

MG/

204114

Caso 3450

204114

11 JUN



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

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - domici-
liada en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lincoln Avenue,
por:

" Procedimiento para separar las sustancias activas en
vitamina B₁₂ de las impurezas que las acompañan ".

====:oOo:=====

M e m o r i a D e s c r i p t i v a

Esta invención se refiere al tratamiento de con-
centrados conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ a
fin de separar sus impurezas y conseguir un rendimiento o re-
cuperación prácticamente cuantitativo de las sustancias ac-

204114

11 JUN. 1951



5 tivas bajo la forma de vitamina B₁₂. Mas especialmente se refiere esta invención a procedimientos para el empleo de productos de cambio aniónico en el tratamiento de concentra- dos conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ a fin de efectuar la separación de las impurezas y obtener dichas sustancias activas bajo la forma de vitamina B₁₂.

10 Se han descrito ya varios procedimientos para el tratamiento de concentrados conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ obtenidos a partir de hígado o de los productos de fermentación producidos por el desarrollo de agen- tes productores de la vitamina B₁₂ en medios de cultivo con- venientes. Por ejemplo, se encuentran ya descritos en la li- teratura procedimientos para la obtención de dichos concen- trados a partir de la anahemina (un extracto de hígado que se encuentra en el comercio) así como procedimientos para la obtención de concentrados conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ a partir de los productos de fermentación producidos por el S.aureofaciens y S.griseus. Estos últi- mos procedimientos pueden igualmente aplicarse a la prepa- ración de concentrados de vitamina B₁₂ a partir de los pro- ductos de fermentación obtenidos en el cultivo de Mycobac- terium smegmatis, Pseudomonas lumichroma, Alternaria ale- vacca, Bacillus megatherium, Alkaligenes faecalis, Strepto- mices fradine y otros organismos productores de vitamina B₁₂.

25 Bajo la denominación de sustancias activas en vitamina B₁₂ se sobreentiende la propia vitamina B₁₂, com- puesto reconocido actualmente como un complejo de cobalto conteniendo un grupo CN característico, así como complejos de cobalto íntimamente relacionados con él y a los que po- demos considerar como análogos a la vitamina B₁₂ y que se

30

19 JUN



204114

5 distinguen de ella por contener algún otro grupo característico o anión en lugar del grupo CN. Los concentrados de sustancias activas en vitamina B₁₂ derivados del hígado y de los productos de fermentación contienen generalmente uno o más de los complejos o análogos citados, además de la propia vitamina B₁₂ y es también posible convertir por reacciones químicas la vitamina B₁₂ en los citados complejos y análogos.

10 Los procedimientos hasta ahora utilizables para la obtención de la vitamina B₁₂ a partir de los concentrados conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ son complicados y engorrosos y comprenden generalmente repetidas extracciones con diferentes disolventes, concentración de extractos, distribución en contracorriente entre diferentes disolventes como el agua y el alcohol bencílico y precipitación repetida de sustancia activa de la solución por medio de disolvente, como la acetona, que no disuelven a la vitamina B₁₂, antes de que se consiga un producto suficientemente purificado para obtener la vitamina B₁₂ cristalizada.

15 En estos procedimientos se multiplican los problemas por la presencia de análogos a la vitamina B₁₂ debidos a las características de solubilidad de la vitamina B₁₂ y de sus diversos análogos. Es posible simplificar prácticamente estos procedimientos tratando los concentrados conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ por una sustancia que puede facilitar el ion cianuro a fin de convertir prácticamente todas las sustancias activas a la forma de vitamina B₁₂. Incluso cuando toda la actividad del concentrado se debe a la verdadera vitamina B₁₂ la gran cantidad y la naturaleza compleja de las impurezas hacen que el procedimiento de recuperación resulte engorroso y poco eficaz.

20

25

30

11 JUN. 19



204114

Hemos descubierto que es posible acortar y simplificar en gran manera la obtención de la vitamina B₁₂ a partir de concentrados de sustancias activas en vitamina B₁₂ por nuevos procedimientos que comprenden el tratamiento de las soluciones de dichos concentrados por productos de cambio anionico. Las sustancias activas, es decir: la vitamina B₁₂ y sus análogos que puedan encontrarse presentes en el concentrado no son normalmente adsorbidos en cantidad apreciable por medio de los productos de cambio anionico, aún cuando se ha observado que una porción de las impurezas, entre 5 a 20% del sólido total puede ser adsorbida. Sorprendentemente, hemos descubierto, sin embargo, que en presencia de un manantial de ion cianuro, cuando la solución de sustancia activa se pone en contacto con el producto de cambio anionico, se produce una adsorción abundante y a menudo casi cuantitativa del material activo. Hemos observado además, que la sustancia activa así adsorbida puede recuperarse por lavado o levigación del producto de cambio anionico con un agente de levigación ácido y que las sustancias activas presentes en el levigado se encuentran principalmente en forma de la verdadera vitamina B₁₂.

A pesar de que no se conoce el mecanismo exacto de esta adsorción parece que en presencia de cianuro se forma un complejo, producto de cambio anionico-cianuro-vitamina B₁₂. Parece también que pueden formarse al mismo tiempo complejos análogos. Simultáneamente, sin embargo, el cianuro actúa convirtiendo en vitamina B₁₂ los análogos de la vitamina B₁₂ que pudieran encontrarse presentes resultando de ello que la mayor parte de las sustancias activas son adsorbidas como vitamina B₁₂.

11 JUN. 1951



204114

5 El grado de adsorción depende de diferentes factores incluyendo las características del producto de cambio anionico, la naturaleza de las impurezas presentes en la solución y la forma de introducir el ion cianuro en el sistema. Estos puntos se tratarán luego con mayor detalle, pero por lo que se refiere a la forma de introducción del ion cianuro en el sistema debemos observar que el cianuro puede ser introducido o bien por un tratamiento previo del producto de cambio anionico por un cianuro capaz de ionizarse o por adición de un cianuro capaz de ionizarse a la solución de substancia activa antes de ponerla en contacto con el producto de cambio anionico o por ambos medios a la vez.

15 En la fase de adsorción la mayor parte de impurezas presentes en la solución inicial o de partida se separan con el líquido fluyente, pero algunas impurezas, es decir: las adsorbidas por una resina de cambio anionico pueden ser también adsorbidas en presencia de cianuro y la capacidad de la resina para la adsorción de la vitamina B₁₂ puede ser reducida en la proporción en que dichas impurezas son adsorbidas. Es preferible, por lo tanto, someter la solución de substancias activas, antes de la adición de cianuro, a un tratamiento previo con un producto de cambio anionico a fin de adsorber de la solución las impurezas que pueden estorbar la adsorción de la vitamina B₁₂.

25 El contacto de la solución de las substancias activas en vitamina B₁₂ con el producto de cambio anionico en ausencia de cianuro, tal como se ha dicho, es independientemente ventajoso como medio para separar impurezas y especialmente impurezas coloreadas de la solución de substancias activas en vitamina B₁₂. Se ha observado especialmente, que

30

204114

11 JUN.



las fases finales en la obtención de cristales de vitamina B₁₂ pueden simplificarse tratando una solución de material cristalizado en bruto con un producto de cambio anionico a fin de separar las impurezas perjudiciales y de color.

