

np/

252329
Depo 6847



P A T E N T E D E I N V E N C I Ó N

a favor de

MERCK & CO., Inc. - de nacionalidad norteamericana - domiciliada en RAHWAY, N.J., E.U, 126 East Lincoln Avenue,

por:

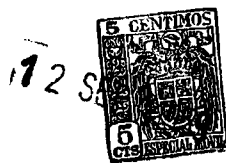
"Procedimiento para separar canamicina A de una mezcla que la contiene junto con otras sustancias"

-----:oOo:-----

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

Este invento se refiere a la canamicina, y más concretamente a un procedimiento para separar canamicina A, el antibiótico buscado, de mezclas crudas o soluciones que contengan esta sustancia mezclada con canamicina B, que no inte-

252322



resa por ser más tóxica, y otros materiales que puedan existir en tales mezclas impuras.

5 La canamicina, antibiótico producido por fermentación de varias cepas de Streptomyces canamyceticus, ha demostrado poseer propiedades antibióticas beneficiosas contra varias especies de bacterias grampositivas y gramnegativas. Se ha comprobado que estas propiedades antibióticas favorables obedecen a la presencia de una substancia designada por canamicina A, y que corresponde a la siguiente estructura química designada como Formula 1 en la hoja de gráficos y fórmulas anexa a esta memoria.

10 La canamicina A aparece en los fermentatos mezclada con otras formas de canamicina, cuyas estructuras se desconocen aún, y diversos otros materiales, entre ellos substancias insolubles en agua, sales e impurezas de color. La denominación de canamicina B se ha dado a la forma de canamicina que con la A se encuentra en la proporción más elevada. Otra forma de canamicina, que ha recibido el nombre de canamicina C, existe posiblemente en cantidades muy pequeñas. Mientras que 15 la canamicina A ha demostrado tener propiedades antibióticas ventajosas, la canamicina B, que también las posee, resulta algo más tóxica que aquélla, y por eso no conviene su presencia, porque puede contaminarla. No se conoce la toxicidad de la canamicina C, que todavía no se ha aislado.

20 Las propiedades químicas y físicas de la canamicina A y de la canamicina B son tan similares, que se hace sumamente difícil separar estos dos compuestos. Las propiedades de la canamicina C se aproximan mucho a las de la canamicina B, y en la siguiente descripción ha de entenderse que las referencias a la canamicina B se aplican igualmente a una mezcla de 25 30

252322



canamicinas B y C. Los procedimientos usuales de separación apenas sirven para separar la canamicina A de la canamicina B. La cristalización de los compuestos o de algunas de sus sales conocidas, por ejemplo, no las separa satisfactoriamente. Las canamicinas A y B se han separado una de otra por distribución en contracorriente de los derivados salicilidénicos de la mezcla impura de canamicinas empleando un sistema de metanol-agua-cloroformo-benceno (5:4:2:1), pero este procedimiento no es satisfactorio para operar en gran escala, pues implica técnicas complicadas de difícil realización.

Por consiguiente, un objeto del presente invento es proporcionar un procedimiento que permite separar canamicina A de canamicina B y otras sustancias, y se adapta fácilmente para operar en gran escala, además de ser económico y relativamente sencillo.

Otro objeto de este invento es proporcionar un procedimiento de este tipo capaz de aislar canamicina A en estado esencialmente puro, apropiado para usos farmacéuticos.

Se ha comprobado últimamente que estos y otros objetos pueden lograrse por medio de un procedimiento cromatográfico, en el que las canamicinas A y B se adsorben sobre una resina de intercambio iónico apropiada, y luego se eluyen separada y selectivamente de aquélla. En la práctica, se cree que la canamicina A y la canamicina B forman bandas separadas en una columna cromatográfica percolando despacio a través de la misma una solución que las contenga. Mediante elución con un disolvente adecuado, se revela la columna de manera que la canamicina B, más móvil, se eluye con preferencia antes que la canamicina A, menos móvil. Recogiendo fracciones del eluato, es posible separar así completamente la canamicina A de la



252322

canamicina B, que no interesa.

5 Para los fines de este invento, la mezcla de canamicinas que se somete a cromatografía puede ser una de las numerosas mezclas de este género que se obtienen en diversas fases del procedimiento de preparación. Aunque el producto impuro de fermentación que contiene las distintas canamicinas y otras impurezas puede emplearse directamente en el procedimiento cromatográfico, conviene utilizar con tal fin una solución más depurada, pues las soluciones muy teñidas pueden intoxicar las resinas, y las sales parecen convertir la resina en la sal respectiva, inútil en cromatografía.

10 En el procedimiento para separar las canamicinas del caldo de fermentación en que se producen, el caldo se cuela primero para retirar impurezas sólidas, y luego se adsorben las sustancias activas sobre una resina intercатиónica ácida, como la Amberlite IRC-50-, y se eluye con una base débil, como amoniaco, a fin de eliminar diversas sales e impurezas de color.

