solo puede conseguirse plenamente si la cantidad de ion cianuro empleada en la reacción es bastante para reaccionar con todas las materias análogas a la vitamina B₁₂ que están presentes. En la practica real, la cantidad precisa de dichas materias presentes en una mezcla solo puede determinarse por procedimientos complicados y lentos, y por tanto la forma preferida de realizar la reacción sobre una base de producción es emplear un exceso definido de ion cianuro para asegurar que se conviertan en vitamina B₁₂ todas sus materias análogas.-

Terminada la reacción, se separa el cianuro no reaccionado por evaporación parcial a un pH ácido. La evaporación



1950

195333

5

10

15

20

25

puede realizarse a temperatura tan alta como 50-60° C., y con preferencia a presión reducida. La evaporación continua hasta que se ha separado virtualmente todo el exceso de cianuro de hidrógeno. Cuando un concentrado sólido se hace reaccionar con cianuro de hidrógeno líquido o gaseoso, el cianuro reaccionado puede separarse por evaporación al vacío o a la presión atmosférica. Por otra parte, cuando se hace reaccionar una solución con cianuro, es a veces aconsejable emplear una corriente de nitrógeno o aire para acelerar la separación del cianuro no reaccionado.-

Después de tratar con cianuro, acidificar (cuando sea necesario) y separar el cianuro no reaccionado como cianuro de hidrógeno, la mezcla de reacción se sigue tratando para obtener de ella vitamina B₁₂ pura. Se conocen varios procedimientos para tratar mezclas que contienen vitamina B₁₂ y obtener esta pura, y el presente invento no se limita el uso de un procedimiento particular de obtención. Uno de estos procedimientos que puede emplearse de manera práctica para recuperar vitamina B₁₂ comprende saturar una solución de la misma con una sal inorgánica (entre otras sulfato amónico, cloruro sódico, sulfato sódico y sulfato aluminico) y extraer la solución saturada con alcohol bencílico, secar el extracto de este, por ejemplo, calentándolo en el vacío a unos 75-80° C., y añadir éter a la solución seca de alcohol bencílico para efectuar la precipitación de vitamina B₁₂ bruta. Luego el precipitado se disuelve en agua saturada con alcohol bencílico y que contenga como un 2-3% de ácido

acético glacial. Esta solución y aproximadamente un volumen equivalente de agua saturada de alcohol bencílico se colocan en recipientes adecuados y se extraen sucesivamente con porciones aproximadamente equivalentes de alcohol bencílico saturado de agua. Estas extracciones, pueden hacerse continuamente o extrayendo sucesivamente las dos soluciones primeramente mencionadas con de 6 a 8 porciones de alcohol bencílico saturado de agua. Los extractos de alcohol bencílico combinados se secan luego y se tratan con éter para precipitar vitamina B₁₂ purificada. Este precipitado puede disolverse en agua y cristalizarse para obtener vitamina B₁₂ de 95% aproximadamente de pureza, que es la preferida para el uso clínico. Puede efectuarse ulterior purificación re-cristalizando de agua.-

Si el precipitado obtenido después de la extracción con alcohol bencílico no fuera lo bastante puro para dar vitamina B₁₂ de 95% o más de pureza al cristalizar, el precipitado puede purificarse más disolviendo en metanol, adsorbiendo la vitamina B₁₂ de la solución en una columna de alúmina activada, y desarrollando y lavando la columna con metanol. El rico efluente, al tratarlo con éter, da un nuevo precipitado de vitamina B₁₂ purificada. Alternativamente, la ulterior purificación puede hacerse repitiendo el procedimiento de extracción con alcohol bencílico. Debe entenderse a este respecto que los residuos acuosos de la extracción con alcohol bencílico y las fracciones de lavado bajas en vitamina B₁₂ contenidas en la operación de purifi-

cación cromatográfica pueden tratarse de nuevo con ion cianuro como aquí se describe y someterse a nuevo procedimiento para producir cantidades adicionales de vitamina B₁₂.-

La extracción con agua y alcohol bencílico en contracorriente arriba descrita se describe más detalladamente y se reivindica en la solicitud pendiente con esta de Brink y Wolf, nº de serie , presentada el

(caso nº 2782). Para comprobar la cantidad de vitamina B₁₂ presente en varios concentrados intermedios y determinar la misma antes y después del tratamiento con cianuro, es necesario disponer de un procedimiento de ensayo. Hemos descubierto que es ventajoso emplear una modificación de la extracción con agua y alcohol bencílico en contracorriente como procedimiento de ensayo. Este se basa en un coeficiente de distribución determinado experimentalmente para la vitamina B₁₂ de 1.2 para el sistema agua:alcohol bencílico.-

Al realizar el procedimiento de ensayo, material de contenido desconocido en vitamina B₁₂ se somete a una distribución en contracorriente de ocho placas entre porciones de igual volumen de agua y alcohol bencílico. Se ha descubierto que las sustancias análogas a la vitamina B₁₂ y otras interferentes tienen coeficientes de distribución mucho más altos, y se hallarán en las tres primeras placas de la distribución. Adicionalmente, se encuentran presentes en algunos casos sustancias de coeficiente de distribución más bajos, que se hallarán en las tres últimas placas de la distribución. La curva de distribución de la vitamina B₁₂