5 Desde otros aspectos más amplios esta invención se refiere a nuevos procedimientos para la purificación de la vitamina B₁₂ que comprenden el poner en contacto la solución de sustancias activas en vitamina B₁₂ e impurezas con un producto de cambio anionico y separar de la solución residual los adsorbidos resultantes, efectuando así, en ausencia de ion cianuro, una separación parcial de impurezas en el adsorbido y, en presencia de ion cianuro, una separación de las sustancias activas en vitamina B₁₂ en él adsorbido.

15 En la práctica de este nuevo procedimiento de purificación puede partirse de concentrados conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ derivadas de diversos orígenes como el hígado, productos de fermentación, o soluciones madre, aguas de lavado y otros sub-productos de los procesos de obtención de la vitamina B₁₂. Estos procedimientos pueden emplearse ventajosamente con concentrados iniciales de una riqueza relativamente elevada en vitamina B₁₂, como son los concentrados conteniendo de 25 a 50% o más de sólidos totales en forma de sustancias activas en vitamina B₁₂. Sin embargo, se obtienen mayores ventajas comerciales, con este procedimiento, partiendo de concentrados iniciales conteniendo menos de 5% aproximadamente de sustancias activas en vitamina B₁₂ sobre el peso de sólido total. Como ejemplo diremos que se obtienen resultados muy satisfactorios partiendo de concentrados derivados de productos de fermentación en los cuales la cantidad de sustancias activas

20

25

30

204114



17 JUN 1952

5 en vitamina B₁₂ está comprendida entre 0,5 y 1,5 % del peso
sólido total. Pueden también emplearse concentrados de
menor potencia por ejemplo: concentrados conteniendo 0,05
a 0,1 % sobre el sólido total, de sustancias activas en
vitamina B₁₂. Sin embargo si se emplean concentrados de
menor potencia la cantidad relativamente mayor de impurezas
tiende a reducir ligeramente la eficiencia del producto
de cambio anionico tanto en la fase de adsorción de la vi-
tamina B₁₂ en forma de complejo de cianuro y producto de
10 cambio anionico como en la fase preliminar de adsorción en
ausencia de ion cianuro.

Además de la cantidad relativa de impurezas
presentes debemos considerar la naturaleza de las mismas.
Las impurezas de color y las breosas, especialmente, pue-
den disminuir la eficiencia del producto de cambio anioni-
co incluso en concentrados de mayor riqueza. Por consi-
guiente cuando se sabe que los concentrados contienen im-
purezas de color o productoras de breas es ventajoso so-
meterlos a un tratamiento previo para separar dichas im-
15 purezas. Un procedimiento especialmente eficaz para ello
consiste en poner en contacto la solución de sustancias
activas en vitamina B₁₂ con hidroxido de zinc y separar
el hidroxido de zinc junto con una gran cantidad de las
impurezas de color o productoras de breas de la solución
20 residual de sustancias activas en vitamina B₁₂.

Los concentrados de sustancias activas en vi-
tamina B₁₂ se emplean, en este procedimiento, de preferen-
cia en solución acuosa, es decir: en solución en agua o en
agua y disolventes orgánicos. Pueden emplearse solucio-
25 nes en alcohol anhidro, aún cuando los resultados, es-
pecialmente en la primera fase de adsorción, en presencia

30

204114



de cianuro son algo menos eficientes, es decir: una gran cantidad de vitamina B₁₂ escapa a la adsorción y debe ser recuperada del líquido fluyente y de las soluciones de lavado. La proporción de sólidos totales con relación al volumen de solución no es crítica, exceptuando el hecho de que es conveniente en la primera fase de adsorción en presencia de cianuro evitar todo exceso indebido de volumen de la solución. Se ha observado, por ejemplo, que se obtienen buenos resultados cuando las soluciones tratadas con resinas de cambio anionico contienen en un principio aproximadamente 1 a 5% de sólido total. Pueden obtener soluciones de esta concentración en los procesos preliminares de obtención de la vitamina B₁₂ o bien pueden disolverse en agua o extraerse con agua u otro disolvente acuoso concentrados sólidos de actividad conveniente en vitamina B₁₂ para obtener las soluciones de partida empleadas en este procedimiento.

Tanto en la adsorción de substancias activas en vitamina B₁₂ en presencia de ion cianuro como en la adsorción de impurezas en ausencia del mismo se emplea el mismo tipo general de producto de cambio anionico. Los productos de cambio anionico más eficaces en este procedimiento son los organico-nitrogenados cuya capacidad de intercambio deriva esencialmente de grupos amonio cuaternarios y que se emplean generalmente en forma de resinas fuertemente básicas de cambio anionico. Estas resinas pueden como es natural, contener otros grupos de intercambio activos como grupos amina primarios, secundarios y terciarios, grupos guanidina y análogos. Además de la basicidad de la resina, es importante que esta sea de estructura relativamente porosa, debiéndose tener en cuenta en la selección de la re-

11 JUN.



204114

sina para ser usada en el procedimiento, tanto su basicidad como su porosidad.

5 El maximum de adsorción y purificación de la vitamina B₁₂ se obtiene con resinas de intercambio fuertemente básicas y altamente porosas, mientras que se obtienen resultados satisfactorios pero algo menos eficientes con resinas fuertemente básicas y poca porosidad y con resinas menos básicas y altamente porosas. Así pues las resinas apropiadas para este procedimiento son las de basicidad
10 moderada hasta elevada y de porosidad moderada hasta elevada.

Un buen número de resinas de cambio anionico que pueden efectivamente emplearse en este procedimiento pueden adquirirse del comercio. Entre ellas encontramos por ejemplo
15 las resinas de cambio anionico fuertemente básicas y altamente porosa "Amberlite XE 75" y "Amberlite XE 98" (productos de Rohm & Haas Company) la resina fuertemente básica y moderadamente porosa "Amberlite IRA 400" (de Rohm & Haas Company) y la resina moderadamente básica y altamente
20 porosa "Ionac A 293" (producto de la Permutit Company). Con las "Amberlite XE 75" y Amberlite XE 98" se ha obtenido una adsorción y recuperación de 90% y más de vitamina B₁₂, mientras que con la "Amberlite IRA 400" y "Ionac A 293" se ha obtenido una adsorción y recuperación de vitamina B₁₂ de
25 aproximadamente 80%. Otras resinas que han sido empleadas si bien con alguna menor eficacia son la "Amberlite IR 48" y "Amberlite XL 58" (de Rohm & Haas") y la "Permutit S" (de la Permutit company).

Puede emplearse la misma resina o resinas diferentes en la fase de adsorción primaria y en las fases de
30 absorción preliminar y purificación, del proceso. Parece,

17 JUN 1938



204114

5 sin embargo, existir una ventaja manifiesta en emplear la misma resina en ambas fases de adsorción. Esta ventaja se considera debida al hecho de que las impurezas que se separan en la fase preliminar de adsorción son adsorbidas en diferente grado por las diferentes resinas. Como que una función de la fase de adsorción, preliminar consiste en separar las impurezas que puedan dificultar la adsorción de la vitamina B₁₂ en la fase de adsorción primaria se deduce que las impurezas que más fácilmente
10 puedan dificultar dicha adsorción se separan mejor empleando la misma resina en la fase de adsorción preliminar.