15 El eluato procedente de esta purificación inicial con resina se decolora luego más, por ejemplo, utilizando un carbón vegetal activado, como el Darco G-60. Las canamicinas se cristalizan luego en el eluato decolorado como sulfatos, mediante adición de metanol. Los monosulfatos así formados se disuelven después en agua y se pasan por una columna que contiene una resina interaniónica ácida, como la Amberlite IRA-25 401, con lo que la solución de monosulfato se decolora, y se obtienen las bases libres.

30 Para la práctica del procedimiento de este invento, la mezcla inicial de canamicinas se puede obtener del eluato de la resina intercатиónica, del eluato tratado con carbón



252322

5 vegetal, o, si interesa una forma muy depurada como carga, del eluato de la resina interaniónica. La carga más satisfactoria es desde luego la mezcla más depurada de canamicinas, ya que las menos puras aprovechan la columna cromatográfica para de-
colorarse y purificarse, además de utilizarla para separar la canamicina A de la canamicina B, con lo que disminuye in-
evitablemente la eficacia de la columna.

10 El material de alimentación contiene con preferencia un total de 5% a 50% de sólidos. Por debajo de este margen, se necesita un volumen tan grande que no resulta práctico, y por encima del mismo, se ha comprobado que se produce crista-
lización. Aunque es mejor la separación cromatográfica a con-
centraciones elevadas, no conviene utilizarlas superiores a las del margen señalado, porque la densidad de la solución
15 más concentrada es causa de que las resinas más ligeras que-
den desplazadas por la solución de carga. En cambio, dentro del margen preferido de concentraciones, el proceso cromato-
gráfico se desarrolla de modo que las bandas obtenidas son razonablemente compactas, y la carga no desaloja la resina de
20 la columna.

25 Se han empleado cargas hasta de 1 g. de canamicina aproximadamente por 25 ml. de resina; pero, en general, se pre-fieren algo menores. Por ejemplo, la de 1 g. por 50 ml. de resina ha permitido una separación bien definida sin re-
cargar la resina.

30 Las resinas que han resultado concretamente útiles para la separación cromatográfica de canamicina A pueden ca-
racterizarse como resinas porosas de intercambio aniónico (interaniónicas) del tipo fuertemente básico de aminas cua-
ternarias. Se conoce un crecido número de estas resinas, de

252322



las cuales son ejemplos la Amberlite IRA-400, la Amberlite IRA-401, La Dowex 1-x2, La Dowex 2-x4 y la permutita SK. También se pueden usar otras resinas interaniónicas de este tipo general. No es esencial el número de mallas; han dado resultados satisfactorios las resinas de 40 a 200. Todas las resinas se emplean en el ciclo de hidroxilo.

Después de poner la solución de carga en lo alto de la columna de resina, y de introducirla por percolación en ella, se forma con cuidado un copete de disolvente, y se mantiene luego un ritmo de circulación conveniente, a fin de revelar la columna eluyendo de ella la canamicina A y la canamicina B sin alterar el lecho de resina.

Como disolvente para revelar la columna, ha resultado satisfactoria el agua, destilada o corriente. Si se quiere, pueden emplearse soluciones acuosas de disolventes orgánicos, como las de alcoholes o cetonas, por ejemplo, metanol o acetona. Un disolvente bueno es el agua con 5% de metanol. También sirven concentraciones más altas de disolventes orgánicos miscibles con agua, pero si son excesivas, provocan a veces cristalización de las canamicinas en la columna.

La rapidez de circulación del disolvente revelador a través de la columna de resina puede variarse dentro de límites razonables, y guarda relación con el volumen de la operación. Si esta rapidez de circulación es excesiva, no permite alcanzar el equilibrio entre la resina y la solución; si es demasiado lenta, hace perder tiempo. Como ejemplo de ritmo adecuado de circulación, una columna que contenga un lecho de 400 ml. de resina Dowex 1-x2, con 30 pulgadas de espesor, puede revelarse a razón de 3,5 ml. por minuto. Para este mismo sistema, una circulación de 7 ml. por minuto sería excesiva.

172 SE



252322

La elución de la columna cromatográfica produce primero una tanda preliminar, que incluye los espacios vacíos de la columna de resina y los hidróxidos inorgánicos; luego la canamicina B, seguida de una mezcla de canamicinas B y C, y por último, la canamicina A, que es la menos móvil de todas.

Es posible seguir el curso de la elución en un cromatograma sobre tira de papel de las diversas fracciones eluidas. El cromatograma se observa generalmente empleando un colorante que por conveniencia se ha denominado "rojo cromatográfico"; se obtiene copulando pararrosanilina diazoada con ácido 1-naftol-4-sulfónico. El procedimiento es marcar tiras de papel de filtro Whatman núm. 1 con fracciones del eluato, cada una de 20 mmg. de canamicinas, y revelar el cromatograma durante 18 horas con butanol saturado de agua y que contenga 2% de ácido p-toluensulfónico. Los papeles teñidos se sumergen luego en rojo cromatográfico, y el colorante que sobra se retira lavando alternativamente con agua caliente y con etanol. La canamicina A, menos móvil, aparece en forma de mancha roja con R_f 0,15-0,22, y la canamicina B, más móvil, como mancha roja con R_f 0,25-0,40. La movilidad de la canamicina C es aproximadamente intermedia.