195333

para llega a un pico en la placa cuarta. La densidad óptica del contenido de la cuarta (o quinta) placa se mide a 5.500 μ , y el valor obtenido representa color debido a la vitamina B_{12} . Por comparación con la densidad óptica de vitamina B_{12} pura ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 63$) puede calcularse el contenido en vitamina B_{12} de la placa. La placa cuarta contiene 29.1% (24.2% en la quinta placa) de la total vitamina B_{12} presente en el material desconocido. De esta manera se puede calcular la cantidad total de vitamina B_{12} presente. Este procedimiento de ensayo ordinariamente da un valor absoluto para la vitamina B_{12} cuando el material desconocido es alto en dicha vitamina, esto es, superior a un 75% aproximadamente, según la naturaleza de las impurezas. Al disminuir la pureza, el procedimiento es menos seguro para determinar valores absolutos, debido a las impurezas interferentes adicionales; el procedimiento de ensayo entonces indica la cantidad máxima de vitamina B_{12} presente. Materias brutas muy bajas en dicha vitamina y que contenga color interferente puede someterse a distribución en contracorriente con subsiguiente ensayo de LLD la cuarta(o quinta) placa, en vez de medición de color, y la cantidad máxima de vitamina B_{12} presente se calcula luego a base de 11.000.000 de unidades LLD por mg., de vitamina B_{12} . El siguiente es un método de realizar el procedimiento de ensayo anterior:

A cada uno de ocho tubos centrifugos de 15 ml., se añaden 5 ml. de agua saturada de alcohol bencílico. Al primer tubo se le añade material sólido a ensayar en cantidad

calculada para que contenga como 1-10 mg de vitamina B₁₂.-

Luego se añaden al primer tubo 5 ml de alcohol bencílico saturado de agua, se agita el tubo y las fases se separan por centrifugación. La fase más baja (alcohol bencílico) se trans-

5 fiere al segundo tubo, donde el procedimiento se repite. El procedimiento se continua en cada tubo sucesivo hasta que la fase de alcohol bencílico está en equilibrio con el agua del octavo tubo. Una segunda porción de 5 ml de alcohol bencílico saturado de agua se hace pasar luego por cada tubo sucesivamente de igual manera, hasta que está en equilibrio con el agua del tubo séptimo. Este procedimiento se continúa con seis porciones más de alcohol bencílico, después de lo cual los ocho tubos contienen dos fases en equilibrio. Al contenido del cuarto (o quinto) tubo se añaden 10 ml de cloro-

10 formo, para transferir la vitamina B₁₂ a la capa de agua. La densidad óptica de la capa de agua se determina luego a 5.500 Å en una celda de 1 cm. La cantidad total de vitamina B₁₂ presente se calcula luego partiendo de este valor como se ha descrito arriba.-

15 Los siguientes ejemplos muestran varios procedimientos para tratar materias similares a la vitamina B₁₂ con ión cianuro para convertirlas en ella, así como indican el mayor rendimiento de vitamina B₁₂ obtenido al someter a reacción con ión cianuro mezclas que contienen vitamina B₁₂ y materias

20 analogas a ella. Pero debe entenderse que estos ejemplos se dan con carácter ilustrativo y no limitativo.-

195333

E J E M P L O I.

Preparación preliminar de concentrado de vitamina B₁₂.

Unos 10.000 litros de caldo de fermentación obtenido de la elaboración de una raza de S. griseus, y que da en el ensayo 4.630 unidades por ml de actividad LLD se acidificaron a pH 2.5 con ácido fosfórico, se sometieron a filtración de clarificación preliminar con tierra de diatomáceas, se neutralizarón a pH 7-8 con hidróxido sódico y se filtraron de nuevo con tierra de diatomáceas. Luego el filtrado se trató con unos 44 kg de carbón vegetal activado para adsorber factores activos. Después de separar por filtración, el carbón vegetal se agitó con unos 200 litros de n-butanol durante 15 minutos. Se añadieron a la mezcla unos 150 litros de agua y 12,5 kg de ayuda de filtro y la mezcla se agitó 45 minutos. Este lavado de agua y n-butanol se describe más detalladamente y se reivindica en una solicitud pendiente con esta de Briggs, Denkwalter y Hughey, Nº de serie , presentada (caso Nº 2.783).-

El s'lido se separó por filtración en una cesta centrífuga y luego se lavó varias veces en la centrífuga con un total de unos 180 litros de agua que previamente se habían saturado de butanol. El filtrado y los lavados se combinaron y se separaron las capas de butanol y agua. La capa de agua, que contenía prácticamente todo el material activo LLD se filtró para separar las partículas finas de carbón.-

A unos 220 litros de capa de agua filtrada obteni-

195333

15-11-1950

dos se añadieron unos 60 litros de alcohol bencílico y 212,5 kg de sulfato amónico. La mezcla se agitó 15 minutos y luego se dejó en reposo durante una hora. La capa de agua se separó y se volvió a extraer con unos 38 litros de alcohol bencílico. Los extractos de alcohol bencílico se combinaron y secaron sobre sulfato sódico anhidro. El volumen de los extractos secos era de unos 125 litros (el aumento de volumen se debía a la presencia de butanol.-

La solución de alcohol bencílico se cromatografió luego en 20 kg de alúmina activada. Cuando se hubo suministrado toda la solución a la columna, ésta se lavó con una mezcla de 1:2 de metanol y acetona hasta que el fluente era claro como agua. Luego la columna se desarrolló con metanol, recogiendo todo el efluente que contenía coloración roja como fracción rica. Se obtuvieron de esta 52 litros.-

El efluente rico se concentró en el vacío a menos de 35º C., hasta unos 2 litros y precipitó por la adición de un volumen de acetona y cuatro volúmenes de éter.-

