

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 121609

Int. Cl. C 07 d 55/62 Kl. 12p-10/05
A 61 k 3/22 30h-2/20

Patentsøknad nr. 166.737 Inngitt 7.II 1967

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 22.III 1971

Prioritet begjært fra: 7.III-66 Frankrike,
nr. 52303

Jean Boige,
53, Avenue Vercingétorix, Aulnay-sous-Bois, Frankrike.

Oppfinner: Søkeren.

Fullmektig: Siv.ing. Erling Quande.

Fremgangsmåte ved fremstilling av hydroxocobalamin.

Foreliggende oppfinnelse angår en forbedret fremgangsmåte ved kontinuerlig fremstilling av hydroxocobalamin (eller vitamin B 12b) ut fra cyanocobalamin(eller vitamin B 12).

Det er kjent å fremstille hydroxocobalamin ut fra en vandig oppløsning av cyanocobalamin og av en mineralsyre etter den følgende trinnvise fremgangsmåte:

1) Hydrogenering av den sure cyanocobalaminoppløsning med hydrogen utviklet under strømming av oppløsningen gjennom en søyle fylt med granulert sink, hvorved cyanocobalaminet reduseres til cobalamin, hvor kobolten er toverdig.

2) Oxydasjon med luft av den reduserte oppløsning som strömer ut fra søylen, hvorved hydroxocobalamin dannes.

3) Fraskillelse av den oxyderte oppløsnings sinkinnhold ved utfelling med en uorganisk base og påfølgende inndampning av filtratet til tørrhet, hvorved man får urent hydroxocobalamin.

4) Rensing ved krystallisasjon fra en vandig oppløsning av det urene produkt og av et med vann blandbart oppløsningsmiddel anvendt i en slik mengde at hydroxocobalaminets oppløselighet sterkt nedsettes, eventuelt efter forutgående fraskillelse av ikke-redusert cyanocobalamin ved kromatografering.

Det anvendes en sterk syre, såsom saltsyre, bromhydrogensyre, jodhydrogensyre eller svovelsyre, oppløsningens pH-verdi holdes mellom 1,5 og 3, fortrinnsvis mellom 2 og 2,5 og sinken i søylen har en kornstørrelse fra 200 til 1400 μ , fortrinnsvis fra 500 til 800 μ . Fremgangsmåten utføres ved omgivelsenes temperatur og ved atmosfæretrykk. Så snart den behandlede oppløsning har forlatt søylen og den er fortynnet med vann, bubbles det luft eller annen oxyderende gass gjennom oppløsningen. Derefter fraskilles de oppløste sinksalter ved hjelp av en mineralsk base, såsom natronlut, ammoniakk eller bariumoxyd, hvorved sinksaltene utfelles, og hydroxocobalaminet utskilles på kjent måte fra den ovennevnte vandige oppløsning, for eksempel ved inndampning

Den hastighet med hvilken den sure cyanocobalaminoppløsning ledes over sinksøylen, reguleres fortrinnsvis således at oppløsningens pH-verdi ved utløpet fra søylen, blir ca. 6,5.

Selv om utbyttet ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåte er meget brukbart fra et kommersielt synspunkt, har imidlertid erfaringen vist at det kan variere fra den ene driftsperiode til den annen og enkelte ganger avvike ganske betydelig fra det teoretiske utbytte.

Spesielt har man konstatert at utbyttet minket når man i lengre tid benyttet den samme sinkkolonne. Det var således nødvendig å skifte ut sinkladningen efter noen operasjoner.

Man har også kunnet konstatere variasjoner i utbyttet som enkelte ganger har vært meget betydelige, med sinkens kornstørrelse og hastigheten med hvilken væsken ble ledet gjennom sinksøylen, hvilket gjør det nødvendig med en presis og omstendelig justering ved hver endring som kan påvise søylens høyde og sinkens kornstørrelse.