15 Antes de emplear la resina elegida en cualquier fase de adsorción, debe convertirse previamente a la forma de sal lavándola con una solución capaz de suministrar el anion deseado. Si bien para el tratamiento previo de la resina pueden emplearse efectivamente aniones de un gran número de ácidos inorgánicos y orgánicos como sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, acético, cítrico y glutámico, los mejores resultados han sido obtenidos por un
20 tratamiento previo con ácido acético o clorhídrico, convirtiendo la resina al estado de acetato o de cloruro. En este sentido debe observarse que parece ser especialmente ventajoso emplear en las fases de adsorción preliminar y primaria una resina en forma de sal del ácido
25 empleado para la levigación. Por ejemplo, si después de la fase de adsorción primaria se desea levigar con ácido acético, la resina en ambas fases de adsorción se empleará inicial y preferiblemente bajo la forma de acetato.

30 Es posible también emplear la resina en forma de hidróxido y utilizar una base como el hidróxido sódico

11 JUN. 1953

204114



5 para el levigado de la vitamina B₁₂ subsiguiente a la fase de adsorción primaria. Este procedimiento es sin embargo menos eficaz tanto para la adsorción como para el levigado de la vitamina B₁₂ que el procedimiento antes descrito empleando la resina en forma de sal y levigando con un ácido.

10 Como ya se ha dicho, la fase de adsorción primaria se efectúa poniendo en contacto la resina con una solución que contiene sustancias activas en vitamina B₁₂, presencia de ion cianuro. Este último puede ser introducido o bien por tratamiento previo de la resina para convertirla total o parcialmente en cianuro o añadiendo a la solución un cianuro capaz de ionizarse o bien combinando
15 ambos procedimientos. Para el tratamiento de concentrados muy ricos en sustancias activas en vitamina B₁₂ pueden obtenerse resultados satisfactorios empleando una resina totalmente convertida al estado de cianuro, sin añadir nueva cantidad de cianuro en la solución. Con concentrados de menor riqueza, sin embargo, es decir con concentrados que contengan gran cantidad de impurezas es general-
20 mente conveniente añadir ion cianuro a la solución.

25 Cuando se añade ion cianuro a la solución de sustancias activas en vitamina B₁₂ y la resina se encuentra total o parcialmente en estado de sal diferente del cianuro, el cianuro primeramente añadido actúa convirtiendo la resina en cianuro y los análogos a la vitamina B₁₂ en vitamina B₁₂ permitiendo así la adsorción de las sustancias activas en forma de complejo resina-CN-vitamina B₁₂.
30 Puede también tener lugar la formación de algún complejo resina-CN-análogo de la vitamina B₁₂. Si la resina se encuentra en forma de sal diferente del cianuro y se intro-

204114



19 JUN 1954

duce el ion cianuro totalmente en la solución de sustancias activas en vitamina B₁₂ puede pasar parte de las sustancias activas antes de que el ion cianuro haya reaccionado suficientemente con la resina para desarrollar su capacidad adsorbente. Se ha observado sin embargo que si la resina se trata previamente con cianuro para convertir por lo menos un 30% de la misma al estado de cianuro se produce una buena adsorción y pasa muy escasa cantidad de las sustancias activas en vitamina B₁₂.

10 Se ha observado también que cuando se ha añadido a la resina la cantidad deseada de solución de sustancias activas en vitamina B₁₂ es ventajoso suspender la adición de solución dejando en contacto y en reposo la resina y la solución durante un período de 2-3 horas durante las cuales
15 tiene lugar una mayor adsorción por la resina de sustancias activas en vitamina B₁₂. La resina se lava luego con agua antes de proceder al levigado ácido y se ha observado que con el período de reposo la cantidad de sustancias activas separadas con los líquidos fluyentes es muy pequeña llegando
20 únicamente a 2-10% aproximadamente en lugar de 5-20% al prescindir del período de reposo. Los líquidos fluyentes que contienen sustancias activas se recogen para ser sometidos a nuevo tratamiento.

25 En la fase de adsorción preliminar, una solución conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ e impurezas se pone en contacto con la resina previamente tratada por ácido, preferiblemente haciendo pasar la solución a través de una columna de resina, dependiendo la cantidad de solución de la capacidad de adsorción, de la resina para las impurezas
30 contenidas en la solución, que se determina experimentalmente. La solución que vá fluyendo se separa hasta que

11 JUN. 1957



204114

la primera aparición de color indica la presencia en ella de sustancias activas en vitamina B₁₂. En este momento se recoge el líquido continuando la adición de solución o de agua de lavado, o de ambas a la vez, hasta que la solución fluyente cambia su color del rojo al rosa pálido o amarillo. El volumen total de líquido recogido en esta forma puede ser de 4 a 5 veces el volumen de la solución inicial suministrada, pero contiene 95% o más de sustancias activas en vitamina B₁₂. El lavado se continua hasta que la solución fluyente queda de nuevo prácticamente incolora y este líquido recogido aparte pasa a una fase inicial del proceso para ser tratado de nuevo.

La regeneración de la columna puede efectuarse fácilmente lavándola primeramente con ácido tal como se ha descrito y luego con agua para separar el exceso de ácido. A este respecto debe hacerse notar que las porciones iniciales del ácido de lavado pueden contener también trazas de vitamina B₁₂ en cuyo caso se recogerán estas porciones para someterlas a un nuevo tratamiento.

El líquido fluyente rico obtenido en la forma antes descrita puede ser usado como solución de alimentación en la fase de adsorción primaria o bien la sustancia activa puede ser separada del mismo como concentrado sólido parcialmente purificado y este concentrado puede ser empleado a su vez para preparar la solución de alimentación para la fase de adsorción primaria.

La resina se prepara para la adsorción de la vitamina B₁₂ haciendo pasar una solución que contiene preferiblemente de 3 a 6 gramos aproximadamente de cianuro potásico o sódico por 100 gramos de resina a través de la resina lavada con ácido a fin de convertir parcialmente la resina a

11 JUN. 1953



204114

la forma de cianuro. Al líquido fluyente rico procedente de la fase de adsorción preliminar o a una solución preparada con dicho fluyente rico se añade una cantidad de cianuro soluble como el sódico o potásico en cantidad que oscila entre 0,1 a 3,0 gramos por gramo de sustancias activas en vitamina B₁₂ contenidas en la solución de alimentación, es decir de 2 a 6 mols. de cianuro por mol. de sustancias activas en vitamina B₁₂ (calculado sobre un peso molecular medio de 1400). Después de la adición de cianuro se deja en reposo la solución de alimentación durante 10 a 15 minutos pasándola luego a través de la columna de resina, siguiéndola de agua. La cantidad de solución de alimentación que puede añadirse a la resina sin que pase sustancia activa varia en determinadas proporciones dependiendo de la potencia relativa o grado de pureza de la solución de alimentación y de la capacidad de adsorción de la resina. En general, sin embargo, con las resinas preferidas fuertemente básicas y altamente porosas es posible añadir una cantidad de solución de alimentación equivalente aproximadamente a 1 gramo de sustancia activa en vitamina B₁₂ por 100 gramos de resina (peso seco) empleada, antes de que se produzca un paso apreciable de la sustancia activa.