El precipitado se extrajo a porciones con metanol hasta que quedó un residuo blanco. La densidad óptica de la solución de metanol, medida a 5.500 Å, indicó un máximo de 416 mg de vitamina B₁₂ y materias análogas. Una parte alícuota de la solución de metanol se trató con éter para efectuar la precipitación y el precipitado se sometió a distribución en contracorriente de ocho tubos en el sistema alcohol bencílico-agua. La cantidad máxima de vitamina B₁₂ presente, determinada por el ensayo en contracorriente, fué de



1950

195333

187 mg.-

Conversión con cianuro de materias análogas a la vitamina B₁₂

El resto de la solución se dividió en dos partes y una mitad se trató con éter para precipitarla. El precipitado se disolvió en unos 100 ml de agua. Se añadieron 8 ml de una solución acuosa de cianuro potásico al 1%, agitando, y la solución se dejó en reposo unos 15 minutos. La solución se trató luego con ácido clorhídrico a un pH aproximado de 4. Se añadieron 70 g de sulfato amónico y la mezcla se extrajo con porciones de 20 ml, 10 ml y 10 ml de alcohol bencílico. Los extractos de éste se secaron calentando a 75-80º C., en el vacío, y la solución resultante se filtró y trató con éter para precipitarla.-

El precipitado se disolvió en 20 ml de agua previamente saturada de alcohol bencílico y a la cual se habían añadido 0.5 ml de ácido acético glacial. La solución se puso en un tubo centrífugo de 40 ml. A un segundo tubo centrífugo de 40 ml se añadieron 20 ml de agua saturada de alcohol bencílico. Luego se hicieron pasar por los dos tubos en contracorriente siete porciones de 20 ml de alcohol bencílico saturado de agua, empleándose cada porción de alcohol bencílico para extraer primero el tubo Nº 1 y luego el tubo Nº 2. Luego las soluciones de alcohol bencílico se combinaron, se secaron calentando en el vacío y se trataron con éter para precipitarlas. (Se observará que este procedimiento de extracción en contracorriente es equivalente a la distribución en contracorriente para separar la vitamina B₁₂ de cual-

quiera materias análogas residuales. No es necesario mantener separados los últimos tubos de la distribución en contracorriente, porque en este punto todos contienen vitaminas B₁₂ esencialmente pura).-

- 5 El precipitado obtenido se disolvió en 1.1 ml de agua y se dejó cristalizar. Los cristales se separaron por centrifugación y se recrystalizaron disolviéndolos en 10 ml de agua, añadiendo acetona (unos 120 ml) hasta la turbiedad y dejando en reposo la solución. El peso de los cristales
- 10 obtenidos fué 127 mg (secos a 100° C en el vacío) y mostró una pureza de 95% en el ensayo de distribución en contracorriente. La identidad de estos cristales con la vitamina B₁₂ autentica se comprobó por comparación de las propiedades físicas y químicas.- Los resultados se ven en el siguiente
- 15 cuadro:

Comparación del producto del procedimiento de cianuro con vitamina B ₁₂ autentica.-		
Coefficiente distribución,	Producto del procedimiento del cianuro.-	Vitamina B ₁₂
Agua/ alcohol bencílico	1.2	1.2
Espectro de absorción, max. (λ)	2780,3615,5500	2780,3610,5500
Absorción infrarroja	Ambos materiales corresponden en detalle	
Indice de refracción:		
α	1.618 ± 0.002	1.616 ± 0.002
β	1.650 ± 0.002	1.652 ± 0.002
γ	1.668 ± 0.002	1.664 ± 0.002

Comparación del producto del procedimiento de cianuro con vitamina B₁₂ auténtica.-

	Producto del procedimiento de cianuro	Vitamina B ₁₂
Reacción óptica	-61° ± 9	-59° ± 9
Comparación de solubilidad	La determinación de la solubilidad absoluta en solución acuosa así como la solubilidad mixta en una solución saturada de vitamina B ₁₂ auténtica indicaron que ambos materiales eran idénticos.-	

20 La solución acuosa restante de la distribución en contracorriente modificada que arriba se describe se volvió a tratar con cianuro potásico acuoso. La solución se acidificó de nuevo y luego se extrajo con solución de 2:1 de tetracloruro de carbono y cresol (según se describe y reivindica en una solicitud pendiente con esta de Denkwalter, Malcolmson, y Hughey, nº de serie , presentada el

25 (caso nº 2779), y los extractos se trataron con eter para precipitarlos. El precipitado se disolvió en una pequeña cantidad de metanol y se trató de nuevo con eter para efectuar la precipitación. El precipitado se disolvió luego

en 0.13 ml., de agua y se dejó cristalizar. Los cristales se
recristalizaron en una mezcla de agua y acetona. El peso de
los cristales obtenidos fué 47 mg., (secos a 100° C., en el
vacío). Se comprobó que los cristales eran vitamina B₁₂ pura
al 73% en el ensayo de distribución en contracorriente.-

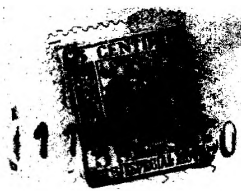
Así se obtuvo el equivalente de 153.3 mg., de vitamina
B₁₂ pura de unos 5.000 litros de caldo de fermentación,
empleando el nuevo procedimiento.-

La segunda mitad de la solución metanólica primitiva
se vió que daba unos 50 mg., de vitamina B₁₂ después de trata-
da virtualmente de igual modo que la primera mitad, salvo que
se omitió el cianuro, indicando que el tratamiento de cianuro
dió por resultado un aumento del triple en la cantidad de vi-
tamina B₁₂ aislada.-