Un cromatograma típico se expone en la figura 1, donde las porciones o muestras de eluato se han numerado consecutivamente de 6 a 19, y la tira rotulada "A+B" es la obtenida revelando una mezcla sintética de canamicinas A y B. Puede apreciarse por esta ilustración que la canamicina B, notoriamente la más móvil de las dos, aparece en las muestras 8 a 12, y en parte en la 13, mientras que la canamicina A, menos móvil, aparece en las muestras 14 a 19, y un poco en la 13. Por tanto, las porciones 14 a 19 parecen contener canamicina A no



252322

contaminada de canamicina B.

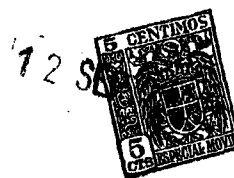
Aunque el desarrollo de cromatogramas sobre tiras de papel ofrece un instrumento para determinar cuando comienza la elución de canamicina A, no se adapta fácilmente para seguir el curso de la misma, a causa del tiempo gastado en revelar las tiras. Pero pueden emplearse diversas otras técnicas para seguir la elución.

Una de esas técnicas consiste en determinar el total de sólidos en el eluato, o sea el número de miligramos de sólidos por mililitro de eluato. Este valor se obtiene pasando el residuo que deja la evaporación de 5 ml. de eluato, y dividiendo este peso por 5. Se ha comprobado que el total de sólidos es mínimo en el momento en que la canamicina A comienza a aparecer en el eluato. Sin embargo, puede comprobarse que este método adolece de la dificultad de que el tiempo necesario para obtener los valores buscados lo hace inaplicable en el terreno industrial.

La medición del pH es otra técnica posible, ya que el pH del eluato pasa por un mínimo cuando aparece en el mismo canamicina A; pero tampoco es satisfactoria para este objeto, pues las variaciones de pH son tan pequeñas, que no permiten una diferenciación rigurosamente exacta.

Para observar y descubrir la presencia de canamicina A se pueden emplear reacciones químicas, tales como el método basado en la producción de una sustancia semejante al furfural, a partir de canamicina A, por la acción del ácido sulfúrico. Una solución que contiene aproximadamente 1 mg. de canamicina base, 6 ml. de agua y 4 ml. de ácido sulfúrico concentrado, se mezcla íntimamente. La mitad de esta muestra se tiene en un baño de hielo, y se emplea como testigo en el

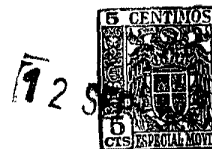
252322



espectrofotómetro, y la otra mitad se calienta dentro de un tubo tapado dentro de un baño de agua hirviendo, durante una hora. Ambas muestras se enfrían luego a temperatura ambiente, y se toma la densidad óptica a 2800 Å, por medio de un espectrofotómetro de Backmann (modelo DU). La lectura de la muestra problema se compara con la de otra tanda tipo de concentración conocida en canamicina base al mismo tiempo. El resultado se expresa en microgramos de la incógnita por miligramo de la tanda patrón. Sin embargo, se sabe que los azúcares dan también reacción positiva, por lo que este método puede suscitar algunas dificultades en casos de posible presencia de azúcares.

Evaluaciones biológicas, como la medición de la zona auxostática del microorganismo B.subtilis, pueden servir para denunciar la presencia de cualquiera de las canamicinas A o B. Esta es la típica y conocida prueba de la placa. En una placa de Petri que contiene una capa de agar con siembras de B.sutillis, se colocan seis cilindros de metal (de 0,3 ml. de volumen aproximado). En uno de cada dos tubos se carga una solución tipo de concentración conocida en canamicina, y los restantes se cargan de la solución desconocida. Después de un lapso de incubación de 18 horas, se mide el diámetro de las zonas de auxostasis o inhibición (el antibiótico se difunde en el agar y detiene el desarrollo del microorganismo), y se compara con el patrón. El resultado se expresa en microgramos de incógnita por miligramo de muestra tipo.

En la práctica se observa que, al eluir la columna cromatográfica, la actividad biológica aparece en las muestras primeras, mientras que la actividad química no se presenta hasta las porciones últimas, o sea hasta que comienza a verse



252322

la canamicina A. Pero, además de las mencionadas dificultades propias de las técnicas de valoración, el tiempo que requieren las hace inadecuadas para seguir la separación de las canamicinas A y B entre sí.