Durante el pasaje de la solución de alimentación y agua a través de la resina, la solución fluyente que contiene la masa principal de impurezas incluyendo algunas impurezas de color puede ser separada a menos de que la aparición de un color anaranjado rojizo o púrpura indique que el fluyente contiene una pequeña cantidad de vitamina B₁₂ que no ha sido adsorbida, en cuyo caso estas porciones de fluyente pueden ser recogidas para someterlas a un nuevo tratamiento. Una vez ha sido añadida a la resina la cantidad

17 JUN



deseada de solución de alimentación, se dejan ambas en contacto, preferiblemente durante 2-3 horas tal como se ha dicho para permitir que se establezca el equilibrio en el sistema. A continuación se lava la resina con agua destilada para separar la solución residual e impurezas que la acompañan continuándose el lavado hasta que el líquido fluyente es prácticamente incolora y que el contenido en sólido total en el mismo es menor de 0,05 mg/cc. Durante el lavado debe recogerse para un nuevo tratamiento cualquier porción de líquido que presente un color anaranjado rojizo o purpura indicador de la presencia de vitamina B₁₂. En este momento las sustancias activas en vitamina B₁₂ libres de sus impurezas quedan fijadas a la resina aparentemente bajo la forma de complejos vitamina-CN-resina.

Para recuperar la vitamina B₁₂ adsorbida por la resina se emplea preferiblemente para la levigación una solución de un ácido ya que el ácido descompone aparentemente el citado complejo vitamina-cianuro-resina. Pueden emplearse también para ello soluciones salinas pero estas son menos eficaces que las soluciones ácidas. Como agentes para la levigación se han empleado un gran número de ácidos incluyendo el sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, y acético, todos los cuales separan por lo menos 90%, y en la mayor parte de casos el 100%, de vitamina B₁₂. Otros ácidos como el glutámico y el cítrico, otras sales como los fosfatos monobásicos de sodio y potasio, los cloruros sódico y potásico y los sulfatos sódico y potásico así como otras bases como el hidrato sódico aún cuando son razonablemente eficaces separan en general menos del 90% de la vitamina B₁₂ adsorbidas. La levigación con una base parece separar la vitamina B₁₂ en forma de cianuro complejo que debe ser sometido a un tratamiento por ácido para dejar la vitamina B₁₂ en

204114

19 JUN



libertad.

La concentración del ácido empleado para la levigación depende como es natural de las características del ácido. Con ácidos fuertes y muy ionizados como el clorhídrico, sulfúrico y fosfórico pueden emplearse concentraciones de aproximadamente N/1 debiéndose evitar concentraciones mayores a fin de evitar toda posible alteración de la vitamina B₁₂ durante la levigación. Con ácidos debilmente ionizados pueden emplearse, sin embargo, concentraciones mucho mayores y como ejemplo diremos que el ácido acético puede ser empleado en cualquier concentración incluso en forma de ácido acético glacial, sin que perjudique a la vitamina B₁₂.

Resulta práctico emplear para la levigación una solución del mismo ácido empleado en el tratamiento previo de la resina de modo que la fase de levigación ejerza al mismo tiempo la función de regeneración de la resina para ser usada de nuevo en el siguiente ciclo de adsorción. En este sentido se consideran preferibles como agentes de levigación las soluciones acuosas a 5% de ácido acético o de ácido clorhídrico.

Durante la levigación se desprende ácido cianhídrico y debe procurarse exista la conveniente ventilación. La solución fluyente se separa hasta que aparezca una solución de color rojo purpura. En este momento se recoge la solución rica fluyente hasta que cambia su color al anaranjado ligero o amarillo en cuyo momento se empieza a separar la solución hasta que sale completamente incolora. Esta última solución que puede contener de 2-3% de vitamina B₁₂ puede ser usada de nuevo sometiéndola a un nuevo tratamiento para recuperar la vitamina.

11



5 La solución fluyente rica en vitamina B₁₂ puede ser tratada por los procedimientos ya conocidos para recuperar la vitamina B₁₂ en ella contenida. Por ejemplo añadiendo aproximadamente 10 volúmenes de acetona y dejando la mezcla en reposo, cristaliza la masa de vitamina B₁₂ directamente de la mezcla y los cristales así obtenidos presentan a menudo una pureza de 90% o más. Es también posible extraer la solución rica, dos o tres veces con cloroforma: cresol 1:1 empleando cada vez aproximadamente 0,1 volumen de la solución rica. Después de añadir aproximadamente dos volúmenes de éter y dos volúmenes de acetona al extracto resultante se precipita vitamina B₁₂ con una pureza de aproximadamente 80-90%. Pueden obtenerse productos de mayor pureza recristalizando en agua el producto a 80-90%.

15 La posibilidad de recuperar directamente de la solución rica un producto con una pureza de 80-90% depende hasta cierto punto de la velocidad de levigación y de la forma de separar las porciones ricas de la solución fluyente. La solución fluyente conteniendo la máxima riqueza en vitamina B₁₂ puede tratarse frecuentemente para obtener un producto de 80-90% de pureza. Por otra parte, sin embargo, si se separan grandes "porciones ricas" de la solución fluyente que permitan una recuperación más aproximadamente cuantitativa de vitamina B₁₂ la pureza del producto directamente recuperado será algo menor.

20 Otro factor que influye en la posibilidad de recuperar directamente de la solución fluyente un producto de elevada pureza es el grado y naturaleza de la purificación efectuada antes de la fase de adsorción primaria. En este sentido, sin embargo, debe observarse que el pro-



cedimiento antes descrito que comprende la adsorción de la vitamina B₁₂ en forma de complejo vitamina B₁₂-CN-resina constituye un procedimiento manifiestamente ventajoso en la práctica, incluso cuando el producto directamente recuperado de la solución fluyente resultante presenta una pureza tan baja como 20-30%.

Mientras que la obtención de vitamina B₁₂ con una pureza de 80-90%, incluso a partir de la solución obtenida en la fase de adsorción primaria con una riqueza de únicamente 20-30% puede llevarse a cabo generalmente separando de dicha solución el ácido cianhídrico y sometiendo la vitamina B₁₂ a repetidas precipitaciones y cristalizaciones de acuerdo con procedimientos ya conocidos para obtener productos de pureza creciente, la purificación de la vitamina B₁₂ a 80-90% para obtener un producto con una pureza de 99% es a menudo mucho más difícil de practicar por cristalización únicamente. Se ha observado, sin embargo, que sometiendo la solución preparada a partir de un producto conteniendo 40-50% o más de vitamina B₁₂ sobre el sólido total, a un tratamiento suplementario con una resina de cambio aniónico en ausencia de ion cianuro, se obtienen por los procedimientos ya conocidos para la cristalización de la vitamina B₁₂ productos cuya riqueza alcanza e incluso excede del 99%. Ello es debido aparentemente a la separación por la resina de las impurezas que impiden obtener por cristalización vitamina B₁₂ de una pureza tal.

Debe hacerse notar también, en este sentido, que el procedimiento antes citado, como tratamiento suplementario de las soluciones de vitamina B₁₂ con resinas de cambio aniónico es de una aplicación general aparte de



ser aplicable para la adsorción descrita de la vitamina B₁₂. Así pues otras soluciones de vitamina B₁₂, cuyo sólido total contiene 40-50% o más de sustancias activas en vitamina B₁₂ tanto si han sido obtenidas por los procedimientos descritos como por otros métodos, pueden ponerse en contacto con una resina de cambio aniónico en ausencia de cianuro efectuando así su purificación por adsorción de las impurezas asociadas a las sustancias activas en vitamina B₁₂

Los ejemplos siguientes muestran la forma en que puede llevarse a la práctica el procedimiento objeto de esta patente pero se comprenderá que estos ejemplos se exponen únicamente como ilustración y sin sentido alguno de limitación.