Cuando el procedimiento anterior se repite usando
cianuro amónico, bórico y cálcico en vez del potásico, los re-
sultados en cada caso muestran aproximadamente un aumento
triple en la cantidad de vitamina B₁₂ recuperada, debido al
tratamiento de cianuro.-

E J E M P L O II.-

Un concentrado intermedio obtenido de la propaga-
ción de S. griseus que contenía vitamina B₁₂ y sustancias
análogas a la misma, se purificó por distribución en contra-
corriente entre agua y alcohol bencílico, empleando dos tubos
de agua y haciendo pasar por cada uno de ellos en sucesión,
en total de siete porciones de alcohol bencílico, del modo



5 descrito en el ejemplo I₂- El concentrado no se había tra-
 tado previamente, con cianuro. Luego el material purificado
 en los extractos de alcohol bencílico se trató de nuevo para
 obtener vitamina B₁₂ pura. Las capas de agua, que contenían
 10 materias análoga a la vitamina B₁₂, una pequeña cantidad de
 esta e impurezas desconocidas se combinaron y trataron con
 éter, y se formó un precipitado amorfo que se separó y secó.
 Operando según los métodos anteriores, este precipitado se
 volvió a elaborar normalmente con otras fracciones ajenas
 para ofrecer una pequeña recuperación adicional de vitamina
 B₁₂ después de muchas operaciones de purificación. Sin embar-
 go, había aún considerable pérdida de las sustancias activas
 presentes.-

15 Una porción del precipitado amorfo se trató para
 fines comparativos y varias partes se trataron con cianuro
 como sigue:

20 a) Una porción del precipitado se disolvió en agua
 y se analizó espectrográficamente. Se observaron tipos de
 absorción a 3.610 μ y 5.200 μ . La solución se sometió luego
 a distribución en contracorriente entre agua y alcohol ben-
 cílico en la forma descrita en el procedimiento de ensayo.
 Las mediciones de densidad óptica, en el quinto tubo de la
 distribución en contracorriente indicaron que un máximo de
 25 51% del total de vitamina B₁₂ y sustancias análogas presentes
 era realmente vitamina B₁₂, representando 0.112 mg., de vita-
 mina por mg., de sólido originario.-

b) 10.5 mg., del precipitado amorfo se disolvieron

OV. 1950

195333

en 3 ml., de agua y se añadieron 0.2 ml., de cianuro de hidrógeno líquido. La solución se dejó en reposo corto tiempo y luego se calentó a 50-60° C., para separar el exceso de cianuro de hidrógeno. Los análisis espectrográficos de la solución resultante mostraron picos de adsorción a 3.610 μ , 5.200 μ y 5.500 μ , indicando un cambio hacia el espectro de la vitamina B₁₂. La solución se sometió a distribución en contracorriente entre agua y alcohol bencílico. La medición de la densidad óptica de la solución en el quinto tubo mostró que el 88.3% del total de vitamina B₁₂ y sustancias análogas presentes era vitamina B₁₂, representando 0.220 mg., de vitamina B₁₂ por mg., de material de partida, o sea un aumento de 96%.-

c) 99,6 mg., del precipitado amorfo se disolvieron en 2 ml., de metanol y se añadieron 0.2 ml., de cianuro de hidrógeno anhidro líquido. La solución se dejó 15 minutos en reposo en un baño de hielo y luego se calentó a sequedad a 50-60° C. El residuo se disolvió en agua y los análisis espectrográficos mostraron picos de adsorción a 3.610 μ , 5.200 μ y 5.500 μ , indicando un cambio hacia el espectro de la vitamina B₁₂.-

La solución acuosa se sometió a distribución en contracorriente entre agua y alcohol bencílico. La medición de la densidad óptica del material en el quinto tubo mostró que el 81% del total de vitamina B₁₂ y sustancias análogas era dicha vitamina, representando 0.219 mg., de vitamina B₁₂ por mg., de material de partida, o sea un aumento de 95.5%.

Estas partes adicionales del precipitado amorfo se trataron con cianuro de hidrógeno anhidro líquido en etanol, alcohol bencílico y solución de cresol respectivamente, en vez de en solución de metanol. Se obtuvieron aumentos del contenido en vitamina B₁₂ en todos los casos, siendo los aumentos del mismo orden de magnitud que los obtenidos empleando metanol.-

d) 10,8 mg., de precipitado amorfo se mezclaron a fondo con 2.2 ml., de cianuro de hidrógeno anhidro líquido y se dejaron en reposo hasta que el cianuro de hidrógeno se hubo evaporado. El residuo se disolvió en agua y los análisis espectrográficos de la solución resultante mostraron picos de adsorción a 3.610 Å, 5.200 Å y 5.500 Å, indicando un cambio hacia el espectro de la vitamina B₁₂. La solución acuosa se sometió a distribución en contracorriente entre agua y alcohol bencílico. La medición de la densidad óptica del quinto tubo indicó que el 81% del total de vitamina B₁₂ y sustancias análogas era dicha vitamina, representando 0.198 mg., de vitamina B₁₂ por mg., de material de partida, o sea un aumento de 77%.-

EJEMPLO III.-

Unos 13.500 litros de caldo de fermentación de varias tandas obtenidas de la propagación de una raza de S. griseus se sometieron al tratamiento mediante adsorción con carbón vegetal, lavado con butanol y agua, extracción con alcohol bencílico, cromatografía y precipitación como