Ved en nærmere analyse av fenomenene har man observert at variasjonene i utbytte skyldtes adsorpsjon av de dannede cobalaminer på sinkgranulene. De således adsorberte produkter kunne gjenvinnes fullstendig bare etter grundig vasking av sinksøylen. Dessuten viste det seg at dersom disse cobalaminer forble for lenge i kontakt med sinsøylen, kunne de brytes ned og bli uegnede for om-dannelse til hydroxocobalamin. Sluttelig kunne syrens angrep på sinken forløpe uregelmessig.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse er funnet at denne adsorpsjon og de uønskede følger av denne kunne elimineres ved tilsetning av visse, med vann blandbare, organiske oppløsningsmidler til den opprinnelige cyanocobalaminoppløsning for denne ble ledet gjennom hydrogeneringssøylen. Disse oppløsningsmidler endrer adsorpsjons/desorpsjonslikevekten for cobalaminene på en slik måte at adsorpsjonen av de reduserte cobalaminer på det nærmeste opphører, hvorved hydrogeneringen kan forløpe kontinuerlig uten noen reduksjon av utbyttet av hydroxocobalamin.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse fremstilles hydroxocobalamin ved hydrogenering av en vandig oppløsning av cyanocobalamin og av en mineralsyre, idet oppløsningen ledes gjennom en søyle inneholdende granulert sink, oxyderer den erholdte oppløsning med en oxyderende gass såsom luft, og derefter feller ut oppløsningens sinkinnhold med en sterk base, hvorved man får urent hydroxocobalamin, og tilslutt renser det erholdte hydroxocobalamin ved krystallisasjon, eventuelt etter fraskillelse av ikke-reduert cyanocobalamin ved kromatografering, hvilken fremgangsmåte utmerker seg ved at den opprinnelige cyanocobalaminoppløsning, før hydrogeneringen foretas, fortynnes med et med vann blandbart oppløsningsmiddel for cobalaminene, valgt blant aceton, tetrahydrofuran, dioxan og alkanoler med 1 - 4 carbonatomer.

Fortrinnsvis bør det med vann blandbare organiske oppløsningsmiddel som anvendes, ha de egenskaper at det er meget oppløselig i vann, nedsetter cyanocobalaminoppløsningens overflatespenning og virker som oppløsningsmiddel både for cyanocobalaminet, hydroxocobalaminet, cobalaminene og spaltningsproduktene av disse sistnevnte, såsom de produkter som benevnes "gule stoffer".

Det organiske oppløsningsmiddel må anvendes i en mengde som er tilstrekkelig til å forhindre adsorpsjonen av cobalaminene på

sinken, men må ikke være for stor for ikke å redusere virkningen av syren på sinken. Erfaringen har vist at det organiske oppløsningsmiddel vanligvis bør anvendes i en mengde fra 5 til 25 volumprosent av den vandige cyanocobalaminoppløsning, idet den foretrukne mengde er ca. 10 volumprosent.

Ved en fordelaktig utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er det organiske oppløsningsmiddel det samme som det som anvendes ved den senere kromatografering for fraskillelse av det erholdte hydroxocobalamin fra uomsatt cyanocobalamin.

Det har overraskende vist seg at de ovenfor beskrevne forholdsregler i betydelig grad øket både kvalitativt og kvantitativt utbyttet ved fremgangsmåten. Man kan på grunnlag av de oppnådde resultater forklare det som skjer ved å anta at tilstedeværelsen av oppløsningsmidlet, ved at det nedsetter cyanocobalaminoppløsningens overflatespenning, forhindrer den fysikalske adsorpsjon av hydroxocobalaminet på sinken. Derved oppnår man at reaksjonen blir mer fullstendig, og at det erholdte produkt straks kan reoxyderes.

Man kan således forklare at økningen av utbyttet ved en operasjon blir av størrelsesordenen 10 - 20 prosent, hvilket forøvrig gjør omdannelsen av cyanocobalaminet til hydroxocobalamin praktisk talt kvantitativ.

Det har dessuten vist seg at den erholdte hydroxocobalaminoppløsning inneholder langt færre spaltningsprodukter, hvilket i høy grad letter de senere rensningsoperasjoner. Spaltningsproduktene som av og til forefinnes i små mengder i hydroxocobalamin, skyldes at cyanocobalaminet i redusert form er forblitt adsorbert i for lang tid på sinken. Den senere oxydasjon makter da ikke lenger å overføre cobolten fra valensen 2 til valensen 3, og det erholdes spaltningsprodukter i hvilke gruppen CN er fjernet, men hvor cobolten fortsatt foreligger i to-verdig form.