5 Se ha comprobado que la medida constante de la resistividad constituye una técnica conveniente para determinar la composición de estos eluatos cromatográficos. Se aprecian dos máximos de resistividad de los mismos, el primero cuando comienza la elución de canamicina B, y el segundo cuando se inicia la elución de canamicina A. La medición de la resistividad es instantánea y suficientemente exacta, dentro de los límites que existen durante la elución de la columna cromatográfica, para permitir una separación ajustada de canamicina A y canamicina B por división en fracciones. Más concretamente, por medio de un registro con el que puede obtenerse una representación gráfica de diversos valores físicos, es posible determinar, referido a la misma, el punto en que la canamicina A se está eluyendo de la columna cromatográfica, y recoger fracciones sucesivas de canamicina A separada de la canamicina B.

10

15

20

En la figura 2 se expone una gráfica de los índices de resistividad obtenidos en una elución representativa; En esta gráfica, las ordenadas indican los índices de resistividad en ohm-cm. y los números del eje de abscisas indican tiras o porciones numeradas correspondientes a las del cromatograma sobre tira de papel de la figura 1. La resistividad del primer volumen de eluato, que corresponde aproximadamente a 0,3 de resina y es el más tenue de la columna, es muy elevada. Las porciones o muestras 4 a 6, que comprenden el volumen aproximado de eluato de 0,4 de resina, presentan una resistividad muy baja,

25

30

12 SEP



252322

a causa de la elución de hidróxidos inorgánicos. Comenzando hacia la porción 7, la resistividad aumenta de pronto hasta un máximo, y entonces comienza la elución de canamicina B.

La presencia de esta canamicina B en el eluato se expone en

5 la porción de curva situada sobre la letra "B". Es decir, que se eluye canamicina B con un volumen de columna aproximado de 0,7 en las muestras 8 a 13, en unión de un poco de canamicina

C, como indica el resalto de la porción 12. Comenzando en la porción 13, la resistividad pasa por otro máximo al aparecer

10 canamicina A en el eluato. La elución de canamicina A se expresa por la porción de la curva situada por encima de la letra

"A, de modo que se eluye canamicina A con volúmenes de resina de 2,5 en las muestras 13 a 32. Puede apreciarse que el máximo

indicado por el descenso de la curva de resistividad en la

15 porción 13 de la figura 2 corresponde a la aparición de las manchas que marcan la aparición de canamicina A en el cromatograma de tira de papel de la figura 1. Es decir, que este

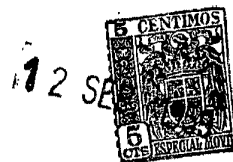
cromatograma atestigua la exactitud del método de la resistividad para determinar la presencia de canamicina A en el

20 eluato. Puede adelantarse que para seguir el curso de la elución sirven otras constantes físicas, como el índice de refracción, del mismo modo que la resistividad del eluato.

El invento se comprenderá y apreciará mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que se exponen con fines de
25 ilustración solamente, y no deben entenderse en modo alguno como limitativos del alcance del invento, según se define en las reivindicaciones.

EJEMPLO 1:

30 Se disolvió una muestra de 35 g. de sulfato cristalino impuro de canamicina en 230 ml. de agua destilada, para



252322

obtener una solución al 15%. La solución, de color pardo subido, se pasó por una almohadilla delgada de cofiltrante Supercel, para eliminar los materiales insolubles. El filtrado se pasó a través de una columna que contenía 245 ml. de resina Amberlite IRA-401-, en el ciclo de hidroxilo, a razón de 7 ml/

5 minuto. Se recogieron 620 ml. de eluato incoloro, y se concentraron en vacío hasta obtener una solución que contenía 25% de sólidos totales. El rendimiento de la elución fue de 95%.

Se montó perpendicularmente una columna de Pirex de

10 4 pies de altura y 1 pulgada de diámetro interno, con paredes recias, y se llenó de una lechada acuosa que contenía 400 ml. de resina Dowex 1-x2 de 50-100 mallas, en el ciclo de hidroxilo, con una altura de 30 pulgadas. La resina se lavó en corriente descendente con agua destilada desionizada, de 45000

15 ohm/cm. de resistividad mínima. Sobre el lecho de resina se aplicaron 40 ml de la carga de solución al 25% de canamicinas base mixtas. Después de percolar la carga en la resina, se formó con cuidado un copete de agua destilada desionizada, sin alterar el lecho de resina. La rapidez de circulación se

20 mantuvo siempre a 3,5 ml/minuto. La corriente de eluato se hizo pasar, a través de un contador, a una célula de conductividad y a un fraccionador. Mediante un registrador Varien (modelo G-11A) conectado a la célula, se obtuvo un registro continuo de la resistividad; los límites se fijaron en 6000

25 y 45000 ohm/cm. El eluato se recogió en porciones de 50 ml. Además de la resistividad, se determinaron en él los sólidos totales, las actividades química y biológica y el índice de refracción, y se preparó un cromatograma sobre tira de papel. Los datos numéricos se consignan en la tabla 1; el cromatograma sobre papel se expone en la figura 1, y el registro de

30

252322



resistividad consta en la figura 2.

