



274 708

274 708

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por veinte años en España, por "PROCEDIMIENTO PARA
LA EXTRACCION, PURIFICACION Y CRISTALIZACION DE HI
DROXICOBALAMINA".

a favor de

PIERRELL, S.p.A.

domiciliado en Via Turati, 30 - Milán, ITALIA

Prioridad: De la solicitud de patente inglesa n.º.
21.151 del 12 de junio de 1961

Inventores: Ivan Bolovich y Gerardo Fabrizio.

274708



5 principalmente clorocobalamina y diclorocobalamina, porque los medios son ricos en iones Cl^- introducidos como componentes de los propios medios de cultivo o de la molécula que desempeña el papel de precursor (cloruro cobaltoso). La formación de Cl^- cobalamina, SO_4^- cobalamina, NO_3^- cobalamina, Br^- cobalamina, etc., ocurre fácilmente en presencia de la menor cantidad de tales aniones (vease la patente estadounidense No. 2.738.302).

10 Mediante especiales trabajos de investigación, el reivindicante ha determinado que, si los métodos para el aislamiento y purificación del principio activo a partir de los materiales fermentados se llevan a cabo en completa ausencia de iones Cl^- , SO_4^- , NO_3^- , Br^- , etc., se obtienen productos cristalinos que son muy similares a la hidroxicobalamina en lo que respecta a sus propiedades fisico-químicas (máximos de absorción, solubilidad específica, coeficiente de distribución para el sistema agua/alcohol benoílico, etc.), pero definitivamente no son hidroxicobalamina en forma de la base libre.

15 Estos hallazgos fueron confirmados mediante especiales y detallados trabajos analíticos, que probaron que la hidroxicobalamina como base libre no se hallaba presente en el producto, en el que el ion OH^- había sido sustituido por otros aniones. Además, los análisis elementales y cualitativos de estas muestras altamente purificadas probaron la presencia de iones Cl^- . Bajo diferentes condiciones experimentales, se probó la presencia de iones SO_4^- , NO_3^- , etc. El análisis cualitativo se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la patente estadounidense No. 2.738.302.

25 Se probó así que la hidroxicobalamina como base libre no puede obtenerse de cultivos fermentados y materiales biológicos con los métodos conocidos actualmente. En el producto obtenido mediante estos procesos, uno de los aniones que prevalecen en el medio ha sustituido al ion OH^- y esto conduce a una variedad de cobalaminas sustituidas.

30

274708



5 Se ha descubierto ahora que la hidroxicoobalamina como base libre puede recuperarse de soluciones purificadas de cobalaminas sustituidas (excluyéndose de ellas la cianocobalamina) pasando estas soluciones a través de columnas llenas de adecuadas resinas cambiadoras de iones.

Las resinas cambiadoras de iones, tales como la Amberlite IRA 400, IRA 401, IRA 410 ó De-Acidite "FF", De-Acidite "E", Permutite "SS", etc., tienen la propiedad de sustituir con iones OH^- los aniones que las cobalaminas sustituidas poseen en su lugar.

10 La ventaja del proceso objeto de esta invención ha de hallarse en el hecho de que hace posible obtener hidroxicoobalamina en estado de base libre a partir de materiales naturales. Otra ventaja de este proceso reside en el hecho de que permite la realización de todos los procesos de aislamiento y purificación de las sustancias activas en 15 forma de cobalaminas sustituidas (excluyéndose de ellas las cobalaminas no ionizables tales como cianocobalamina, sulfocobalamina, etc.). Pueden obtenerse así rendimientos muy superiores como consecuencia de la mejor estabilidad que poseen estas cobalaminas sustituidas en comparación con la hidroxicoobalamina, que es muy inestable bajo las condiciones fisico-químicas reinantes durante estos procesos de purificación. 20 ción.

La conversión en hidroxicoobalamina tiene lugar al final del proceso de purificación y proporciona rendimientos superior al 80 %.

25 De acuerdo con el proceso objeto de esta invención, los materiales que contienen cobalaminas activas experimentan un tratamiento (conocido en el arte) que tienen la finalidad de aislar las cobalaminas activas de esos materiales, obteniéndose así una rica solución acuosa. Esta solución acuosa, rica en cobalaminas activas, puede purificarse mediante los métodos conocidos en el arte, tales como extracción de di 30 solvente, absorción con resina o carbón activado, o cromatografía.

-5- 708



5 La solución concentrada y purificada, conteniendo cobalaminas de una pureza superior al 50%, y oscilando, si es posible, entre el 50 y el 80%, es pasada luego a través de una columna llena de la adecuada resina de cambio iónico, preferiblemente del tipo de polistireno enlazado transversalmente. La relación entre el volumen de la resina y el peso de la cobalamina es de 10:1.

10 Durante este tratamiento, los aniones Cl^- , $\text{SO}_4^{=}$, NO_3^- , Br^- , etc. disociados de las cobalaminas, son sustituidos por un número igual de iones OH^- , formándose así hidroxicobalamina en estado de base libre.

Se observó sin embargo que la cianocobalamina no puede convertirse en hidroxicobalamina mediante este tratamiento, probablemente porque los iones CN^- no son disociados de la cianocobalamina disuelta.

15 La solución de hidroxicobalamina obtenida con el método anterior es concentrada luego y añadida con 6 volúmenes de acetona; se separa la hidroxicobalamina de la solución en forma de cristales y éstos son recogidos. Esta sustancia tiene las propiedades generales de la base de hidroxicobalamina libre y puede dosificarse como base libre.