195333

se describe en el ejemplo 12. Los sólidos precipitados se extrajeron con metanol hasta que quedó un residuo blanco. La densidad óptica de la solución metanólica obtenida, medida a 5.500 μ y comparada con el valor de la vitamina pura B₁₂ indicó que había presentes 540 mg., de vitamina B₁₂ y sustancias análogas. A la solución metanólica se añadió acetona y eter para precipitarla hasta que los líquidos no tenían coloración rosa.-

El precipitado se disolvió en 300 ml., de agua y se ajustó a pH 8 aproximadamente con solución acuosa de hidróxido sódico. A esta solución se añadieron 2.7 g., de cianuro sódico y la solución se dejó en reposo, con alguna agitación, durante 45 minutos. (La solución tenía color de púrpura que indicaba haberse añadido un exceso definido de cianuro). Luego la solución se acidificó a pH 3 aproximadamente con ácido clorhídrico y se hizo pasar nitrógeno por la solución para separar el cianuro de hidrógeno. Se añadieron 210 g., de sulfato amónico a la solución, y se extrajo con porciones de 50 ml., 25 ml., 25 ml., 25 ml., y 10 ml., de alcohol bencílico, los extractos se secaron calentando a 75-80° C., en el vacío, y los extractos secos se filtraron por un embudo de vidrio concrecionado. Se añadió eter al filtrado para precipitarlo.-

El precipitado se disolvió en 100 ml., de agua a la que se habían añadido 2 ml., de ácido acético glacial, y en un segundo tubo se pusieron 100 ml., de agua saturada de alcohol bencílico. Se realizó un procedimiento de purifica-

ción por distribución en contracorriente modificado, haciendo pasar siete porciones de 100 ml., de alcohol bencílico saturado de agua por cada tubo en sucesión, como se describe en el ejemplo I, y los extractos de alcohol bencílico se combinaron después de separarlos del segundo tubo. Los extractos combinados se secaron calentando a 75-80° C., en el vacío. Se añadió eter a los extractos secos para la precipitación.-

El precipitado se disolvió en metanol y se cromatografió sobre alúmina activada, desarrollando la columna con metanol. El rico efluente se trató con eter para efectuar la precipitación. Las fracciones de cola de la cromatografía, que contenían color a 5.500 Å, que calculado como vitamina B₁₂ era equivalente de unos 90 mg., de la misma, se separaron para nueva elaboración. El precipitado se disolvió en 1.9 ml., de agua y se dejó cristalizar. Los cristales rojos se disolvieron en 20 ml., de agua y la solución se filtró. Se emplearon 20 ml., más de agua para lavar el equipo y se añadieron a la solución. Se añadieron 520 ml., de acetona y sobrevino cristalización. Los cristales se separaron por centrifugación, se lavaron con acetona y se secaron a 56° C., en el vacío. Se obtuvieron 324,7 mc., de cristales rojos. Una muestra de los cristales perdió el 5% de su peso al secarse a 100° C., Se vió que la muestra seca era vitamina B₁₂ pura al 94%, por el ensayo de distribución en contracorriente, indicando una recuperación de 290 mg., de vitamina B₁₂ pura.-

Se descubrió que se obtenían virtualmente los mismos resultados cuando el tratamiento con cianuro se realizaba en

solución acuosa de metanol y de etanol.-

E J E M P L O IV.-

5 El tratamiento de cianuro para convertir en vitamina B₁₂ las materias análogas a ella se aplicó a caldo de fermentación y se hizo una evaluación de la conversión usando el procedimiento de ensayo en contracorriente. 3 litros de caldo de fermentación obtenidos de la elaboración de una raza de S. Griseus se trataron con 2.1 g., de cianuro sódico
10 disuelto en una pequeña cantidad de agua. La solución se agitó durante dos horas y se llevó a pH 4 con ácido clorhídrico concentrado. Se aplicó vacío de modo que el aire burbujeara por la solución durante la noche. Se añadieron a la solución 2.150 g., de sulfato amónico y 30 ml., de alcohol bencílico. La mezcla se agitó y dejó sedimentar y se extrajo
15 la capa de alcohol bencílico. La capa acuosa se volvió a extraer con una porción de 20 ml., y 3 porciones de 10 ml., de alcohol bencílico. La capa de agua agotada que no contenía actividad LLD se desechó. Los extractos de alcohol bencílico combinados se diluyeron con 2 volúmenes de cloroformo
20 y se extrajeron con tres porciones de agua de 5 ml., 10 ml., de la solución acuosa, que contenían unas 300.000 LLD unidades por ml., se sometieron a una distribución en contracorriente de ocho placas con alcohol bencílico, usando fases
25 de 10 ml. Los resultados de la distribución en contracorriente se ven en el cuadro siguiente:-

Idéntico tratamiento se realizó con tres litros del



350

195333

mismo caldo, salvo que no se añadió cianuro sódico. La solución acuosa primitiva obtenida por extracción con alcohol bencílico se sometió de nuevo a distribución con contracorriente de alcohol bencílico. Los demás resultados se ven en el cuadro

5

Efecto del cianuro sódico en la conversión de la actividad LLD en caldo den vitamina B₁₂.- (Resultados del ensayo de distribución en contracorriente en el sistema alcohol bencílico y agua.)

