

326947



P-32.132

(Cas R')

MEMORIA DESCRIPTIVA

326947

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

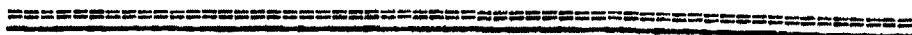
en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de JEAN BOIGE, de nacionalidad francesa, residente en 53 Avenue Vercingétorix, Aulnay-sous-Bois (Seine St-Denis), Francia, por:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION INDUSTRIAL DE LA HIDROXOCOBALAMINA POR REDUCCION DE LA CIANOCOBALAMINA EN SOLUCION SEGUIDA DE SU OXIDACION"



El presente invento concierne a un procedimiento que permite fabricar industrialmente la hidroxocobalamina a partir de la cianocobalamina.

Se conoce la cianocobalamina (o vitamina B 12) que incluye en el seno de una molécula orgánica de estructura compleja, un grupo ciano CN. Se encontrará una descripción de la vitamina B 12 así como su fórmula completa y la exposición de sus propiedades, por ejemplo, en el "Merck Index", edición 1960 página 1098.

Se tiende actualmente a preferir al cuerpo pre-

326947



cedente por la sustitución del grupo ciano por un grupo hidroxilo OH.

5 En efecto, la hidroxocobalamina, que posee propiedades básicas, entra más fácilmente en el metabolismo de los individuos.

Se conocen ya diversos procedimientos que permiten pasar de la vitamina B 12 a la vitamina B 12b. Por ejemplo, según una técnica conocida, se comienza por eliminar en medio ácido el grupo CN^- de la molécula de cianocobalamina y se sustituye por otro anión tal como Cl^- , y luego se pasa del éster así obtenido a la hidroxocobalamina.

15 Sin embargo, la primera reacción no tiene más que un rendimiento muy pequeño, no siendo la cianocobalamina prácticamente ionizable, de manera que el procedimiento no es interesante desde un punto de vista industrial.

Según otra técnica conocida, se efectúa una hidrogenación catalítica de la cianocobalamina para transformarla en cobalamina, que se oxida luego para obtener la hidroxocobalamina.

20 Sin embargo, en este procedimiento, el rendimiento de la reacción depende, por una parte, del catalizador cuya eficacia puede variar en el tiempo y a cada operación. Además, las cobalaminas permanecen un tiempo apreciable en presencia de hidrógeno, lo que es perjudicial, como se explicará más adelante.

25 Una tercera técnica conocida que supone también una hidrogenación seguida de una oxidación, prevé efectuar la hidrogenación por el hidrógeno naciente en el seno de una solución de cianocobalamina.

30 En particular, se ha descrito en la patente espa-



5 ñola número 267046 un procedimiento que consiste en hacer
actuar un hidrácido sobre una sal divalente que pasa a ser
trivalente con liberación de hidrógeno en presencia de la
cianocobalamina. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar el
ácido clorhídrico sobre el cloruro ferroso o el ácido sul-
fúrico sobre el bisulfito de sodio. Después de la elimina-
ción del precipitado formado, la solución es reoxidada por
burbujeo de aire.

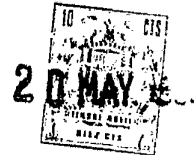
10 Este procedimiento, que constituye una mejora con
relación al precedente, presenta, sin embargo, el inconveniente
de dejar un tiempo apreciable a las cobalaminas en
presencia de hidrógeno.

15 Se ha propuesto igualmente efectuar la reducción
añadiendo un metal (Fe o Zn) en una solución ácida de ciano-
cobalamina. Sin embargo, este procedimiento carece de inte-
res industrial, dando las cantidades de ácido y de metal pre-
vistas una presión de hidrógeno insuficiente para que la hi-
drogenación deseada se realice. No se tiene, pues rendimiento
válido. Además, este procedimiento prevé una agitación de
20 los reactivos, lo que permite difícilmente obtener operacio-
nes reproducibles.