Tabla 1

Porción núm.	Sólidos totales mg/ml.	Val. química mmg/mg.	Val. biológica mmg/mg.	Índice de refracción
1	0.06	-	-	1.3322
2	0.04	-	-	1.3323
3	0.24	-	-	1.3323
4	3.20	-	-	1.3334
5	5.26	-	-	1.3334
6	0.50	-	-	1.3324
7	0.10	81	85	1.3323
8	0.48	90	357	1.3323
9	3.16	50	784	1.3326
10	6.02	57	824	1.3330
11	5.16	56	861	1.3330
12	3.58	69	728	1.3329
13	2.42	543	791	1.3326
14	9.78	933	966	1.3337
15	18.68	1001	888	1.3352
16	19.94	997	977	1.3352
17	19.12	932	859	1.3352
18	17.80	971	976	1.3352
19	15.66	942	921	1.3348
20	13.10	985	1053	1.3346
21	11.56	1009	845	1.3343
22	9.88	984	919	1.3338
23	8.32	1019	872	1.3336
24	7.04	1014	940	1.3334
25	6.36	970	961	1.3331
26	4.50	1046	968	1.3330
27	3.64	1073	897	1.3329
28	2.88	1076	890	1.3327
29	2.20	1084	949	1.3326
30	1.66	1035	940	1.3324
31	1.20	1060	976	1.3324
32	0.82	913	875	1.3323

Por estos datos puede apreciarse que los mínimos observados en la porción 13 respecto a sólidos totales y al índice de refracción coinciden con el notable aumento de la actividad química en la porción 13, la aparición de la mancha de canamicina A en el cromatograma de la figura 1, y el máximo de resistividad indicado por el punto bajo de la curva correspondiente de la figura 2 en la porción 13. Así, se ha



252322

comprobado que la porción 13 marcaba el comienzo de la elución de canamicina A, y que en las porciones 14 a 32 se eluía esta canamicina no contaminada de canamicinas B o C.

Resultados similares se han obtenido empleando resinas Dowex 2-x4, Amberlite IRA 400 y Permutita SK. La resina Dowex 1-x8 no dio resultados satisfactorios, acaso por tener demasiadas cadenas transversales.

EJEMPLO 2º.

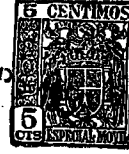
Se sometieron 27 g. de canamicina impura a cromatografía sobre 1 litro de resina Amberlite IRA-401, en el ciclo de hidróxido. El eluato se recogió en porciones, empleando agua como eluente, y se determinaron los sólidos totales y los valores químico y biológico. Estos datos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

Muestra	Volumen ml.	Sólidos totales mg/ml.	Val. química mmg/mg.	Val. biológica mmg/mg.
Carga	500	52,0	568	288
Vacuo	300	---	---	---
Porción 1	100	0.4	0	0
2	100	1.0	0	0
3	100	1.3	0	0
4	100	1.8	0	0
5	100	2.4	0	104
6	100	3.7	0	379
7	100	4.2	0	477
8	100	6.0	0	333
9	100	6.7	29.9	672
10	100	7.3	54.8	657
11	100	6.0	50.0	833
12	500	7.4	324	1010
13	500	6.9	855	1090
14	1000	4.0	1423	1250
15	1000	2.9	760	1030
16	1000	1.3	685	923

Estos datos indican que el mínimo de sólidos totales en la porción 11 corresponde al aumento de actividad química

12 SEP



entre las porciones 11 y 12, a causa de la presencia de canamicina A en el eluato.

EJEMPLO 3º

5 Se siguió la técnica del ejemplo 1º, pero empleando
resina Amberlite IRA-401- en el ciclo de hidroxilo para la
depuración preliminar de la solución de canamicina y para la
cromatografía, y como elutriente, agua con 5% de metanol.
Primero se eluyó canamicina B; a continuación, una mezcla de
canamicina A y cantidades decrecientes de canamicina B, y
10 luego, canamicina A, como se demostró por determinación de los
sólidos totales y la resistividad, y por revelado de un cromatograma sobre tira de papel.

EJEMPLO 4º

15 Se siguió la misma técnica del ejemplo 3º, pero empleando
como elutriente agua con 5% de acetona. Los resultados fueron los mismos del ejemplo 3º.

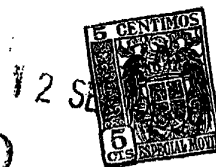
EJEMPLO 5º

20 Se siguió la técnica del ejemplo 1º, pero cargando
una muestra de 40 ml. de solución al 25% de canamicina base
impura, concentrada y decolorada, obtenida antes de cristali-
zar el sulfato de canamicina impuro. Los resultados demuestran
que había canamicina A en las últimas porciones del eluato,
no contaminadas de canamicina B ni de canamicina C; ésta se
descubrió en un punto casi equidistante de los de canamicina
25 A y canamicina B en un cromatograma sobre papel. Resultados
similares se obtuvieron empleando esta carga antes de decolorarla
con carbón vegetal Darco G-6C.