Distribución por ciento

Tubo No	Caldo sin tratar	Caldo tratado.	Vitamina B ₁₂ pura
1	28.7	1	1.4
2	19.1	6.1	8.3
3	23.4	29.0	20.9
4	15.5	29.2	29.1
5	5.4	20.9	24.2
6	3.9	11.2	12.1
7	2.6	2.6	3.3
8	0.7	0.9	0.4

25

El cuadro anterior muestra un marcado cambio en la conducta de distribución en contracorriente de la actividad LLD hacia la conducta típica de la vitamina B₁₂ después de



tratar el caldo con cianuro sódico. Por los datos anteriores no es posible calcular exactamente las cantidades de vitamina B₁₂ contenidas en los caldos tratados y sin tratar. Sin embargo, se verá que la distribución del caldo tratado es diferente de la del caldo sin tratar y muy similar a la de la vitamina B₁₂ pura. Además, es evidente que la actividad del caldo tratado en el cuarto tubo (que muestra un contenido máximo de vitamina B₁₂) es casi doble que la del caldo sin tratar.-

5

E J E M P L O V.-

Se obtuvo un caldo de fermentación en la propagación de una raza de S. griseus. 100 litros del caldo se acidificaron a pH 2.5 empleando ácido clorhídrico. Luego el caldo se trató con 220 mg., de cianuro sódico, y la tanda se agitó durante 10 minutos. Se añadieron 100 g., de tierra de batán y 100 g., de tierra de diatomáceas. El lodo resultante se agitó 30 minutos, y el adsorbido se separó por filtración y secó a 500 C.- Este adsorbido mostró una actividad de 483.000 unidades por g., cuando se comprobó sobre l. lactis Dorner por el ensayo de taza y se comprobó que favorecía el crecimiento de los pollos.-

15

20

25

Virtualmente todo el material activo del caldo es adsorbido por el tratamiento con tierra de batán en las condiciones descritas. Como el contenido en vitamina B₁₂ del caldo aumenta notablemente por el tratamiento con cianuro, como se ve en el ejemplo IV, aumenta proporcionalmente el contenido en vitamina B₁₂ del adsorbido así preparado del cal-



195333

do tratado.-

EJEMPLO VI.-

5 4 mg., de vitamina B_{12a}, que mostraban máximos en el espectro de adsorción a 2.750 Å, 3.520 Å y 5.300 Å, y 42 mg., de cianuro potásico se disolvieron en un ml., de agua. La solución roja cambió inmediatamente a una solución de color de púrpura al añadir el cianuro potásico. El espectro de absorción de esta solución mostró máximos a unos 2.780 Å, 10 3.700 Å, 5.400 Å y 5.800 Å, lo cual es lo mismo que el espectro dado por una solución de vitamina B₁₂ cuando se trata con cianuro potásico. Al cabo de un minuto aproximadamente la solución de color de púrpura se ajustó a pH 4-5 con 3-4 gotas de ácido clorhídrico diluido, con lo cual el color de la solución cambió a rojo.-

15 Esta solución se equilibró con 1 ml., de una solución de o-cresol y tetracloruro de carbono (2.5 de volumen) saturado con agua. Después del equilibrio solo se encontró un vestigio de color en la capa de cresol y tetracloruro de carbono. Esta solución de cresol y tetracloruro de carbono se extrajo luego nueve veces con porciones de 1 ml., de agua saturada de o-cresol y tetracloruro de carbono, lo cual separó una cantidad muy pequeña de material coloreado. Luego la solución de cresol y tetracloruro de carbono se diluyó con 20 10-12 volúmenes de dicho tetracloruro y el producto se extrajo agitando con tres porciones de 1 ml., de agua. Los extractos acuosos se combinaron y lavaron cuatro veces con porciones

de 1 ml., de éter para separar vestigios de disolventes. La solución acuosa resultante de vitamina B₁₂ se evaporó a sequedad en el vacío a 25-30° C. El residuo se disolvió en unos 0.25 ml., de agua y la solución se diluyó luego con unos 100 volúmenes de acetona. Después de menos de media hora, empezaron a formarse en la solución finas agujas rojas de vitamina B₁₂. La solución se dejó en reposo unas 20 horas y los cristales se separaron por centrifugación, se lavaron 3-4 veces con porciones de 1 ml., de acetona y se secaron; rendimiento 2.4 mg. El espectro de absorción de estos cristales de vitamina B₁₂ mostró máximos a 2.780 μ ($E_{1\text{cm.}}^{1\%} = 112$), 3.610 μ ($E_{1\text{cm.}}^{1\%} = 193$) y 5.500 μ ($E_{1\text{cm.}}^{1\%} = 60$). El material era vitamina B₁₂ esencialmente pura.

E J E M P L O VII.-

4 mg., de vitamina B_{12b} y 42 mg., de cianuro potásico se disolvieron en 1 ml., de agua. A cosa de un minuto la solución purpúrea se reguló a pH 4-5 con 3-4 gotas de ácido clorhídrico diluido. Esta solución se equilibró con 1 ml., de una solución de o-cresol y tetracloruro de carbono (2-5 de volumen) saturada de agua. Después de equilibrar, solo un vestigio de color se encontró en la capa de cresol y tetracloruro de carbono. Esta solución de cresol y tetracloruro de carbono se extrajo luego nueve veces con porciones de 1 ml., de agua saturada de o-cresol y tetracloruro de carbono, lo cual quitó una cantidad muy pequeña de materia coloreada. La solución de cresol y tetracloruro de carbono se diluyó