I visse tilfelle kan de adsorberte produkter nedbrytes ytterligere ved innvirkning av det nascerende hydrogen og danner da hva man kaller "gule stoffer" hvis kjemiske sammensetning er avledet fra cyanocobalaminet, men hvor der i tillegg til gruppen CN er forsvunnet visse kjeder. Den nøyaktige sammensetning av disse gule stoffer er ennå ikke bestemt, men deres spektrum er totalt forskjellig fra spektrene for cyanocobalamin og hydroxocobalamin, hvilket tilkjennegir en meget vesentlig forskjell i strukturen.

Erfaringen viser dessuten at de ovennevnte spaltningsprodukter, og spesielt de gule stoffer, praktisk talt ikke har noen verdi i terapeutisk henseende, fordi den egenskap som gjør hydroxocobalaminet nyttig, er den evne dets coboltatom har til å anta 2- og 3-verdige former, og å muliggjøre nyttige biokjemiske reaksjoner ved å gå fra den ene form til den annen.

Tilstedeværelsen av de nevnte gule stoffer i det erholdte hydroxocobalamin, og også tilstedeværelsen av andre spaltningsprodukter, elimineres praktisk talt fullstendig som følge av de forbedringer som oppnås med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

De nedenstående eksempler vil ytterligere illustrere oppfinnelsen.

Eksempel 1 (Sammenligningseksempel).

a) Over en søyle av diameter 50 mm og høyde 250 mm av granulær sink av kornstørrelse ca. 1000 μ ledes en 1/10 N saltsyre inneholdende oppløst 15 g/l cyanocobalamin med en hastighet av 1 liter pr.time.

Man følger pH-verdien av væsken som tas ut av søylen og reoxyderer straks ved gjennomledning av luft efter den tidligere kjente teknikk. pH-verdien ved utløpet fra søylen er ca. 6,5, og spektret efter reoxydering tilkjenner at overføringen av cyanocobalaminet til hydroxocobalamin er praktisk talt kvantitativ.

Efter ca. to timer har pH-verdien en tendens til å stige. Tilførselshastigheten nedsettes litt, og man konstaterer at pH-verdien påny innstiller seg på den normale verdi, men at væsken er brunere.

Efter fire timer viser spektroskopiske undersøkelser at overføringen av cyanocobalamin til hydroxocobalamin er mindre god. Det er nødvendig å stoppe driften, og vaske søylen for å fjerne spaltningsprodukter som er utfelt på sinken.

Det har således ikke vært mulig å opprettholde regelmessig drift i mer enn fire timer under gode arbeidsbetingelser. Det viser seg dessuten å være nødvendig, når sinken begynte å tilsmusses, å nedsette strømningshastigheten for å oppnå fullstendig hydrogenering, og på dette tidspunkt begynte der å dannes spaltningsprodukter som nedsatte utbyttet ved fremgangsmåten.

b) Etter grundig vasking av sinken ble prosessen fortsatt med en tilsvarende, sur oppløsning av cyanocobalamin som imidlertid var tilsatt 10 volumprosent aceton.

Oppløsningen ble tilført sinksøylen med samme hastighet, nemlig i en mengde av 1 liter pr.time. Utbyttet i begynnelsen av det foregående forsøk var praktisk talt kvantitativt.

Man fortsatte å tilføre oppløsningen til søylen. Etter fire timer ble ingen endring påvist, og man kunne fortsette hydrogeneringen uten avbrytelse i mer enn 15 timer uten at noen endring fant sted. Sinken forble ren, og hydrogeneringen kunne utføres uten hendelser av noen art. Hydrogeneringen ble stoppet, men den kunne uten vanskelighet ha vært fortsatt.

Før forsøket ble avsluttet ble gjennomledningshastigheten øket til 2 liter pr. time (dobbelt hastighet) uten tilsynelatende vanskelighet og uten at kvaliteten eller utbyttet av produktet ble endret.