20 Ejemplo

a) Aislamiento y purificación de cobalaminas activas.

25 El método de purificación es el objeto de otra patente obtenida por el reivindicante (Patente No. 44.302/60 del 23 de diciembre de 1960). Se suspenden materiales que contienen cobalamina (la cianocobalamina ha de hallarse ausente de ellos) en agua en la medida de 5 a 20 partes de total de sólidos por 100 partes de suspensión, calentándose luego a 100-120°C y manteniéndose a tal temperatura con agitación durante 10 minutos.

30 Después de enfriar, se añade un volumen igual de acetona, se filtra el material residual suspendido y se evapora la solución fil-

274708



17 FEB 1962

trada bajo vacío hasta $3/10$ de su volumen original.

Esta solución acuosa enriquecida es purificada mediante tratamiento con óxido de calcio, que se añade en la cantidad de 1,5 partes por cada 100 partes de la solución; el pH de la solución se lleva luego aproximadamente al valor de 10. Las proteínas y otros precipitados son filtrados y desechados.

La siguiente operación de purificación se efectúa mediante precipitación de las cobalaminas en forma de un complejo de ácido tánico. Para este fin, se añaden 0,5 partes de ácido tánico a cada 100 partes de la solución purificada, aplicándose una agitación que se mantiene durante 60 minutos. Luego se recoge el precipitado por filtración y se disuelve en una solución al 5 % de ácido acético. Se evapora la solución acética hasta la mitad de su volumen original y se cromatografía sobre una columna de aluminio.

Las principales fracciones son separadas y las soluciones se concentran hasta que contienen aproximadamente 5 g de cobalamina por litro de solución.

b) Conversión a hidroxicobalamina

De la solución que ha sido purificada y concentrada como queda explicado, se obtiene hidroxicobalamina mediante cambio iónico.

1) Preparación de la columna

Se suspende un litro de resina de cambio iónico Amberlite IRA 400 mediante agitación en 25 litros de una solución al 4 % de hidrato sódico y se vierte la mezcla en una columna de vidrio de un volumen total de 2 litros (la relación entre su diámetro interno y su altura ha de ser de 0,25 aproximadamente). La altura de la capa de resina sedimentada sobre el filtro ha de ser aproximadamente la mitad de la altura de la columna. Después de que se ha desaguado completamente la solución de hidróxido sódico, se lava la resina con agua desionizada, hasta que el último lavado, después de filtrar a través

274708



17 FEB 1962

de la capa de resina, muestra aproximadamente un valor de pH de 7. La columna se halla entonces lista para su uso.

2) Conversión en hidroxicoobalamina libre

5 Se pasa a través de la columna un litro de la solución cromatográfica y concentrada, que contiene aproximadamente 5 g de cobalamina, cuya columna se ha preparado como se especifica anteriormente, y se regula el flujo al ritmo de 30 a 50 cm³ por minuto. El valor de pH de la solución tratada es de 8,0 a 8,5 aproximadamente.

3) Cristalización de la hidroxicoobalamina

10 La solución recuperada del proceso de cambio iónico es evaporada al vacío hasta que su contenido en hidroxicoobalamina alcanza el valor de 15 a 25 g por litro. Luego se vierte lentamente en un volumen ocho veces mayor de acetona, con agitación. La hidroxicoobalamina cristaliza en forma de agujas pardo-rojizas. El rendimiento es de 4,60 g de material, que muestra las siguientes propiedades:

Espectros de absorción en agua:

Banda tope a 273 - 275 m μ , E₁^{1%} cm 135 - 140

Máximo fuerte a 350 - 352 m μ , E₁^{1%} cm 170 (mínimo)

Máximo a: 520 - 525 m μ , E₁^{1%} cm 60 (mínimo)

20 pH de la solución (5000 γ /cm³): 8,2 - 8,6

Prueba de aniones inorgánicos y orgánicos: negativa.

Coeficiente de distribución alcohol bencílico/agua: 8,0

Punto de fusión: la sustancia oscurece a unos 205°C

No funde por debajo de 350°C.

REIVINDICACIONES

25 En resumen, la Patente de Invención que se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

30 1ª. Procedimiento para la extracción, purificación y cristalización de hidroxicoobalamina en forma de la base libre a partir de materiales naturales donde se halla contenida en forma compleja, cuyo pro

274 708



5 cedimiento se caracteriza por el hecho de que las cobalaminas son extraídas en una forma definida por el anión enlazado a Co^+ y que es dissociable en solución, siendo dicho anión subsiguientemente separado y sustituido por un ion OH^- mediante un cambio iónico efectuado por medio de resinas particularmente adecuadas para este fin, siendo finalmente cristalizada la hidroxicobalamina así obtenida por adición de acetona.

10 2ª. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la forma bajo la cual las cobalaminas son extraídas son las de cloruro, sulfato, nitrato u otras, en las que el ion enlazado al cobalto es dissociable en solución.

15 3ª. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se emplean como resinas de cambio iónico resinas de tipo polistireno enlazadas transversalmente, tales como, por ejemplo, la IRA 400, 401, 410 - De-Acidite "FF" - Permutite "SS" - u otras del mismo tipo.

4ª. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCION, PURIFICACION Y CRISTALIZACION DE HIDROXICOBALAMINA".

20 Todo tal y como se reivindica en la presente memoria, que consta de ocho páginas escritas a máquina.

Madrid, 17 de Febrero de 1962

ALFONSO UNGRIA

P.P.