

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

Concedida en el Registro de acuerdo
con los datos que figuran en la pre-
sente descripción y según el con-
tenido de la Memoria adjunta.
(Case RK.5)

(19) ES	(11) NÚMERO 467153	(10) A1
(21)	(22) FECHA DE PRESENTACION 21-2-78	

20 OCT. 1978

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NÚMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
7290/77	22 Febrero 1.977	Inglaterra

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D // A61K	

(54) TITULO DE LA INVENCION

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ACIDO D, 1-5-METILTETRAHIDRO-FOLICO Y SUS SALES"

(71) SOLICITANTE (S)

BIORESEARCH S.a.s. del Dr. Livio Camozzi & C.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Via Marcona, 37 MILANO (Italia)

(72) INVENTOR (ES)

Federico GENNARI

(73) TITULAR (ES)

BIORESEARCH S.a.s. del Dr. Livio Camozzi & C.

(74) REPRESENTANTE

D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.

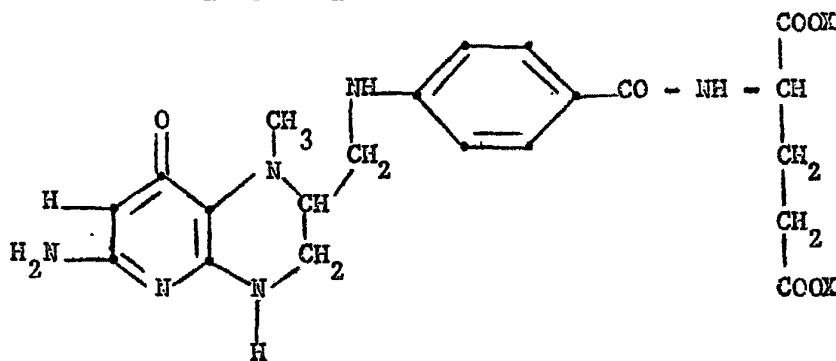
POOR
QUALITY

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento mejorado para producir ácido d,l-N-/p-(2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-5-metil-4-oxo-6-pteridinil)metil/benzoil-glutámico y sus sales de la fórmula

5

10



(I)

15

en donde X es hidrógeno, un metal alcalino o el equivalente de un metal alcalinotérreo.

En lo sucesivo el ácido (I) se denominará solo como ácido 5-metil-tetrahidrofólico (MTHF).

20

El nuevo procedimiento es aplicable industrialmente para obtener un producto de elevada pureza de forma simple, económica y con elevados rendimientos.

25

Notablemente el ácido d,l-5-metiltetrahidrofólico se prepara, comunmente, a partir de ácido fólico siguiendo un procedimiento que comprende las etapas esenciales siguientes:

30

- a) ácido fólico $\xrightarrow{\text{reducción}}$ ácido tetrahidrofólico
- b) separación y purificación del ácido tetrahidrofólico
- c) ácido tetrahidrofólico $\xrightarrow{\text{metilación}}$ ácido 5-metil-tetrahidrofólico
- d) separación y purificación del ácido 5-metiltetrahidrofólico

co.

La etapa (a) se ha llevado a cabo mediante hidrogenación catalítica y mediante reducción química, en particular utilizando borohidruros alcalinos. (Y. Hetofi y col. - Biochem. Prep. 7, 89 (1960); K.G. Seringeour y col. - Biochemistry 5, 1438 (1966)). En esta etapa, sin importar el método conocido que se utilice, se obtiene una mezcla de ácido fólico, ácido tetrahidrofólico y ácido dihidrofólico, constituida principalmente por los dos primeros componentes y de difícil resolución. Los únicos métodos útiles comprenden llevar a cabo la etapa (b) con columnas de cromatografía muy grandes y utilizando una serie de eluyentes (L. Jaenicke y col. - Z. physiol. Chem. 326, 168 (1961); J.C. Keresztesy y col. - Biochem. Biophysic Res. Commun. 5, 286 (1961); H. Rüdiger y col. FE/BS/Letters 4, 316 (1969)). El exceso de borohidruro en la solución sometida a separación cromatográfica se destruye primeramente con un ácido, de preferencia ácido clorhídrico o ácido acético.