EJEMPLO 1.-

Separación de impurezas por la resina.

Se prepara una columna de resina en la forma siguiente: 10 litros de resina "Amberlite XE-75" se colocan en un tubo o columna de vidrio de 10 centímetros de diámetro interno y 245 centímetros de altura. Se hacen pasar hacia abajo a través de la resina unos 36 litros de una solución acuosa de hidróxido sódico a 3% a la velocidad de unos 500 cc. por minuto. Se hace pasar luego agua a través de la resina para separar el exceso de hidróxido sódico y a continuación se pasan a través de la resina unos 25 litros de ácido acético acuoso a 25% a la velocidad de unos 300 cc. por minuto, seguidos de un lavado con agua destilada para eliminar el ácido acético, dejando en la columna agua destilada en cantidad suficiente para cubrir la resina. En este momento la resina contenida en la columna se encuentra en forma de acetato.

Se toman 500 gramos de un concentrado sólido

204114

11 JUN



5 obtenido por concentración y purificación de un caldo de fermentación producido haciendo fermentar un medio nutritivo conveniente con S. griseus y conteniendo aproximadamente 150 gramos de harina fósil como auxiliar de la filtración y una cantidad máxima de sustancias activas en vitamina B₁₂ de unos 20 gramos, determinada midiendo la intensidad de absorción de la luz de una muestra en solución acuosa bajo una longitud de onda luminosa de 5500Å, se extraen con agua hasta obtener un extracto incoloro y se filtran los extractos. Son necesarios para ello unos 10 4 litros de agua. Los extractos mezclados se hacen pasar hacia abajo a través de la columna de resina, de 16 litros, a la velocidad de unos 100 cc. por minuto haciendo pasar luego agua a igual velocidad. Se separa la solución fluyente hasta la primera aparición de una solución de color. 15 Se recoge luego el líquido como porción rica hasta que se obtiene un cambio de color del rojo al rosa claro o amarillo en cuyo momento se empieza la recolección por separado del líquido fluyente la que se continua hasta que el mismo es prácticamente incoloro. El líquido recogido por separado, unos 20 litros en volumen, contiene una pequeña fracción de sustancias activas en vitamina B₁₂ y se hace pasar a una fase anterior del proceso para su recuperación. 20

25 Del primer líquido fluyente recogido (porción rica), unos 20 litros en volumen, y conteniendo aproximadamente 90-95% de sustancias activas en vitamina B₁₂ se separa el material activo por extracción por dos o tres veces con cresol-tetracloruro de carbono 1:1 empleando cada vez 0,1 volumen aproximadamente de disolvente. La capa acuosa agotada es prácticamente incolora. A los extractos mez- 30

204114



clados se añaden agitando unos 100 gramos de harina fósil para mejorar la filtración, unos 2 volúmenes de acetona y unos 2 volúmenes de éter etílico. La mezcla resultante de precipitado y auxiliar de la filtración se filtra por un filtro revestido previamente con unos 50 gramos de auxiliar de la filtración. El residuo sólido se lava con unos 4 litros de acetona y a continuación con 1 litro aproximadamente de éter etílico y se seca al aire a la temperatura ambiente. El sólido seco, unos 400 gramos se extrae con agua hasta obtener un extracto incoloro y se filtran los extractos. Son necesarios unos 2 litros de agua. Separación de la vitamina B₁₂ por la resina.

Se prepara una segunda columna de resina tal como se ha dicho para la "separación de las impurezas por la resina". Se disuelven unos 120 gramos de cianuro potásico en aproximadamente 1 litro de agua y se hace pasar esta solución a través de 10 litros de resina a la velocidad de unos 5-10 cc. por minuto. En este momento la resina de la columna se encuentra parcialmente en forma de acetato y parcialmente en forma de cianuro (aproximadamente 63% de acetato y 37% de cianuro).

A los extractos acuosos mezclados del precipitado obtenido del líquido pasado por la primera columna de resina se añaden unos 60 gramos de cianuro potásico y se agita la solución durante unos 15 minutos. Esta solución se añade luego a la parte superior de la columna de acetato y cianuro de resina a la velocidad de unos 5-10 cc. por minuto pasando luego unos 2 litros de agua destilada a igual velocidad aproximadamente. Se lava luego la columna con agua destilada a una velocidad de unos 100 cc. por minuto hasta que el líquido pasa prácticamente inco-



5 loro y que la cantidad de sólido total contenido en el mismo es menor de unos 0,05 mg. por cc. Poco después de aparecer en el líquido fluyente la primera parte del precedente extracto tratado con cianuro aparece una frac-

10 ción de color anaranjado rojizo o purpura anaranjado que contiene una pequeña cantidad de substancias activas en vitamina B₁₂. Esta fracción se recoge por separado para ser sometida a un nuevo tratamiento. (Si se sigue el mismo procedimiento pero dejando un período de reposo de 2-3

15 horas entre la adición de los extractos tratados con cianuro a la columna y el lavado de la misma con agua, se elimina prácticamente el paso inicial de pequeñas cantidades de substancias activas en vitamina B₁₂. Este reposo de 2-3 horas parece permitir una adsorción mayor, casi cuantitativa, de las substancias activas en vitamina B₁₂ por la resina).

20 Se hace pasar luego a través de la resina lavada con agua ácido acético acuoso aproximadamente a 5%, preferiblemente enfriado a unos 5° C. (durante la levigación se desarrolla calor) y a una velocidad de unos 75 cc. por minuto, para levigar la vitamina B₁₂. El líquido fluyente se separa hasta que aparece un color rojo purpura. Esta solución se recoge entonces como porción rica hasta que su color cambia al anaranjado claro o amarillo, en cuyo momento se empieza la recolección por separado hasta que el líquido fluyente es prácticamente incoloro. El líquido últimamente recogido por separado, unos 8 litros, contiene solo una pequeña fracción de vitamina B₁₂ y es devuelto a una fase inicial del proceso para ser tratado de nuevo.

30 De la porción rica, unos 8 litros en volumen, se separa la vitamina B₁₂ por extracción por tres veces

204114



5 con cresol-tetracloruro de carbono 1:1, primeramente con 0,1 volúmenes de disolvente y luego con 0,05 volúmenes de disolvente, cada vez hasta que la capa acuosa agotada es prácticamente incolora. A los extractos mezclados se añaden agitando, 2 volúmenes de acetona y 2 volúmenes de éter etílico. Se forma un precipitado que se separa por filtración por un filtro recubierto de auxiliar para la filtración, se lava con acetona y se seca al vacío a la temperatura ambiente.

10 Obtención de la vitamina B₁₂ pura.

15 El sólido seco se extrae con agua hasta que se obtiene un extracto incoloro, se filtran los extractos y se diluyen a una concentración de aproximadamente 5-10 miligramos de vitamina B₁₂ por centímetro cúbico que se determina por absorción de la luz a 5500Å. La cristalización de la vitamina B₁₂ se efectúa añadiendo lentamente y con una ligera agitación 7-10 volúmenes de acetona. Un rendimiento óptimo de vitamina B₁₂ se obtiene dejando la mezcla en reposo durante 16-24 horas, después de lo cual se separan los cristales por filtración, se lavan con acetona y se secan. Los cristales así obtenidos están constituidos por vitamina B₁₂ con una pureza de 85-90%. Este producto se purifica por recristalización en agua para obtener una vitamina B₁₂ con una pureza superior a 95%.