25 En la técnica según la patente española 269988, la
hidrogenación está asegurada por paso de una mezcla de una
solución de un hidrácido y de cianocobalamina a una colum-
na de cinc granulado, siendo reoxidada inmediatamente la so-
lución saliente por burbujeo de aire.

30 Este procedimiento aporta una mejora importante con
relación al de la patente española número 267.046 porque la
hidrogenación se efectúa aquí de modo continuo, de manera
que el producto hidrogenado no permanece en presencia del

326947



medio reductor, lo que limita considerablemente los riesgos de degradación de las cobalaminas.

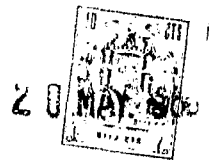
5 Sin embargo, incluso en este procedimiento, pueden sobrevenir ciertas irregularidades debido a que la hidrogenación varía con la velocidad de paso del líquido sobre el cinc, con la granulometría y la calidad del cinc. Por este motivo, es necesario regular todos los factores de un aparato a otro.

10 En todas las técnicas que suponen la acción de un ácido sobre un metal y desprendimiento de hidrógeno gaseoso, el rH de la solución a hidrogenar puede ser considerado como nulo. En efecto, el rH mide, como se sabe, el potencial de oxidación-reducción de una solución, tiene por valor 0 en el caso del hidrógeno libre a la presión atmosférica y vale 41
15 para el oxígeno libre a la presión atmosférica, siendo realizada la inactividad sensiblemente para $rH = 21,5$. El valor del rH da así una medida del poder reductor u oxidante de una solución.

20 Ahora bien, el hecho de que en los procedimientos anteriores el rH sea nulo, muestra que el poder reductor de la solución no puede ser controlado. Se corre el riesgo así de que la hidrogenación sea más acentuada de lo que se desea, lo que puede originar una degradación de la molécula de cobalamina.

25 El procedimiento según el presente invento trata de remediar los inconvenientes de los procedimientos anteriores permitiendo efectuar la transformación deseada de cianocobalamina en hidroxocobalamina en las condiciones ópticas, especialmente en lo que concierne al poder reductor del me-
30 dio hidrogenante utilizado.

326947



Según el invento, el procedimiento de fabricación industrial de la hidroxocobalamina por reducción de la cianocobalamina en solución seguida de su oxidación, se caracteriza principalmente porque la reducción se obtiene realizando una mezcla de la solución de cianocobalamina y de una sal ferrosa ionizable en solución acuosa, estando comprendido el pH de la solución resultante entre 3, y 5, y añadiendo luego progresivamente a esta solución una base fuerte con objeto de llevar el pH hasta un valor superior a 6,2, lo que provoca la precipitación en estado de ferrocianuro ferroso del grupo CN de la cianocobalamina.

En este procedimiento, no solo se regula a voluntad el rH, lo que permite efectuar, no ya una hidrogenación parcial, sino una ionización controlada, sino que además se obtiene una reacción completa debido a que se elimina a medida de su liberación el grupo CN en estado de sal insoluble de ferrocianuro.

Por este motivo, el equilibrio es desplazado completamente sin tener que hacer sufrir una acción reductora fuerte que podría atacar ciertas partes de la molécula compleja que forma las cobalaminas.

Se comprueba, por lo demás, que a partir de un pH de 6,2-6,5, la solución que era roja cambia de color y pasa a ser marrón, al mismo tiempo que el ferrocianuro precipitado. La reacción es prácticamente inmediata. Si se filtra y se dosifica el cianuro por los métodos más sensibles que pueden poner de manifiesto, por ejemplo, 0,3 gama/litro de solución, la prueba permanece negativa, lo que traduce una reacción cuantitativa debida a la eliminación por precipitación de uno de los factores del equilibrio (el grupo ciano ionizado

326947²⁰



que pasa al estado de ferrocianuro).