La metilación del ácido tetrahidrofólico - (etapa c) puede llevarse a cabo también siguiendo varios métodos, de los que el mas común y conveniente comprende la reacción con formaldehido y luego reducción con un agente reductor químico, de preferencia de nuevo un borohidruro alcalino (W. Sakami y col., Biochem. Prep. 10, 103 (1963)).

La separación y purificación final del ácido 5-metiltetrahidrofólico (etapa d) se ha llevado siempre a cabo, hasta el presente, siguiendo procesos de cromatografía de mayor o menor complejidad, según determine la naturaleza de la mezcla que ha de purificarse.

En una modificación de dicho método (J.A.

Blair y col., Analytical Biochemistry 34, 376-381 (1970)), se elude la etapa (b) y la mezcla reaccional en la que se ha destruido el borohidruro en exceso se trata directamente con formaldehído y otro borohidruro alcalino. Evidentemente una modificación de esta índole no mejora sustancialmente el proceso, debido a que la etapa (a) en cualquier caso conduce a la producción de una mezcla tal como se ha expuesto anteriormente, la omisión de la etapa (b) proporciona una mezcla final que es aún mas compleja y difícil de resolver, con la consiguiente agravación de la etapa de purificación (d), y una pérdida en esta etapa de alrededor del 60% del producto.

Además no se obtiene un producto de elevada pureza tal como se requiere para utilizarse en el campo farmacéutico.

En resumen, dicho procedimiento, que es el mejor que se conoce hasta el presente, no ha ido mas allá del empleo en laboratorio y en la producción de pequeñas cantidades de sustancia para uso experimental.

Se ha descubierto ahora, sorprendentemente, y - ello forma el objeto del presente invento, que es posible transformar ácido fólico (un producto fácilmente obtenible comercialmente a precios económicamente convenientes) en el ácido d,1-5-metiltetrahidrofólico con rendimientos muy elevados y de pureza farmacéutica y sin el empleo de etapas costosas y complicadas de purificación cromatográfica, cuando el ácido fólico se reduce bajo condiciones de reacción críticas que lo hacen selectivo prácticamente al 100% en la producción de ácido tetrahidrofólico.

El procedimiento de conformidad con el presente invento comprende, esencialmente, las etapas siguientes:

reacción preferidas son las siguientes:

- pH 6,5

- temperatura 30°C

- relación de formaldehído al 37%:ácido tetrahidrofólico

5 1,4:1

- relación de NaBH_4 :ácido tetrahidrofólico incluida entre 0,5:1 y 1:1

- agente reductor presente en la mezcla reaccional: cisteína.

10 3. Separación y purificación del 5-metiltetrahidrofolato sódico. Esta etapa puede llevarse a cabo siguiendo dos alternativas igualmente ventajosas permitidas ambas por el hecho de - que la solución que ha de tratarse, obtenida en la etapa (2), prácticamente contiene solo 5-metiltetrahidrofolato sódico:

A - Separación por absorción/desorción sobre carbón activo.

15 Para llevar a cabo esta etapa una cantidad de carbón activo igual a 5-20 veces el peso del ácido fólico inicialmente tratado se convierte en una pulpa con agua y se adiciona a la mezcla reaccional final a pH de 6,5-6,8 bajo agitación.

20 El carbón filtrado se suspende en una mezcla eluyente constituida por un alcohol (conteniendo de 1 a 4 átomos de carbono) o 2-metoxi-etanol y agua en una relación comprendida entre 50/50 y 95/5. La mezcla eluyente contiene también un pequeño porcentaje (0,2 a 1,5%) de un agente reductor, y un pequeño porcentaje (0,5 a 5%) de amoníaco en solución acuosa.

25 El 5-metiltetrahidrofolato sódico puede recuperarse de la mezcla efluente filtrada del carbón mediante precipitación con un disolvente orgánico miscible en agua, o mediante la
30 concentración de la solución y liofilización, o de nuevo

en forma de una sal alcalinotérrea, de la que puede liberarse el ácido 5-metil-tetrahidrofólico.

Sobre la base anterior las condiciones preferidas para la etapa de separación y purificación según esta alternativa A son las siguientes:

5

- relación de carbón activo:ácido fólico 7:1

- mezcla eluyente constituida por etanol, metanol o 2-metoxietanol y agua en una relación de 80/20, v/v

10

- agente reductor en la mezcla reaccional: cisteina en la medida del 1% de la totalidad de mezcla eluyente

- solución de amoníaco acuosa al 34% en la medida del 2% de la totalidad de la mezcla eluyente (0,7% de amoníaco).