EJEMPLO 6º

30 Se siguió el procedimiento del ejemplo 1º, pero empleando
como carga 60 ml. de una solución de canamicina al

252322



25%. Los resultados fueron similares a los del ejemplo 1º.

EJEMPLO 7º

Se siguió la técnica del ejemplo 1º, pero empleando como carga 20 ml. de solución de canamicina al 50%. Los resultados fueron análogos a los del ejemplo 1º.

Los ejemplos precedentes muestran que el procedimiento original de este invento permite una separación cuantitativa y completa entre canamicina A y canamicinas B y C. La técnica puede adaptarse fácilmente a operaciones industriales, sirviéndose de varios métodos para determinar el punto en que el eluato contiene la canamicina A que interesa. La medición de la resistividad o del índice de refracción, en particular, es muy útil para seguir el curso de la elución. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en un proceso industrial reiterativo, en el que las condiciones se mantienen aproximadamente iguales en tandas sucesivas, sería posible recuperar la canamicina A no contaminada de canamicinas B o C, recogiendo simplemente el eluato en un momento prefijado del proceso de elución. Además, pueden emplearse otros métodos para seguir el curso de la elución sin apartarse de la finalidad y alcance de este invento.

-----: N O T A :-----

Se reivindica como objeto de esta patente:

1.- Procedimiento para separar canamicina A de una mezcla que la contiene junto con otras substancias, especialmente de una mezcla que contiene canamicinas A y B; el cual comprende cargar esa mezcla en una columna que contiene una resina porosa interaniónica fuertemente básica, y eluir de tal columna la canamicina A separada de la canamicina B.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que

252322



la resina interaniónica (de intercambio o permutación de anio-
nes) es del tipo de amina cuaternaria.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el
que la resina interaniónica está en el ciclo de hidroxilo.

5 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el
que la elución se efectúa empleando agua como eluente o elu-
triente.

10 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el
que la elución se efectúa empleando como elutriente una solu-
ción acuosa de un disolvente orgánico miscible con agua.

15 6.- Procedimiento para separar canamicina A de una
mezcla que la contiene junto con otras sustancias, especial-
mente de una mezcla que contiene canamicinas A, B y C y otras
impurezas; el cual comprende percolar dicha mezcla a través
de una columna provista de una resina porosa interaniónica
fuertemente básica, que adsorbe selectivamente la canamicina
A y la B, y eluir de dicha resina la canamicina A separada de
las canamicinas B y C.

20 7.- Procedimiento para separar canamicina A de una
mezcla que la contiene junto con otras sustancias; especial-
mente de una mezcla de canamicina A y B; el cual comprende
adsorber una y otra en una columna de resina porosa intera-
niónica fuertemente básica; eluir de dicha columna la canami-
cina B, y eluir luego la canamicina A no contaminada de la B.

25 8.- Procedimiento para separar canamicina A de una
mezcla que la contiene junto con otras sustancias, especial-
mente para recuperar canamicina A pura de una mezcla integra-
da esencialmente por canamicina A y canamicina B; el cual
comprende pasar la mezcla a través de una columna que contie-
30 ne una resina porosa interaniónica fuertemente básica, que

252322



adsorbe selectivamente la canamicina A y la B; pasar un eluente a través de la columna, para eluir primero la canamicina B y luego la canamicina A, y recuperar de fracciones apropiadas del eluato la canamicina A no contaminada de canamicina B.

5 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la canamicina A se recupera recogiendo fracciones del eluato en un punto determinado del proceso de elución.

10 10.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que las fracciones de donde se recupera la canamicina A se eligen por referencia a una valoración de la resistividad del eluato.

15 11.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que las fracciones de donde se recupera la canamicina A se eligen por referencia a una valoración del índice de refracción del eluato.

12.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la resina de intercambio de aniones es del tipo de amina cuaternaria.

20 13.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la resina interaniónica está en el ciclo de hidroxilo.

14.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el eluente o elutriente es agua.

25 15.- Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el eluente es una solución acuosa de un disolvente orgánico miscible con agua.

16.- Procedimiento para separar canamicina A de una mezcla que la contiene junto con otras sustancias.

Esta memoria consta de dieciocho páginas, escritas por una sola cara.

BARCELONA, 12 SEP. 1959
P. A.