El cambio de coloración comprobado indica el paso del cobalto de la cianocobalamina del estado trivalente al estado bivalente, o incluso de la forma oxidada a la forma re-
5 ducida. Se observa finalmente que la transformación así rea-
lizada corresponde a la ionización de la totalidad de la cianocobalamina.

De preferencia, el pH de la solución inicial que comprende la cianocobalamina y la sal ferrosa ionizable es-
10 tá comprendido sensiblemente entre 3,2 y 4,5, mientras que la neutralización de la solución inicial por la base fuerte se prosigue hasta un pH por lo menos igual a 7,2 y que puede alcanzar sin inconveniente de 9 a 9,5, permitiendo esto precipitar la totalidad del ferrocianuro ferroso.

15 En un modo de ejecución ventajoso del procedimiento, la cianocobalamina se utiliza en solución acuosa a una concentración comprendida entre 2.000 y 15.000 γ /ml, la sal ferrosa ionizable está constituida por cloruro ferroso o sulfato ferroso, en tal cantidad que la concentración en sal fe-
20 rrosa de la solución resultante esté comprendida sensiblemente entre 1/40 y 1/5 de mol por litro. Se debe subrayar sin embargo, que la concentración en sal ferrosa puede variar dentro de proporciones muy amplias sin influencia notable sobre el rendimiento. Sin embargo, es ventajoso añadir el
25 mínimo de sal ferrosa necesario para facilitar las purificaciones ulteriores.

La base fuerte utilizada para llevar el pH está constituida de preferencia por una solución de sosa cáustica, de potasa, de cal o de barita. La utilización de amoníaco no
30 es recomendable porque puede provocar la formación de com-

326947₂



plejos.

Como se tiene una ionización seguida de una precipitación, la reacción es inmediata y por este motivo, el producto formado no permanece durante un largo período en presencia del medio reductor. La reducción del sulfato ferroso y de la barita permite formar óxido ferroso insoluble y sulfato de barita insoluble, de modo que no queda finalmente en solución más que la hidroxocobalamina con muy pocas sales. Además, el hecho de eliminar las sales de hierro por adición de una base fuerte tiene por consecuencia que una vez en medio alcalino con pH de 9,5 a 10, no queda prácticamente sal ferrosa en solución. El poder reductor ha desaparecido pues, prácticamente, y no se corre el riesgo de estropear el producto formado.

Después de haber alcanzado un valor de pH de 7,2 a 8,0, están previstos por el invento dos modos de ejecución del procedimiento.

Según el primer modo de ejecución, la adición de la base fuerte se prosigue hasta que el pH alcanza un valor sensiblemente comprendido entre 8,5 y 9. Se provoca así la precipitación de las sales ferrosas en exceso. Se separa luego por filtración el precipitado compuesto formado por el ferrocianuro y la sal ferrosa en exceso que ha sido llevada a una zona de pH donde no es ya soluble. La dosificación del hierro en el filtrado recogido sigue siendo negativa.

Se hace burbujear luego en este filtrado un gas oxidante tal como el aire, lo que lleva el cobalto de las cobalaminas de la valencia 2 a la valencia 3 o, en otros términos, provoca la formación de hidroxocobalamina. Se

326947

20 MAY 1954



5 comprueba, por lo demás, que la solución vuelve a ser roja. Esta transformación es facilitada, si, previamente, se lleva el pH a un valor sensiblemente comprendido entre 5 y 6 por adición de un ácido en solución, tal como el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico.

10 Si se establece el espectro fotométrico de la solución obtenida y se comprueba que éste corresponde bien al de la hidroxocobalamina. La dosificación del cianuro y la del hierro, incluso por los métodos más finos, sigue siendo negativa.

La hidroxocobalamina se separa entonces de la solución por las técnicas conocidas, tales como cromatografía seguida de una cristalización. Se obtiene así hidroxocobalamina pura.