15

B Separación mediante precipitación directa del ácido 5-metiltetrahidrofólico de la solución que lo contiene, en forma de sales de metal alcalinotérreo, en particular como sal cálcica.

20

Esta alternativa, todavía mas simple que la alternativa A, es particularmente útil cuando las etapas (1) y (2) se han llevado a cabo en un medio acuoso concentrado y por tanto el ácido 5-metiltetrahidrofólico ha de separarse de una solución acuosa concentrada.

25

La solución resultante de la etapa (2) se trata con una solución acuosa concentrada de CaCl_2 y se deja en reposo durante unas 12 horas a una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C en presencia de una pequeña cantidad de un producto reductor.

30

El metil-tetrahidrofolato cálcico pentahidrato así precipitado se purifica mediante disolución en un pequeño volumen de agua hierviente y se recristaliza dejando la so-

lución a 0^o-5^oC.

La relación preferida ácido fólico:CaCl₂ está comprendida entre 2:1 y 3:1 y es, de preferencia, de 2,5.

5 El producto reductor se elige, de preferencia, del grupo constituido por cisteína, cisteamina, glutationa reducida, panteteina.

10 El producto obtenido con el nuevo procedimiento descrito tiene una pureza que excede del 99% y se obtiene con rendimientos que siempre superan el 80% con respecto al ácido fólico inicial.

Las etapas hasta ahora descritas se llevan a cabo en sucesión en el mismo reactor, sin la separación de productos intermediarios.

15 Las relaciones indicadas son siempre relaciones en peso.

20 Comparando el nuevo procedimiento de conformidad con el invento con el mejor procedimiento del arte conocido, cuyas etapas esenciales se resumen al principio de esta descripción, resulta inmediatamente evidente que el nuevo procedimiento permite eludir tanto la etapa intermediaria y la etapa final de separación cromatográfica y purificación. Esto no solo conduce a una simplificación considerable y economía del proceso, requiriendo los procesos conocidos columnas largas y costosas y prolongados tiempos de elaboración, sino que proporciona también un considerable aumento de los rendimientos debido a que la separación cromatográfica implica grandes pérdidas de producto útil.

30 Pérdidas adicionales se derivan de la recuperación del producto de sus soluciones muy diluidas. Esta recuperación es obviamente también muy costosa.

La etapa final de separación y purificación se sustituye por la etapa de absorción/desorción sobre carbón activo o mediante la precipitación con sales de Ca que son extremadamente simples y de elevado rendimiento. Estas etapas son completamente nuevas en la producción de ácido 5-metiltetrahydrofólico y sus sales.

A partir de la descripción que precede puede apreciarse que todo el proceso de producción para el ácido 5-metiltetrahydrofólico se lleva a cabo en presencia de gas inerte, y en algunas etapas en presencia de un agente reductor. Esto se debe a la necesidad de prevenir la auto-oxidación del ácido tetrahydrofólico o del ácido 5-metiltetrahydrofólico en los ácidos dihydrofólico y fólico correspondientes.

El mismo problema de auto-oxidación tiene lugar en la preservación del ácido 5-metil-tetrahydrofólico.

Hasta el momento presente los agentes reductores sugeridos para la conservación del ácido MTHF fueron el 2-mercaptoetanol y el ácido ascórbico. Obviamente estas sustancias dan a entender que no puede considerarse el uso industrial del producto en el campo farmacéutico y se limitó a resolver un problema de laboratorio.

A este respecto el 2-mercaptoetanol es un producto tóxico de olor nauseabundo, mientras que el ácido ascórbico se descompone rápidamente a los valores de pH óptimos (7-8) para soluciones inyectables.

Otro objeto del presente invento consiste en proporcionar composiciones estabilizadas de 5-metiltetrahydrofolatos alcalinos o alcalinotérreos para uso farmacéutico.