25 La repetición del anterior procedimiento con diferentes concentrados iniciales ha conducido algunas veces a la obtención como producto inicial de una vitamina B₁₂ con una pureza algo inferior a 85%. Estos productos de menor pureza se purifican ventajosamente pasando una solución acuosa de los mismos a través de una capa de resina tal como se ha dicho en "separación de las impurezas

30

204114

1100



por la resina". Después de este nuevo tratamiento por resina la adición de acetona al fluyente rico produce a menudo una precipitación directa de vitamina B₁₂ con una pureza de 99% o más.

5

EJEMPLO 2.-

Separación de las impurezas por la resina.

10

Se prepara una columna de resina en la forma siguiente: 230 cc. de resina "Amberlite XE-75 se colocan en un tubo o columna de vidrio de 2,5 centímetros de diámetro interno y 60 centímetros de altura. Se hacen pasar hacia abajo a través de la resina unos 700 cc. de solución acuosa al 3% de hidrato sódico a la velocidad de unos 5 cc. por minuto, haciendo pasar a continuación una solución acuosa de cloruro sódico a igual velocidad hasta que el líquido fluyente presenta reacción neutra. Se lava luego la resina con agua destilada a igual velocidad hasta que el líquido que pasa está exento de ion cloro y se deja en la columna agua suficiente para que la resina quede cubierta. En este momento la resina se encuentra al estado de cloruro.

15

20

25

30

41 gramos de concentrado de vitamina B₁₂ conteniendo un máximo de unos 3,5% de sustancias activas en vitamina B₁₂ se disuelven en unos 115 cc. de agua y se separan por filtración los sólidos no disueltos. El filtrado se hace pasar a través de la resina a una velocidad de unos 4 cc. por minuto pasando luego agua a igual velocidad. El líquido fluyente se separa hasta que empieza a salir una solución de color. Se recoge entonces esta porción rica mientras sale de color. Se obtienen unos 475 de solución rica.

Separación de la vitamina B₁₂ por la resina.



5

La resina empleada para la separación de las impurezas se regenera en la misma forma que se ha dicho en el ejemplo anterior. Unos 3 gramos de cianuro sódico se disuelven en 30 cc. de agua y se hace pasar esta solución a través de la resina a la velocidad de unos 4 cc. por minuto. En este momento la resina se encuentra parte en forma de cloruro y parte en forma de cianuro.

10

A la porción rica procedente del primer tratamiento por resina se añaden unos 3 gr. de cianuro sódico y se agita la solución durante unos 10 minutos. Se añade luego esta solución a la parte superior de la columna a la velocidad de unos 4 cc. por minuto haciendo pasar a continuación unos 450 cc. de agua destilada a igual velocidad. Se lava la resina con agua destilada a la velocidad de unos 12-15 cc. por minuto hasta que el líquido sale prácticamente incoloro y que la cantidad de sólido total contenida en el mismo es menor de 0,05 mg. por cc.

15

20

Se hace pasar luego a través de la resina una solución a 5% de ácido acético a la velocidad de aproximadamente 1 cc. por minuto, separando el líquido fluyente hasta que aparece una solución de color rojo purpura. El líquido fluyente se recoge entonces en porciones de 50 cc. como solución rica hasta que el líquido que sale es prácticamente incoloro. Se recogen unas cinco porciones de éstas. Las primeras dos fracciones contienen la masa principal de vitamina B₁₂ y se diluyen con unos 10 volúmenes de acetona dejándolas luego en reposo para que tenga lugar la cristalización. Los cristales (unos 1.383 gramos en estado húmedo) obtenidos están constituidos por vitamina B₁₂ con 90% de pureza (en base anhidra). Las frac-

25

30

17 JUN

204114



ciones restantes de menor pureza se someten a un nuevo tratamiento.

5 La distribución de las sustancias activas en vitamina B₁₂ en las diferentes fases del proceso se indica en la tabla siguiente. Los valores en gramos de color total constituyen una medida de la concentración en sustancias activas en vitamina B₁₂ basados en cálculos derivados de la medición de la densidad óptica de soluciones a 5500Å comparados con el valor para la vitamina B₁₂ pura es decir: $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 64$.

	Componente	Gramos de color total
	<u>Columna I</u>	
	Suministrados	1.350
15	Porción rica pasada (para alimentar la columna II)	1.310
	Porción de cola	0,023
	Lavado con ácido acético 5%	0,062
	<u>Columna II</u>	
	Suministrados	1,310
20	Porción pasada	0,126
	Levigado rico 1	0,630 (0,750 gr. cristales)
	" 2	0,425 (0,633 gr. cristales)
	" 3	0,136
	" 4	0,029
25	" 5	0,008

30 Debe observarse que los valores indicados en la tabla precedente, en gramos de color total están fundados en mediciones de densidad óptica que en su verdadera naturaleza son aproximadas. Con relación a los datos referentes a la columna II el hecho de que el color total en las fracciones de levigado exceda al color total

11 JUN



204114

5 en el alimentado es debido a la presencia de análogos de la vitamina B₁₂, como la vitamina B_{12a} en el suministrado. Las mediciones de densidad óptica se han efectuado a 5500Å a la que la vitamina B₁₂ presenta su absorción máxima. Sin embargo, a esta longitud de onda la absorción de los análogos a la vitamina B₁₂ no es tan elevada y por consiguiente los cálculos efectuados empleando el valor $E_{1\%}^{1\text{cc}} = 64$ que es característico de la vitamina B₁₂ dan solo un valor aproximado de sustancias activas en vitamina B₁₂ algo inferior a la cantidad de sustancias activas en vitamina B₁₂ contenidas en el suministrado. Con esta explicación resultará evidente que los datos referentes a la columna II indican que se ha efectuado prácticamente una conversión de análogos de la vitamina B₁₂ como la vitamina B_{12a} en vitamina B₁₂ en la fase de adsorción primaria (columna II).

EJEMPLO 3.-

20 Una solución acuosa de vitamina B₁₂ conteniendo unos 10 mgr. de vitamina B₁₂ y compuestos análogos a la vitamina B₁₂ y 90 mgr. de impurezas no identificadas por cc. se trata con 60 mgr. de cianuro potásico por cc. y porciones de 5 cc. de la solución resultante conteniendo cada una de ellas 51,5 mgr. de color de vitamina B₁₂ (medido a 5500Å), se pasan a través de columnas de resina "Amberlite XE-98" conteniendo 25 cc. de resina bajo la forma de hidróxido, acetato y cianuro-acetato respectivamente. Se lavan las columnas con agua y se levigan con ácido acético en solución acuosa a 5%. Este proceso corresponde al descrito en "separación de la vitamina B₁₂ por la resina" del ejemplo 2. Se ha comprobado que en cada caso tiene lugar la adsorción de la vitamina B₁₂, que

1 JUN. 1954



la levigación se efectúa fácilmente y que se consigue una notable purificación. Los datos comparativos indican que tanto la adsorción por unidad de resina como la purificación varían según la forma en que se halla la resina

5

	mgr. de vitamina B ₁₂ (color)		
forma de la resina.	en el levigado	en el levigado mas pasado primero.	adsorción % (x)
Cianuro-acetato	41	56	80-90%
acetato	37	54	60-80%
hidróxido	24	48	menos de 50%.