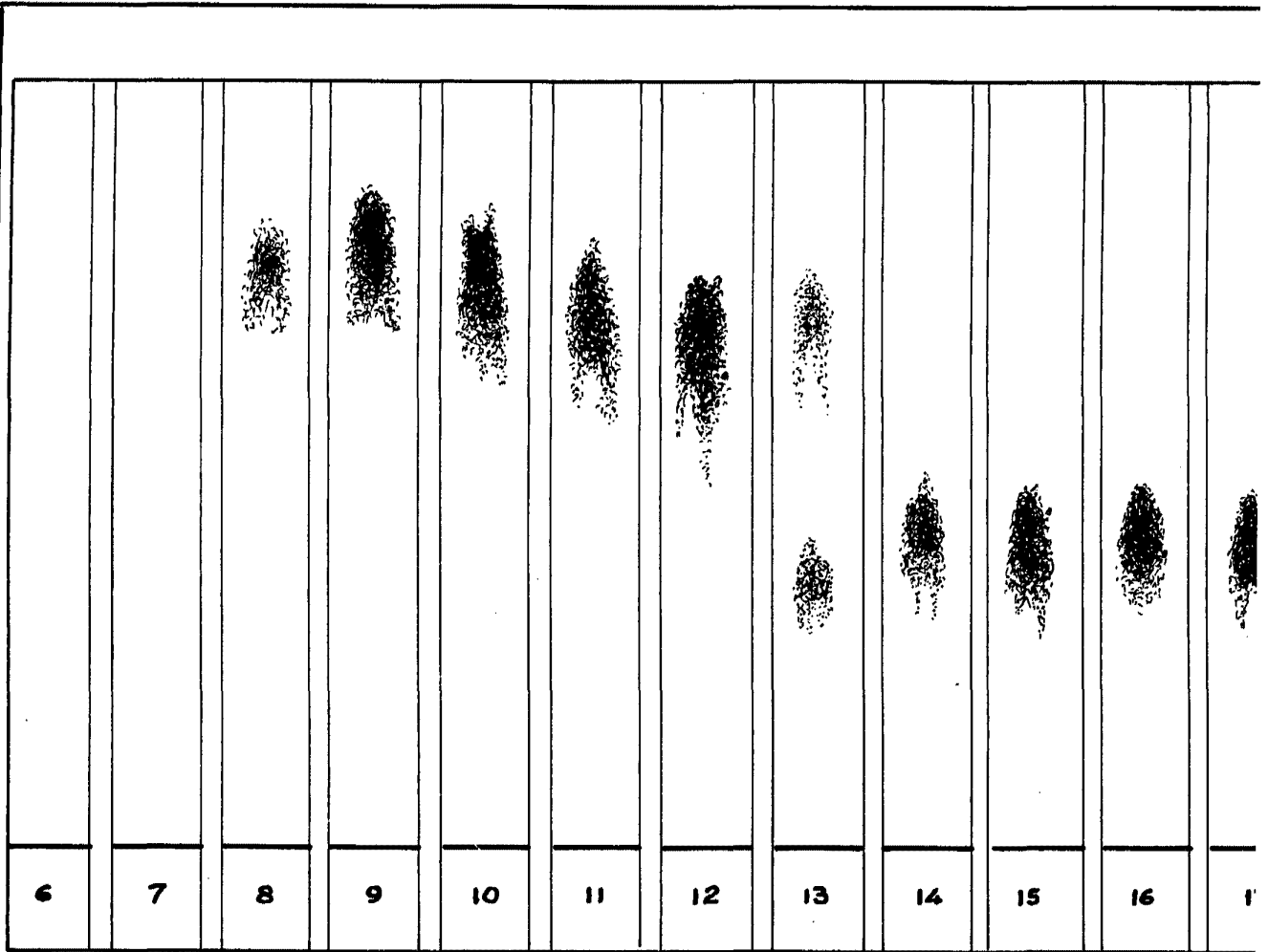
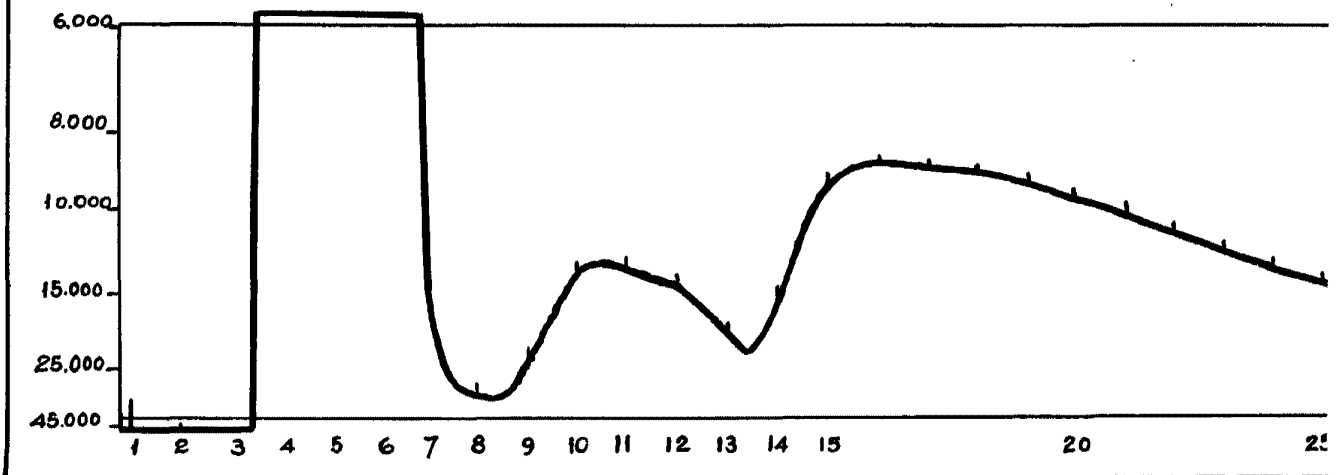