luego con 10-12 volúmenes de tetracloruro de carbono y el producto se extrajo agitando con tres porciones de 1 ml. de agua. Los extractos acuosos se combinaron y lavaron cuatro veces con porciones de 1 ml. de éter. La solución acuosa de vitamina B₁₂ se evaporó a sequedad en el vacío a 25-30° C. El residuo se disolvió en unos 0.25 ml., de agua y luego se diluyó con unos 10 volúmenes de acetona. Después de menos de media hora empezaron a formarse en la solución finas agujas de vitamina B₁₂. La solución se dejó en reposo unas 20 horas y luego los cristales se separaron por centrifugación, se lavaron 3-4 veces por porciones de 1 ml., de acetona y se secaron; rendimiento, 3.3 mg., Los espectros de absorción de los cristales de vitamina B₁₂ mostraron máximos a 2.780 Å (E $\frac{1^\circ}{1\text{cm.}}$ = 115), 3.610 Å (E $\frac{1^\circ}{1\text{cm.}}$ = 188) y 5.500 Å (E $\frac{1^\circ}{1\text{cm.}}$ = 59). El producto era vitamina B₁₂ virtualmente pura.-

E J E M P L O VIII.-

3.4 mg., de vitamina B_{12c} y 38 mg., de cianuro potásico se disolvieron en 1 ml., de agua. Cosa de un minuto después la solución purpúrea se reguló a pH 4-5 con 3-4 gotas de ácido clorhídrico diluido. Esta solución se equilibró con 1 ml., de una solución de o-cresol y tetracloruro de carbono (2:5 de volumen) saturada de agua. Después de equilibrar, se encontró en la capa de cresol y tetracloruro de carbono solo un vestigio de color. Esta solución de cresol y tetracloruro de carbono se extrajo luego nueve veces con porciones de 1 ml., de agua saturada de o-cresol y tetracloruro de carbono, lo cual



105333

separó una cantidad muy pequeña de material coloreado. Luego la solución de cresol y tetracloruro de carbono se diluyó con 10-12 volúmenes de tetracloruro de carbono, y el producto se extrajo agitándolo con tres porciones de 1 ml., de agua. Los extractos acuosos se combinaron y lavaron cuatro veces con porciones de 1 ml., de éter. La solución acuosa resultante de vitamina B₁₂ se evaporó a sequedad en el vacío a 25-30° C. El residuo se disolvió en unos 0.25 ml., de agua y se diluyó con unos 10 volúmenes de acetona. Después de menos de media hora empezaron a formarse finas agujas rojas de vitamina B₁₂ en la solución. Esta se dejó en reposo unas 20 horas, y los cristales se separaron por centrifugación, se lavaron 3-4 veces con porciones de 1 ml., de acetona y se secaron; rendimiento: 2.3 mg.. Los espectros de absorción de los cristales de vitamina B₁₂ mostraron máximos a 2.780 Å (E_{1cm.}^{1%} = 115), 3.610 Å (E_{1cm.}^{1%} = 198), y 5.500 Å (E_{1cm.}^{1%} = 61). El material, era vitamina B₁₂ esencialmente pura.-

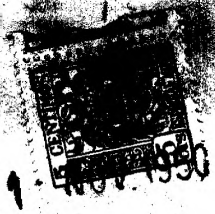
E J E M P L O IX.-

2 mg., de vitamina B_{12d} y 18 mg., de cianuro potásico se disolvieron en 1 ml., de agua. A cosa de un minuto la solución purpúrea se ajustó a pH 4-5 con 3-4 gotas de ácido clorhídrico diluido. Esta solución se equilibró con un ml., de una solución de o-cresol y tetracloruro de carbono (2-5 de volumen) saturada de agua. Después de equilibrar, no se encontró en la capa de cresol y tetracloruro de carbono sino un vestigio del color. Esta solución de cresol y tetracloruro

de carbono se extrajo luego nueve veces con porciones de 1 ml de agua saturada de o-cresol y tetracloruro de carbono, que separó una cantidad muy pequeña de material coloreado. La solución de cresol y tetracloruro de carbono se diluyó luego
5 con 10-12 volúmenes de tetracloruro de carbono y el producto se extrajo agitando con tres porciones de 1 ml de agua. Los extractos acuosos se combinaron y lavaron cuatro veces con porciones de 1 ml de éter. Las soluciones acuosas de vitamina B₁₂ se evaporó a sequedad en el vacío a 25-30° C., El
10 residuo se disolvió en unos 0.25 ml de agua y luego se diluyó con unos 10 volúmenes de acetona. Después de menos de media hora se empezaron a formar en la solución finas agujas rojas de vitamina B₁₂. La solución se dejó en reposo durante unas 20 horas y luego los cristales se separaron por cen-
15 trifugación, se lavaron 3-4 veces con porciones de 1 ml de acetona y se secaron; rendimiento, 1.1 mg. Los espectros de absorción de los cristales de vitamina B₁₂ mostraron máximos a 2790 Å ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 110$), 3.610 Å ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 196$) y 5.500 Å ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 60$). El producto era esencialmente vitamina B₁₂ pura.-

E J E M P L O X.-

20 Se preparó una solución acuosa de cianuro de hidrógeno destilando una solución de 50 mg., de cianuro sódico en 20 ml., de ácido sulfúrico al 5%. El destilado se añadió a una solución de 4.2 mg., de vitamina B_{12a} (originariamente el material mostró máximos de absorción 2.750 Å, 3.540 Å y 5.300
25 Å) en 3ml., de agua. Al cabo de unos cuantos minutos a la



temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a sequedad. El residuo, disuelto en 0.5 ml., de agua y tratado con 5 ml., de acetona depositó 3.4 mg., de típicos cristales aciculares rojos de vitamina B₁₂, que mostraron máximos de absorción a 2.780 Å, 3.610 Å y 5.500 Å.-