Las nuevas composiciones estables están constituidas, esencialmente, por 5-metiltetrahydrofolato (como substan-

cia activa) y del 5 al 50% de un compuesto orgánico de origen biológico, conteniendo, por lo menos, 1 grupo -SH (en calidad de estabilizador). Los compuestos característicos de esta -
5 glutatona reducida y todos sus derivados en la función -SH se mantiene activa.

Todas las sustancias antes citadas carecen de toxicidad, son estables a valores de pH fisiológicos y son, por consiguiente, apropiadas para la preparación de compues-
10 tos farmacéuticos líquidos o sólidos para cualquier tipo de aplicación en el campo humano.

Las nuevas composiciones farmacéuticas poseen actividad hemopoiética, actividad protectora sobre el hígado y actividad antineoplásica.

15 A continuación se ofrecen algunos ejemplos prácticos del procedimiento para ilustrar mejor y facilitar la reproducción del procedimiento de conformidad con el presente invento.

Es evidente que estos ejemplos no son limitati-
20 vos y que las condiciones reaccionales pueden variarse dentro de los límites definidos en la descripción e incorporar todos los medios bien conocidos o inmediatamente evidentes para un experto en el arte.

EJEMPLO 1.

25 Se alimentan 80 l de agua desionizada en un reactor y se suspenden 2,4 kg de ácido d,l-fólico.

Se adiciona Na_2CO_3 sólido, bajo agitación, hasta que se disuelve por completo el ácido fólico (solución final pH 7,8), luego se adicionan 4,8 kg de NaBH_4 disueltos en 40
30 l de H_2O y se calienta la mezcla reaccional a 70°C.

Se hace reaccionar la mezcla durante 1 hora bajo agitación -
mientras está constantemente bajo una corriente de nitrógeno.
Una vez terminada la reacción se enfria el reactor a 30°C y
se adiciona, bajo agitación, 3,5 kg de formaldehído acuoso al
5 37% y 2,4 kg de borohidruro sódico disuelto en 20 l de agua.
Se prosigue la reacción durante 1 hora bajo agitación de una
corriente de nitrógeno. Después de este tiempo se adiciona
0,15 kg mas de formaldehído al 37% y 1 kg de cisteína.

Se Suspenden 17 kg de carbón activo en 100 l de agua
10 desaireada y se adiciona la suspensión de carbón, bajo agita-
ción, a la mezcla reaccional, llevada a pH 6,5.

Después de unos pocos minutos se filtra bajo nitrógeno y se
lava la torta de carbón sobre el filtro con agua conteniendo
1% de cisteína hasta se han separado por completo todas las
15 sales inorgánicas. Se suspende el carbón en 100 l de una mez-
cla eluyente de la composición volumétrica siguiente:
2-metoxi-etanol 80, agua (conteniendo 5% de cisteína) 20, am-
niaco (34%) 2.

Se deja la suspensión bajo agitación durante al-
20 gunos minutos, luego se filtra y se concentra el filtrado has-
ta un volumen de 20 litros. Se vierte el filtrado concentrado
en una solución conteniendo 700 g de CaCl_2 en 100 litros de e-
tanol.

Precipita el 5-metiltetrahidrofolato cálcico y se
25 separa por filtración bajo nitrógeno, se lava con etanol y lue-
go se seca bajo vacío. Se obtienen 2,3 kg de producto, igual
a un rendimiento del 86% sobre el ácido fólico inicial.

Con el análisis de U.V. el producto muestra las característi-
cas siguientes (pH = 7; $\epsilon = 32,10^3$):
30 absorción máxima a 290 nm

absorción mínima a 245 nm

relación $E_{290}/E_{245} = 3,8$.

El análisis sobre una columna cromatográfica -
Sephadex DEAE A-25 utilizando el método de Nixon y Bertino
5 (P.F.Nixon, J.R. Bertino, Methods in Enzym. 18, 661 (1971))
solo muestra el pico de ácido 5-metiltetrahidrofólico.

El análisis de HPLC (columna Partisil-10SAZ 4,6 x 250 mm; elu-
yente citrato amónico al 5%; pH = 6) solo muestra el pico del
ácido 5-metiltetrahidrofólico. El espectro de RMN: singlete
10 característico del grupo N_5-CH_3 a $\tau = 7,5$. 1 kg del 5-metil-
tetrahidrofolato cálcico preparado de este modo, se disuelve
en 40 l de agua conteniendo 1 kg de cisteina bajo calor y ni-
trógeno.