FIG. 1

FIG. 2

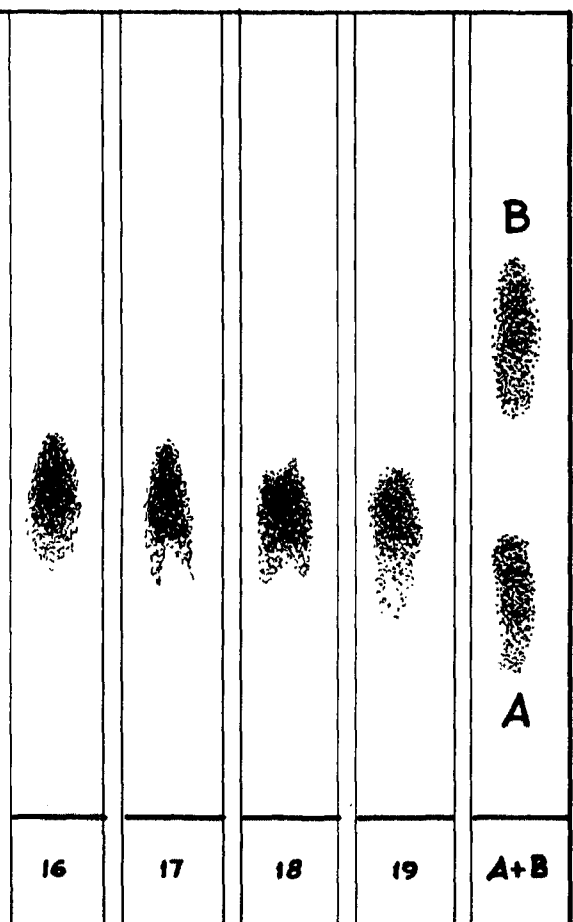


6847

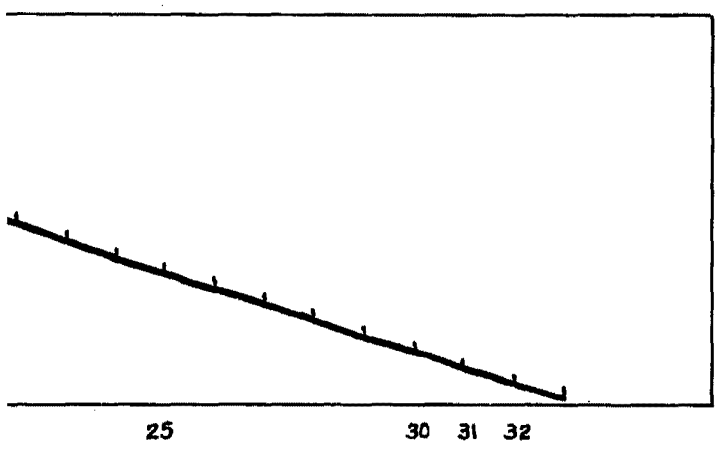
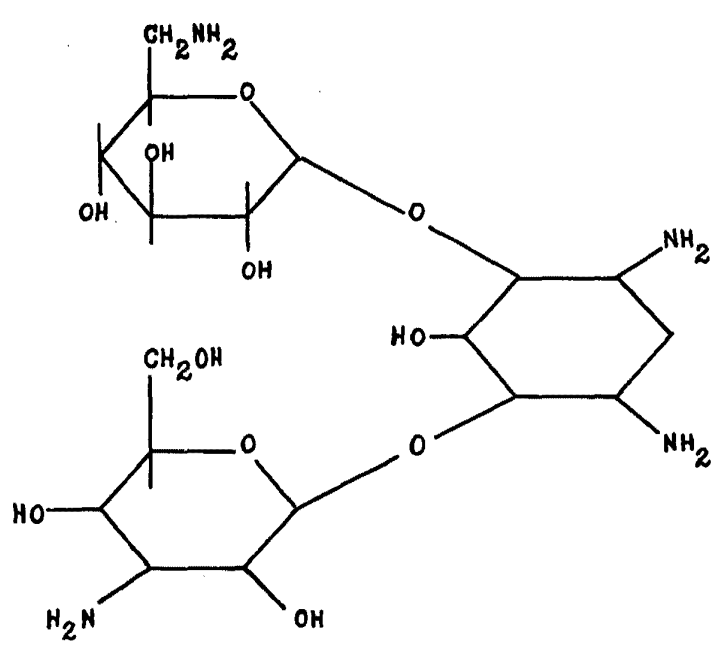
72



252329



FORMULA 1



V.A. [Signature]