10

(x) Suponiendo una levigación de 100% de la vitamina B₁₂ adsorbida.

EJEMPLO 4.-

15

A través de una columna de resina "Amberlite XE-98" conteniendo 25 cc. de resina en forma de cianuro se pasan aproximadamente 5 cc. de una solución acuosa conteniendo unos 10 mgr. de sustancias activas en vitamina B₁₂ y 90 mgr. de impurezas no identificadas. Se lava la columna con agua y se leviga con solución a 5% de ácido acético. Este procedimiento corresponde al descrito en "Separación de la vitamina B₁₂ por la resina" del ejemplo 2. Se ha observado que tiene lugar la adsorción de la vitamina B₁₂, que la levigación se efectúa fácilmente y que se obtiene una notable purificación. En la levigación, el levigado (porción ríca) contiene 39 mgr. de vitamina B₁₂ mientras que el levigado más el primeramente pasado, contienen 51 mgr. lo que indica que la adsorción es de 70-80% (suponiendo una levigación de 100%).

20

25

30

EJEMPLO 5.-

Una solución de concentrado de vitamina B₁₂ en



metanol tratada con cianuro potásico se hace pasar a través de una columna de resina "Amberlite XE-98" bajo la forma de cianuro-acetato y llena de metanol. La columna se lava sucesivamente con metanol, agua, y metanol. Se leviga luego la columna con solución a 5% de ácido acético en metanol. El procedimiento corresponde por otra parte al descrito en "Separación de la vitamina B₁₂ por la resina" del ejemplo 2. Se ha observado que tiene lugar la adsorción de la vitamina B₁₂, que la levigación se efectúa fácilmente y que se consigue la purificación. La adsorción, en este caso, a base de la proporción de vitamina B₁₂ en el levigado (porción rica) y vitamina B₁₂ en el levigado junto con el líquido primeramente pasado, es decir: 23 mgr/37 mgr, es de 60-80% aproximadamente.

Una solución acuosa de concentrado de vitamina B₁₂ tratada con cianuro potásico se hace pasar a través de una columna de resina "Amberlite XE-98" bajo la forma de cianuro-acetato y llena de agua. La columna se lava sucesivamente con agua y metanol. Se leviga luego la columna con solución a 5% de ácido acético en metanol. El procedimiento corresponde por otra parte al descrito en "Separación de la vitamina B₁₂ por la resina" en el ejemplo 2. Se ha observado que tiene lugar la adsorción de la vitamina B₁₂ que la levigación se efectúa fácilmente y que se consigue la purificación. La adsorción, en este caso, es de más de 90% es decir: 47,7 mgr. de vitamina B₁₂ en el levigado (porción rica) por 49,7 mgr. en el levigado junto con el líquido primeramente pasado indicando que es preferible emplear una solución acuosa que una solución en alcohol metílico o metanol.

EJEMPLO 6.-

Una solución acuosa de concentrado de vitamina B₁₂ tratada con cianuro potásico se divide en tres partes



iguales y estas se regulan a pH 4, 7 y 9 respectivamente y se trata cada una de ellas en la forma descrita en "Separación de la vitamina B₁₂ por la resina" en el ejemplo 2. Se observa que se obtienen prácticamente los mismos resultados de adsorción, levigación y purificación con los diferentes valores pH.

EJEMPLO 7.-

Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 2 con la diferencia de que se emplea la resina de cambio anionico "Amberlite INA-400". Se observa que las impurezas son separadas por el tratamiento por la resina en ausencia de cianuro y que en presencia de este, tiene lugar la adsorción de la vitamina B₁₂, la levigación subsiguiente se efectúa fácilmente y se consigue la purificación. La adsorción en este caso es de 60-80% es decir: ligeramente menor que la obtenida con "Amberlite XE-75" o XE-98.

EJEMPLO 8.-

Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 2 en tres operaciones separadas empleando "Amberlite XE-58", "Amberlite IR-4b" y "Permutit S" en substitución de la "Amberlite XE-75". Se observa que las impurezas son separadas por tratamiento con la resina en ausencia de cianuro y que en presencia de cianuro tiene lugar la adsorción de la vitamina B₁₂, la levigación subsiguiente se efectúa fácilmente y se consigue la purificación. La adsorción con estas resinas, resulta sin embargo, relativamente baja es decir se adsorben y recuperan en el levigado (porción rica) menos del 50% de sustancias activas.

EJEMPLO 9.-

Se repite el procedimiento descrito en el ejem-



5 plo 2 empleando la resina de cambio anionico "Ionac A-295". Se observa que por el tratamiento con la resina se separan las impurezas en ausencia de cianuro y que en presencia de este último tiene lugar la adsorción de la vitamina B₁₂, se efectúa fácilmente la levigación subsiguiente y se consigue la purificación. La adsorción con esta resina resulta relativamente elevada es decir se adsorben y recuperan en el levigado (porción rica) aproximadamente 70-90% de las sustancias activas.

10 EJEMPLO 10.-

Se repite el procedimiento descrito en "Separación de la vitamina B₁₂ por la resina" con la diferencia de que se levigan y adsorben separadamente partes alicuotas de la resina con una solución de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido glutámico, ácido cítrico, fosfato potásico monobásico, e hidróxido sódico. Con las tres primeras soluciones se obtiene una buena levigación (90% o más), una levigación menor (60-90%) se consigue con las tres soluciones siguientes y con la solución de hidróxido sódico se consigue una levigación más bien pobre (menos de 50%).

25 Se repite el anterior procedimiento levigando y lavando el adsorbido de la resina alternativamente con solución acuosa de cloruro sódico, agua, solución de cloruro sódico, agua, fosfato sódico monobásico, agua, sulfato sódico y agua, en cada caso hasta que el líquido fluente sale prácticamente incoloro. En todas las fracciones se encuentra vitamina B₁₂, en proporciones variables y se leviga prácticamente toda la vitamina B₁₂.

30 EJEMPLO 11.-

Por el mismo procedimiento se obtienen varios



concentrados acuosos conteniendo sustancias activas en vitamina B₁₂ y se purifican pasándolos a través de una columna conteniendo 45 litros de resina "Amberlite XE-98" en forma de acetato. Los concentrados presentan un volumen de 18 - 27 litros. Su paso a través de las columnas y la recolección de fracciones se efectúa de una manera general por los procedimientos descritos en "Separación de impurezas por la resina" de los ejemplos 1 y 2. En cada caso las mediciones de color muestran que tiene lugar una práctica eliminación de las impurezas de color. Los demás resultados se indican en la tabla siguiente:

Ensayo Nº	Substancias activas en		Solido total, gramos	
	en vitamina B ₁₂			
	gramos	+		
	Suministra- do a la co- lumna	Fluyente rico	Suministrado a la columna	Fluyente rico
1.	87,3	76,7	8140	5200
2.	64,	64,	5100	4270
3.	77,6	72,	6730	5200
4.	64,3	59,5	4470	3120
5.	38,2	35,9	6500	5550
6.	48,4	48,8	8050	5950

+ Determinado empleando vitamina B₁₂ radioactiva como tipo.