Det sees således at tilsetningen av oppløsningsmidlet har gjort det mulig å utføre hydrogeneringen regelmessig i lengre tid og å oppnå større smidighet i utførelsen av operasjonene.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen muliggjør således en mer økonomisk utnyttelse av prosessen.

Eksempel 2

15 g cyanocobalamin oppløses i 3 liter av en 1/10 N saltsyre som er tilsatt 300 ml aceton. Denne oppløsning ledes over en søyle inneholdende 600 g granulær sink av kornstørrelse ca.1000 μ . Gjennomledningen av den sure oppløsning reguleres ved at pH-verdien av avløpet fra kolonnen holdes på ca.6,5.

Derefter vaskes søylen ved at der gjennom den ledes 500 ml vann. Væsken som tas ut fra søylen oppsamles i en flaske hvor der ledes inn en kontinuerlig luftstrøm for å reoxydere væsken etterhvert som den strømmer ut fra søylen. Oxydasjonen fortsettes i 10 minutter etter uttagning av det siste vaskevann. Oppløsningen er da rubinrød.

På dette stadium måles den fremstilte mengde hydroxocobalamin spektrofotometrisk, til 14,5 g.

Man nøytraliserer med 1/10 N natronlut under omrøring for å fjerne sinksaltene. Oppløsningen filtreres, kromatograferes over aluminiumoxyd og krystalliseres fra aceton.

Det erholdte hydroxocobalamin inneholder mindre enn 3 promille cyanocobalamin.

Eksempel 3

15 g vitamin B 12 oppløses i 2,5 liter 1/5 N svovelsyre. Det tilsettes 200 ml tetrahydrofuran, og væsken ledes, efter at den er blandet, over sinksøylen.

Efter reoxydasjon måles den erholdte mengde hydroxocobalamin spektrofotometrisk til 14,2 g.

Eksempel 4

10 g cyanocobalamin fortynnes i 2 liter 1/10 N saltsyre, og der tilsettes 200 ml dioxan. Oppløsningen ledes over i en sinksøyle. Efter oxydering måles den erholdte mengde hydroxocobalamin til 9,8 g.

Eksempel 5

10 g cyanocobalamin fortynnes i 2 liter 1/10 N saltsyre. Der tilsettes 400 ml ethylalkohol. Oppløsningen ledes på samme måte over en sinksøyle. Efter oxydering måles den erholdte mengde hydroxocobalamin til 9,8 g.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved kontinuerlig fremstilling av hydroxocobalamin, ved hvilken man hydrogenerer en vandig oppløsning av cyanocobalamin og av en mineralsyre, idet oppløsningen ledes gjennom en søyle inneholdende granulert sink, oxyderer den erholdte oppløsning med en oxyderende gass såsom luft, derefter feller ut oppløsningens sinkinnhold med en sterk base, hvorved man får urent hydroxocobalamin, og tilslutt renser det erholdte hydroxocobalamin ved krystallisasjon, eventuelt efter forutgående fraskillelse av ikke-reduert cyanocobalamin ved kromatografering, k a r a k t e r i s e r t v e d at den opprinnelige cyanocobalaminoppløsning, för hydrogeneringen foretas, fortynnes med et med vann blandbart oppløsningsmiddel for cobalaminene valgt blant aceton, tetrahydrofuran, dioxan og alkanoler med 1 - 4 carbonatomer.
2. Fremgangsmåte ifölge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det organiske oppløsningsmiddel anvendes i en mengde av mellom 5 og 25 volumprosent av den opprinnelige cyanocobalaminoppløsning, fortrinsvis i en mengde av 10 volumprosent av denne.
3. Fremgangsmåte ifölge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at der anvendes en opprinnelig cyanocobalaminoppløsning hvis pH-verdi er mellom 1,5 og 3, fortrinsvis mellom 2 og 2,5, för den fortynnes med det organiske oppløsningsmiddel.
4. Fremgangsmåte ifölge et av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at den fortynnede cyanocobalaminoppløsning ledes gjennom søylen med en slik hastighet at dens pH-verdi er ca. 6,5, idet den strømmer ut av hydrogeneringssøylen.

Anførte publikasjoner: -