15 Según el segundo modo de ejecución del invento, habiendo sido llevada la solución de cianocobalamina con adición de sal ferrosa a un pH sensiblemente comprendido entre 7,2 y 8 por adición de la base fuerte, si procede a una primera filtración con objeto de eliminar el precipitado de ferrocianuro ferroso, se efectúa una oxidación del filtrado por burbujeo de un gas oxidante, luego se procede a una
20 segunda filtración para eliminar el precipitado de sales férricas que resulta de la oxidación precedente, después de lo cual se efectúa de manera en sí misma conocida la separación
25 de la hidroxocobalamina.

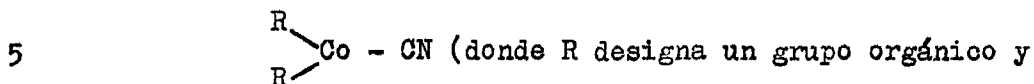
Según este modo de ejecución, es necesario llevar más a fondo la oxidación de la solución por el burbujeo del gas oxidante. Este resultado puede ser obtenido, por ejemplo, utilizando oxígeno en lugar de aire.

30 Se puede dar del procedimiento según el invento

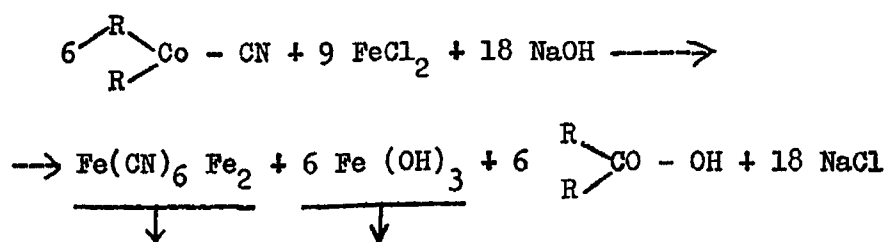


la explicación siguiente, sin que por ello el invento esté vinculado a esta explicación:

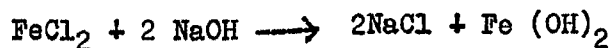
La reacción entre el cloruro ferroso FeCl_2 y la cianocobalamina representada por la fórmula:



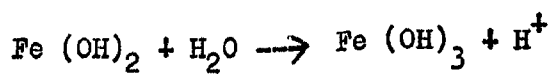
donde el cobalto es, por consiguiente, trivalente) parece responder a la reacción global siguiente:



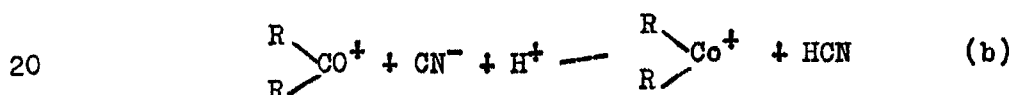
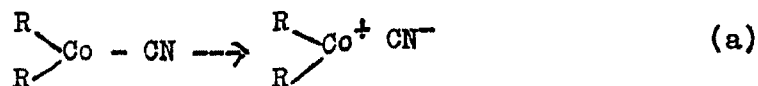
10 Esta reacción puede descomponerse en una sucesión de reacciones elementales. En presencia de sosa, el cloruro ferroso añadido a la solución inicial da hidróxido ferroso:



15 El hidróxido ferroso tiende a hidrolizarse en hidróxido férrico que precipita si el pH excede de 2,2:



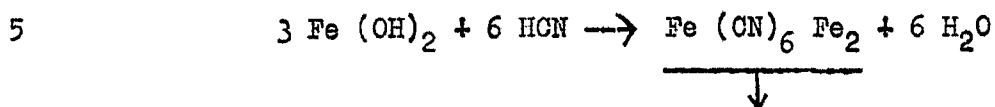
Estando así la cianocobalamina en medio reductor pasa al estado de cobalamina:



326947

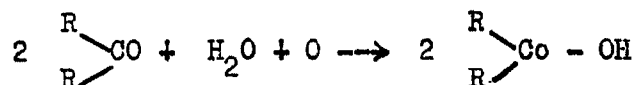


El ácido cianhídrico reacciona sobre el hidróxi-
do ferroso para dar la el ferrocianuro ferroso, complejo
muy estable que precipita a partir del pH 6,2; siendo la
precipitación total hacia el pH 7,2 o más:



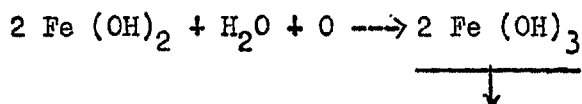
La precipitación del ferrocianuro ferroso provoca
así un desplazamiento permanente del equilibrio de reaccio-
nes (a) y (b) precedentes.

La oxidación por burbujeo del aire transforma las
cobalaminas en hidroxocobalamina:



Si por adición de sosa se eleva el pH más allá de
8,5 según la primera realización del procedimiento, se provo-
ca la precipitación del hidróxido ferroso Fe (OH)_2 , insolu-
ble en esta gama de pH.

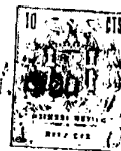
Según la segunda realización, esta precipitación
se obtiene por transformación del hidróxido ferroso en hidró-
xido férrico según la reacción:



20 El estudio de los ptenciales de oxidación-reducción
ha mostrado, por lo demás, a título de confirmación, que el
paso del pH de la solución resultante (cianocobalamina + sal
ferrosa) de un valor comprendido entre 3 y 5 a un valor su-
perior a 6,2 por adición de la base fuerte iba acompañado de
25 un paso del rH por el valor de equilibrio igual aproximada-

326947

20 MAY



7

mente a 21,5 precisamente para un pH 6,2, correspondiendo el rH a un medio oxidante para valores menores del pH y reductor para valores más elevados. Así, a pH = 4 se tiene rH = 30,3, mientras que a pH = 8,5 se tiene rH = 8,6.

5 El invento será ilustrado por los ejemplos numéricos siguientes:

Ejemplo 1: Se ponen en solución 48g de cianocobalamina en 6 litros de agua, lo que corresponde a una concentración de aproximadamente 8000 gamma/ml de cianocobalamina.

10 Se añade agitando 64 g de cloruro ferroso en estado cristalizado. Los cristales se disuelven inmediatamente y se obtiene una solución de aproximadamente 1/12 de mol por litro. El pH de la solución inicial así obtenida es de 3,4. La solución permanece roja y aparentemente no se efectúa ninguna reacción.

15 Se añade a la solución inicial una solución normal de sosa manteniendo la agitación y vigilando el pH. El valor de este último aumenta y a partir de un pH 6,2, la solución cambia de color y pasa a ser marrón (lo que corresponde al paso de las cobalaminas de la forma trivalente a la forma bivalente) y se asiste a la precipitación del ferrocianuro ferroso.

20 Se continua la adición de sosa hasta un pH 7,5. Se deja 10 minutos bajo agitación y luego se añade todavía sosa hasta un pH 8,8. Se asiste entonces a la precipitación de las sales ferrosas en exceso.

25 Se filtran de manera que se aisle el precipitado y se añade al filtrado un poco de ácido (de preferencia ácido clorhídrico o ácido sulfúrico) con objeto de llevar el pH al valor de 5,5 - 6.

326947



Se provoca luego la aireación de la solución por burbujeo de un gas oxidante tal como el aire durante 15 minutos. La solución vuelve a ponerse roja y su análisis espectral muestra que presenta las características de la hidroxocobalamina. Se añade a esta solución 80% de acetona y luego se cromatografía sobre alúmina y se eluye con acetona a 50%. El núcleo obtenido se cristaliza por adición de acetona y mantenimiento durante 24 horas a temperatura reducida (aproximadamente 5°C).