5 Cuando las vitaminas B_{12b}, B_{12c} y B_{12d} se hicieron reaccionar con cianuro en la forma descrita en el ejemplo 10 se obtuvo un producto cristalino rojo que mostraba los espectros de absorción característicos de la vitamina B₁₂, esto es, máximos a 2.780 Å, 3.610 Å y 5500 Å.-

10 Varios cambios y modificaciones en los procedimientos anteriores se les ocurrirán a los profesionales; y en la medida en que dichos cambios y modificaciones están comprendidas en las reivindicaciones anexas, debe entenderse que constituyen parte de nuestro invento.-

15 La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América con fecha 15 de noviembre de 1.949, bajo el número 127.519, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.-

20

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presen-

tan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años, son los siguientes:

5 1º.- Un procedimiento que comprende hacer reaccionar materias análogas a la vitamina B₁₂ con una sustancia que da iones cianuro para convertir dichas materias en vitamina B₁₂.-

10 2º.- Un procedimiento que comprende hacer reaccionar una mezcla que contiene vitamina B₁₂ y materias análogas a ella, obtenidas por la propagación de un microorganismo que produce vitamina B₁₂ en un medio de cultivo adecuado con una sustancia que da iones cianuro, para convertir así en más vitamina B_{12m} las citadas materias análogas a ella.-

15 3º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 2º, en el cual la mezcla de partida es el caldo fermentado producido en la propagación de dicho microorganismo.-

4º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 2º, en el cual la mezcla de partida es una solución concentrada de vitamina B₁₂ y materias análogas a ella.-

20 5º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 2º, en el cual la mezcla de partida es un concentrado sólido de vitamina B₁₂ y materias análogas a ella.-

6º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual se emplea un exceso de las sustancias que da iones cianuro.-

25 7º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual se emplea un exceso de la sustancia que da iones cianuro, y después de terminada la reacción se dis-



pone un pH ácido en la mezcla de reacción y el cianuro no reaccionado se separa como ácido cianhídrico gaseoso.-

5 89.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual se emplea una solución ácida de la mezcla de reacción para recuperar de ella vitamina B₁₂.-

90.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la sustancia que da iones cianuro es una sal ionizable del ácido cianhídrico.-

10 100.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la sustancia que da iones cianuro es un cianuro de metal alcalino.-

110.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la sustancia que da iones cianuro es cianuro sódico.-

15 120.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la sustancia que da iones cianuro es cianuro amónico.-

20 130.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la sustancia que da iones cianuro es ácido cianhídrico.-

140.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la sustancia que da iones cianuro es ácido cianhídrico formado in situ por reacción de un cianuro metálico y un ácido.-

25 150.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la reacción se realiza en presencia de un disolvente que favorece la ionización de la sustancia que



1950

195338

da iones cianuro, disolvente seleccionado de la clase compuesta por agua, alcoholes de uno a tres de carbono, y mezclas disolventes acuoso-orgánicas en las cuales son solubles las materias análogas a la vitamina B₁₂ y la sustancia que da iones cianuro.-

5

169.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la reacción se realiza en un medio acuoso.-

179.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la reacción se efectúa en un medio alcohólico.-

10

189.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la reacción se realiza en condiciones anhidras usando un concentrado sólido que contiene materias análogas a la vitamina B₁₂ y ácido cianhídrico anhidro.-

15

199.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la materia análoga a la vitamina B₁₂ es vitamina B_{12a}.-

209.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la materia análoga a la vitamina B₁₂ es vitamina B_{12b}.-

20

219.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la materia análoga a la vitamina B₁₂ es vitamina B_{12c}.-

25

229.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 19, en el cual la materia análoga a la vitamina B₁₂ es vitamina B_{12d}.-

239.- Un procedimiento que comprende hacer reaccio-

nar materia análoga a la vitamina B₁₂ con una cantidad de una sustancia que da iones cianuro virtualmente equivalente, sobre una base molecular, a la cantidad de materia análoga a la vitamina B₁₂ empleada para convertir así dicho materia en esta última vitamina.-

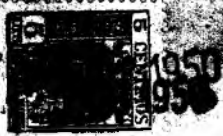
5
249.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 239, en el cual la materia análoga a la vitamina B₁₂ es suministrada como una mezcla que contiene vitamina B₁₂ y materias análogas a la misma, obtenidas por la propagación de un microorganismo que produce vitamina B₁₂ en un medio de cultivo adecuado.-

15
250.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 239, en el cual la reacción con una cantidad virtualmente equivalente de sustancia que da iones cianuro se asegura empleando un exceso de dicha sustancia, y luego el cianuro no reaccionado se separa disponiendo una mezcla de reacción ácida y descargando de ella ácido cianhídrico gaseoso.-

20
251.- Un procedimiento que comprende hacer reaccionar materia análoga a la vitamina B₁₂ con una sustancia que da iones cianuro para convertir así dicho material en vitamina B₁₂ y luego adsorber esta última en un adsorbente sólido.-

25
272.- Un procedimiento para la producción de vitamina B₁₂.-

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



195333

La anterior Memoria consta de cuarenta hojas y la presente escritas a máquina por una sola de sus caras.-

Madrid 1^a NOV. 1950
P. A.

Alberto de Elzaburu

Por Poder
Albela