El pH se lleva a 6 con ácido clorhídrico diluf-
15 do y se deja reposar la mezcla en un refrigerador.

Precipita el ácido 5-metiltetrahidrofólico y se
separa por filtración, se lava con un poco de agua fría y se
seca. El producto muestra un valor E_{290}/E_{245} de 3,8.

Se repitió el mismo procedimiento pero sustitui-
20 yendo el 2-metoxi-etanol en la mezcla eluyente por etanol, me-
tanol, 1 o 2-propanol, n-butanol, t-butanol, butanol secundario
e isobutanol respectivamente. En cada caso se obtuvo un pro-
ducto de las mismas características y el mismo rendimiento.

EJEMPLO 2.

25 Se prepara 5-metiltetrahidrofolato tal como se
ha descrito en el ejemplo 1. El carbón se eluye con una mez-
cla de la composición siguiente:

metanol 80, agua (conteniendo 5% de glutatona reducida) 20,
amoníaco (34%) 2.

30 Después de filtrar el carbón activo se adiciona

al eluato 700 g de CaCl_2 disuelto en un poco de agua.

Precipita el 5-metiltetrahidrofolato cálcico y se separa por filtración bajo una corriente de nitrógeno, se lava con etanol y se seca bajo vacío.

5 Se obtienen 2,1 kg de producto, igual a un rendimiento del 80% sobre el ácido fólico.

El producto tiene las mismas características que las del obtenido en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3.

10 Se repite la preparación tal como se ha descrito en el ejemplo 1 por lo que respecta al tratamiento de la torta de carbón con la mezcla eluyente constituida por 2-propanol y agua conteniendo pequeños porcentajes de hidrato amónico y cisteína, concentrándose luego el eluato filtrado hasta un vo-
15 lumen de 20 litros.

Esta solución se somete a liofilización, lo que dá 2,1 kg de 5-metiltetrahidrofolato sódico con un rendimiento del 80%. El producto muestra un valor E_{290}/E_{245} de 3,8.

EJEMPLO 4.

20 Se sigue el ejemplo 1 por lo que respecta a la concentración del eluato. En esta prueba el eluato se trata con 1,3 kg de BaCl_2 disuelto en 100 litros de etanol.

Precipita el 5-metiltetrahidrofolato de bario con un rendimiento del 83%. $E_{290}/E_{245} = 3,79$.

25 EJEMPLO 5.

Se sigue el ejemplo 1 por lo que respecta a la concentración del eluato. En esta prueba el eluato se trata con 0,6 kg de MgCl_2 disuelto en 100 litros de etanol.

30 Precipita el 5-metiltetrahidrofolato de magnesio con un rendimiento del 82%. $E_{290}/E_{245} = 3,8$.

EJEMPLO 6.

Se disuelven 100 gramos de 5-metiltetrahydrofolato, preparado como se ha descrito en el ejemplo 1, en 4 litros de H₂O.

5 A esta solución se adiciona la cantidad estequiométrica de Na₂SO₄. Se precipita CaSO₄ y se separa por filtración.

La solución límpida se somete a liofilización, lo que dá 5-metiltetrahydrofolato sódico.

10 EJEMPLO 7.

Preparación de la sal cálcica del ácido MTHF.

Se suspenden 2,50 kg de ácido fólico en 10 l de agua y se adiciona, bajo agitación, 1 litro de Na₂CO₃ al 40%.

15 Se ajusta el pH a 7,8 con Na₂CO₃ y después de enfriamiento, se adiciona, bajo atmósfera de nitrógeno, 1,700 kg de NaBH₄.

Se deja reaccionar la mezcla durante 2 horas mientras se calienta a alrededor de 70°C hasta completar la reacción; se adicionan 4,00 kg de formaldehído acuoso al 37% y luego 0,80 kg de borohidruro sódico.

20 Se filtra el borato sódico precipitado y se destruye el borohidruro en exceso ajustando el pH de la solución a 6 con HCl. Se adiciona, mientras se agita, 1 kg de CaCl₂ disuelto en 2 litros de agua y la mezcla reaccional obtenida se deja en reposo durante una noche a 3°C.

El metiltetrahydrofolato cálcico precipita en forma de un polvo blanco amorfo, que se filtra y lava con agua.