Se obtiene así 40 g de bonitos cristales cuyos espectros en medio ácido y básico corresponden al de la hidroxocobalamina pura. Además, la curva de pH hace aparecer la plataforma tampón característica de la función básica de la hidroxocobalamina entre un pH de 6,2 y 8,4.

Las pruebas de investigación del cianuro más sensibles y las de investigación del hierro permanecen negativas.

Ejemplo 2: Se disuelven 24 g de cianocobalamina en 6 litros de agua. Se añaden 50 g de sulfato ferroso hidratado, lo que corresponde sensiblemente al final de la adición a una solución de 1/40 de mol por litro. El pH de esta solución es de 4,2.

Bajo agitación, se añade una solución de potasa normal vigilando el pH. A partir de un pH 6,4-6,5, la solución cambia de color y el ferrocianuro ferroso comienza a precipitar.

Se continúa la adición de potasa hasta un pH 8 y luego se deja 10 minutos la solución bajo agitación después de lo cual se prosigue la adición de potasa hasta un pH 8,5 - 9, lo que completa la precipitación de las sales ferrosas en exceso. Se filtra y luego se lleva el pH del filtrado



a 5,5 aproximadamente y se provoca un burbujeo de aire durante 20 minutos.

La solución así tratada es cromatografiada luego sobre alúmina y luego cristalizada. Después de la separación de los cristales y secado, se obtienen 19 g de hidroxocobalamina.

Ejemplo 3: 60 g de cianocobalamina son puestos en solución en 6 litros de agua, lo que corresponde a una concentración de aproximadamente 10.000 gamma/ml.

Se añade agitando 50 g de cloruro ferroso en estado de cristales que se disuelven inmediatamente. La concentración de la solución obtenida es de aproximadamente 1/15 de mol por litro y su pH es de 3,5. La solución sigue siendo roja.

Dejando bajo agitación y vigilando el pH, se añade una solución normal de sosa. El pH vuelve a subir por encima de 6 y la solución cambia entonces de color: de rojo pasa a ser marrón. Se continúa la adición de sosa hasta un pH 7,9 y se deja 10 minutos bajo agitación. El ferrocianuro precipita.

Se filtra de manera que se elimine el precipitado de ferrocianuro y se provoca la oxidación de la solución por burbujeo de oxígeno gaseoso durante 10 minutos. Los óxidos ferrosos se transforman entonces en óxidos férricos que precipitan y las cobalaminas vuelven a pasar de la valencia 2 a la valencia 3 dando la hidroxocobalamina. Se filtra de nuevo para separar el precipitado de sales férricas y luego, a la solución obtenida, se añade acetona y se cromatografía sobre alúmina como en el ejemplo 1. El núcleo obtenido se cristaliza a un pH 9. Se obtienen así 47 g de bonitos cris-

326947



tales de hidroxocobalamina pura.

Ejemplo 4: En 60 litros de agua, 240 g de cianocobalamina se ponen en solución con 600 g de sulfato ferroso 7 H₂O; el pH obtenido es de 3,8. Bajo agitación se añade lentamente barita siguiendo el pH. Se comprueba que a un pH 8 se tiene una zona muy tamponada que corresponde a la precipitación de los óxidos ferrosos.

Después de la adición de 700 g de barita, el pH es de 9,9 - 10. Se filtra y el pH del líquido obtenido es de 9,2.

Se añade al ácido sulfúrico hasta un pH 5 y se airea.

Después de la cromatografía y cristalización, se obtienen 190 g de hidroxocobalamina pura.

Ejemplo 5: 50 g de cianocobalamina se ponen en solución en 6 litros de agua con 50 g de sulfato ferroso 7 H₂O.

Bajo agitación se añade lentamente cal siguiendo la subida de pH.

Se comprueba siempre a un pH 8 que la zona está muy tamponada, correspondiendo a la precipitación de óxido ferroso.