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

Se reivindica como objeto de esta patente:

1.- Procedimiento para separar las sustancias activas en vitamina B₁₂ de las impurezas que las acompañan, que consiste en tratar una solución conteniendo dichas sustancias activas e impurezas con un producto de cambio anio-



nico en presencia de iones cianuro.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el producto de cambio anionico es una resina de cambio anionico.

5

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el producto de cambio anionico es una resina de cambio anionico ligera o fuertemente básica y ligera o fuertemente porosa.

10

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el producto de cambio anionico es una resina de cambio anionico fuertemente porosa y fuertemente básica, cuya capacidad de intercambio deriva esencialmente de grupos amonio cuaternarios.

15

5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el producto de cambio anionico se emplea bajo la forma de sal.

20

6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la resina empleada para la adsorción de la vitamina B₁₂ se encuentra por lo menos parcialmente bajo la forma de cianuro antes de ponerse en contacto con dicha solución.

25

7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual los iones cianuro son suministrados por lo menos en parte por adición de un origen de iones cianuro a la solución de partida.

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual el producto de la adsorción se lava con un agente de levigación para recuperar la vitamina B₁₂ purificada.

30

9.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el cual como agente de levigación se emplea una solución



ácida.

5 10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la solución de sustancias vitamínicas e impurezas es sometida a un tratamiento previo con un producto de cambio aniónico para separar una parte de dichas impurezas.

11.- Procedimiento según la reivindicación 10, en el cual el producto de cambio aniónico empleado es una resina de cambio aniónico.

10 12.- Procedimiento según las reivindicaciones 10 u 11 en el cual el producto de cambio aniónico es una resina de cambio aniónico fuertemente básica, en forma de sal, cuya capacidad de intercambio deriva esencialmente de grupos amonio cuaternarios.

15 13.- En un procedimiento para la recuperación y purificación de vitamina B₁₂ a partir de concentrados que contienen sustancias activas en vitamina B₁₂ e impurezas, las fases que consisten en poner en contacto una solución de dichos concentrados con una resina de cambio aniónico en forma de sal y en ausencia de ion cianuro, para separar
20 una parte de dichas impurezas en forma de adsorbido por la resina, de las sustancias activas en vitamina B₁₂ y otras impurezas de la solución; poner luego en contacto dicha solución con una resina de cambio aniónico en forma de sal y
25 en presencia de ion cianuro, para adsorber las sustancias activas en vitamina B₁₂ en forma de un complejo vitamina B₁₂-cianuro-resina y recuperar la vitamina B₁₂ del adsorbido por lavado de la resina con un agente de levigación.

30 14.- Procedimiento para separar las sustancias activas en vitamina B₁₂ de las impurezas que las acompañan.

- 35 - 204114 11 JU

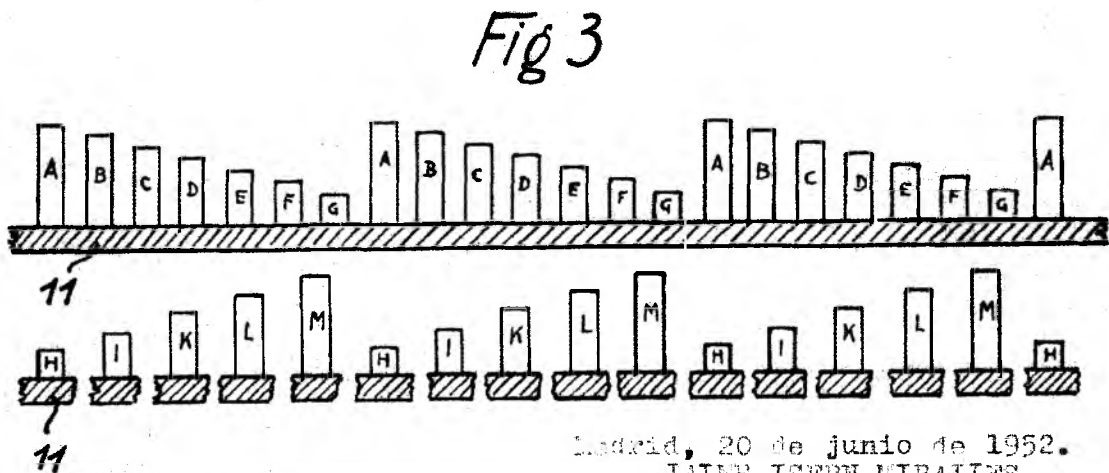
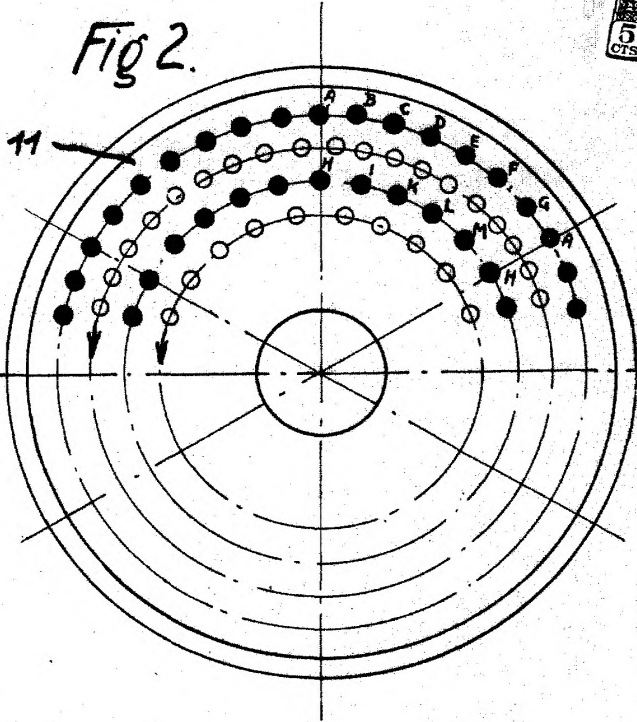
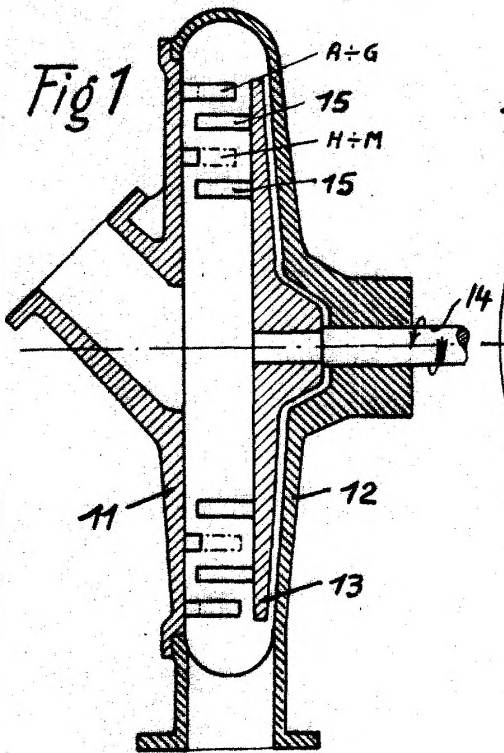


Esta memoria consta de treinta y cinco páginas,
escritas por una sola cara.

BARCELONA, 11 JUN 1952

P.Á.

JOSÉ M. BOLIBAR
P.



Madrid, 20 de junio de 1952.
JAIMÉ ISERN MIRALLES,
 P. B.