30 Esta sal se disuelve en 10 litros de agua herviente y la solución enfriada se deja reposar durante una noche.

Se filtra la sal cristalina precipitada, se lava y se seca bajo vacío.

Se obtiene 2,40 kg de metil-tetrahidrofolato cálcico pentahidrato con un rendimiento total del 80% sobre el ácido fólico de partida.

Bajo condiciones idénticas también se obtiene la sal de Mg que, no obstante, resulta de difícil filtración.

Tal como se ha indicado, el ácido de 5-metil-tetrahidrofolato o sus sales obtenidos con el presente procedimiento forman composiciones terapéuticas estables a la temperatura del ambiente cuando se mezclan con 5 a 50% de una sustancia estabilizadora elegida del grupo constituido por compuestos de origen biológico conteniendo, por lo menos, 1 grupo -SH.

Los compuestos característicos de esta clase son cisteína, cisteamina, panteteína y glutatona reducida.

Para ilustrar este aspecto del invento se ofrece a continuación una formulación típica que puede prepararse utilizando el compuesto antes citado.

EJEMPLO 8

Preparación farmacéutica en forma oral

Pastillas

Substancia activa 25 mg

Estabilizador 12,5 mg

Excipientes para compresión, cantidad necesaria hasta completar 150 mg.

PREPARACION FARMACEUTICA EN FORMA DE INYECTABLE

Compuesto activo 25 mg/cc

Estabilizador 12,5 mg/cc

Soporte de liofilización 150 mg/cc

Cuando es necesario la solución se lleva a pH 7,5 con NaOH concentrado, se envasa en un vial y se liofiliza.

La expresión "compuesto activo" significa:

- ácido 5-metiltetrahidrofólico
- 5-metiltetrahidrofolato sódico
- 5-metiltetrahidrofolato cálcico
- 5-metiltetrahidrofolato de magnesio

La expresión "estabilizador" en este ejemplo significa:

- cisteína
- cisteamina
- panteteína
- glutatona reducida

La expresión "soporte de liofilización" significa cualquier substancia que pueda caer dentro de esta definición en la tecnología de liofilización usual, tal como glicina.

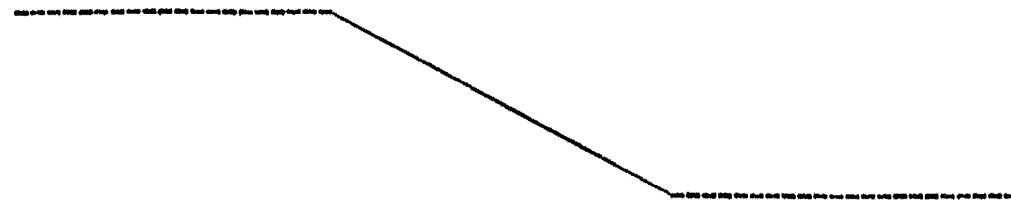
En ningún caso la solución mostró alteración alguna del producto activo durante su retención en el vial o durante la liofilización.

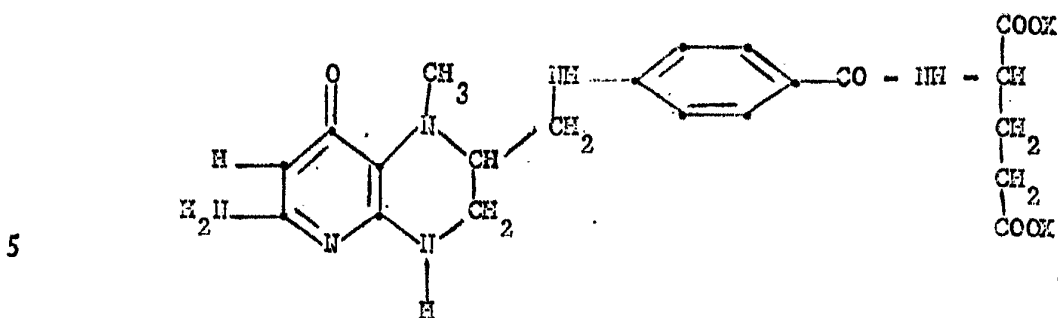
= . =

REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento mejorado para la preparación de ácido d,1-5metiltetrahidrofólico y sus sales, de la fórmula general