Se continúan añadiendo cal hasta la obtención de un pH igual a 9,9-10. Se filtra. El pH del líquido obtenido es de 9,3.

Se añade ácido sulfúrico hasta un pH 5 y se airea para reoxidar las cobalaminas.

Se vuelve a filtrar para quitar el sulfato de cal precipitado, luego se cromatografía y se cristaliza según las técnicas habituales.

Se obtienen 46 g de hidroxocobalamina.



Se comprueba así que el procedimiento perseguido por el invento permite obtener la transformación con un excelente rendimiento de la cianocobalamina en hidroxocobalamina y esto sin hacer intervenir catalizador, polvo metálico o desprendimiento gaseoso. La reacción puede ser, pues, ejecutada muy rápida y fácilmente con un material muy sencillo. Además, su rendimiento horario es elevado

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Francia con fecha 21 de mayo de 1965, bajo el número PV 17936, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1.- Procedimiento de preparación industrial de la hidroxocobalamina por reducción de la cianocobalamina en solución seguida de su oxidación, caracterizado porque la reducción se obtiene realizando una mezcla de la solución de cianocobalamina y de una sal ferrosa ionizable en solución acuosa, estando comprendido el pH de la solución resultante entre 3 y 5, añadiendo luego progresivamente a esta solución una base fuerte con objeto de llevar el pH hasta un valor superior a 6,2, lo que provoca la precipitación en estado de ferrocianuro ferroso del grupo CN de la cianocobalamina.

326947 2



2.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1 y caracterizado porque el pH de la solución inicial de la cianocobalamina y de la sal ferrosa ionizable está comprendido sensiblemente entre 3,2 y 4,5.

5 3.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1 y caracterizado porque la neutralización de la solución inicial por la base fuerte es proseguida hasta un pH sensiblemente comprendido entre 7,2 y 9.

10 4.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1 y caracterizado porque la sal ferrosa ionizable está constituida por el cloruro ferroso o el sulfato ferroso.

15 5.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1, y caracterizado porque la base fuerte utilizada está constituida por una solución de una por lo menos de las bases siguientes: sosa cáustica, potasa, barita, cal.

6.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1 y caracterizado porque la cianocobalamina se utiliza en solución acuosa a una concentración comprendida entre 2000 y 15.000 gamma/ml.

20 7.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1 y caracterizado porque la concentración de la sal ferrosa ionizable está comprendida entre 1/40 y 1/5 de mol por litro.

25 8.- Procedimiento conforme a la reivindicación 1 y caracterizado porque la adición de la base fuerte se prosigue hasta que el pH alcanza un valor sensiblemente comprendido entre 8,5 y 9 con objeto de precipitar las sales ferrosas en exceso.

30 9.- Procedimiento conforme a la reivindicación 8 y caracterizado porque se separa por filtración el precipitado de ferrocianuro y de sal ferrosa, y luego se lleva el pH

326947

20



hasta un valor sensiblemente comprendido entre 5,5 y 6 por adición de ácido, despues de lo cual se hace burbujear en la solución un gas oxidante, lo que lleva el cobalto al estado trivalente.

5 10.- Procedimiento conforme a la reivindicación 3 y caracterizado porque habiendo sido llevada la solución de origen a un pH sensiblemente comprendido entre 7,2 y 8 por adición de la base fuerte, se procede a una primera filtración con objeto de eliminar el precipitado de ferrocianuro, se efectúa una oxidación del filtrado por burbujeo de un gas oxidante, luego se procede a una segunda filtración para eliminar el precipitado de sales férricas que resultan de la oxidación precedente, después de lo cual se provoca de manera en sí misma conocida la separación de la hidroxocobalamina.

10

15

11.- Procedimiento de preparación industrial de la hidroxocobalamina por reducción de la cianocobalamina en solución seguida de su oxidación.

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

20

La presente Memoria consta de 17 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

20 MAY 1960

P.A.

Alberto de Eizaburu
Por Poderes

RM