en donde X es hidrógeno, un metal alcalino o el equivalente -
de un metal alcalinotérreo,
10 caracterizado porque comprende las siguientes etapas de reali-
zación:

a. se reduce ácido fólico a ácido tetrahidrofólico con NaBH_4
en una solución alcalina acuosa y bajo una atmósfera de gas
inerte, utilizando una relación NaBH_4 : ácido fólico de 0,5:1
15 a 3:1, una temperatura reaccional de 60 a 80°C y un tiempo de
reacción de 30 minutos a 2 horas;

b. se metila el ácido tetrahidrofólico antes obtenido a ácido
5-metiltetrahidrofólico con soluciones acuosas de formaldehí-
do y borohidruro sódico en una atmósfera de gas inerte, utili-
20 zando una relación total de formaldehído: ácido tetrahidrofó-
lico de 0,8:1 a 2,5 : 1, una relación de NaBH_4 : ácido tetrahi-
drofólico de 0,25:1 a 1,5:1, una temperatura de 25 a 30°C y un
pH de 6 a 8, adicionándose el formaldehído en fracciones sucesi-
vas, una de las cuales, de relación de formaldehído: ácido te-
25 trahidrofólico 0,15:1, se adiciona cuando se termina la reac-
cion; y finalmente,

c. se separa el 5-metiltetrahidrofolato sódico de la solución
acuosa que lo contiene, llevándose a cabo todas las etapas ci-
tadas en sucesión en un solo reactor sin separación de produc-
30 tos intermediarios.

2.- Procedimiento, de conformidad con la rei-

vindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) de separación se lleva a cabo tratando la mezcla reaccional con una cantidad de carbón activo correspondiente a 5-20 veces en peso del ácido fólico inicialmente tratado, y desorbiendo el 5-metiltetrahydrofolato sódico del carbón mediante un eluyente constituido por un alcohol conteniendo de 1 a 4 átomos de carbono o 2-metoxi-etanol y agua en una relación de 50/50 a 95/5.

3.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (c) de separación se lleva a cabo tratando la mezcla reaccional con una solución acuosa de una sal de Ca y enfriando la solución a 0°-5°C, estando incluida la relación ácido fólico: sal de calcio entre 2:1 y 3:1.

4.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa (a) se lleva a cabo con una relación de NaBH_4 : ácido fólico de 0,7:1, 2:1, una temperatura de 70°C, un pH de 7 a 8 y un tiempo de reacción de 1 hora y la etapa (b) se lleva a cabo con una relación total de formaldehído al 37%: ácido tetrahydrofólico de 1,4:1, una relación NaBH_4 : ácido tetrahydrofólico incluida entre 0,5:1 y 1:1 una temperatura de 30°C y un pH de 6,5.

5.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la etapa (c) se lleva a cabo utilizando preferentemente una cantidad de carbón activo igual a 7 veces el peso del ácido fólico inicialmente tratado y un eluyente constituido por metanol, etanol, 2-metoxi-etanol, 1- o 2-propanol, n-butanol, t-butanol, butanol secundario o isobutanol y agua en una relación de 80/20, v/v con 1% en volumen de un agente reductor y 0,7% de amoníaco en solución acuosa.

6.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido 5-metiltetrahydrofólico se precipita de la solución acuosa mediante acidificación,

en forma de una de sus sales alcalinas o alcalinotérreas.

5 7.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido 5-metiltetrahydrofólico se obtiene como su sal sódica concentrando el eluato y liofilizando el concentrado.

8.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque opcionalmente se separa el ácido 5-metiltetrahydrofólico del eluato mediante precipitación en forma de una sal alcalinotérrea.

10 9.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la purificación del 5-metil tetrahydrofolato cálcico se lleva a cabo disolviendo la sal pentahidrato en un poco de agua hirviente y enfriando la solución a 0^o-5^oC.

15 10.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la etapa (c) se lleva a cabo en presencia de un producto reductor.

11.- Procedimiento para la preparación de ácido d,l-5-metiltetrahydrofólico y sus sales.

20 Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 19 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid a 21 FEB. 1978

p.a.

JAIMESERN
p.p.

Firmado: JOSE F. NIETO

MC.