

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144944 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Ansøgning nr. 765/78

(51) Int.Cl.³ C 07 D 475/04

(22) Indleveringsdag 21. feb. 1978

(24) Løbedag 21. feb. 1978

(41) Alm. tilgængelig 23. aug. 1978

(44) Fremlagt 12. jul. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 22. feb. 1977, 7290/77, GB

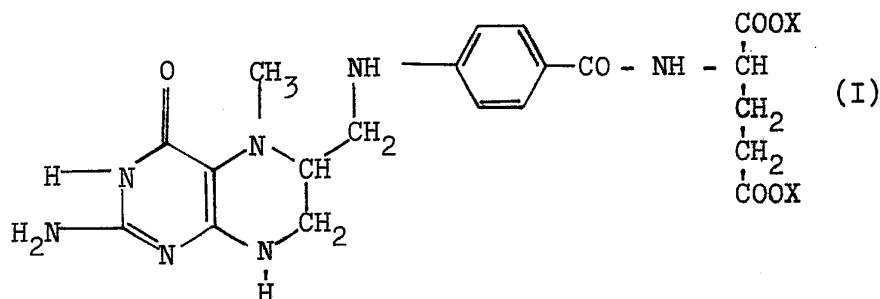
(71) Ansøger BIORESEARCH S.A.S. DEL DR. LIVIO CAMOZZI & C., Milano, IT.

(72) Opfinder Federico Gennari, IT.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling
af d,l-5-methyltetrahydrofolin=
syre eller salte deraf.

Den foreliggende opfindelse angår en forbedret fremgangsmåde til fremstilling af d,l-N-[p-(2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahydro-5-methyl-4-oxo-6-pteridiny1)methyl]-benzoyl-glutaminsyre og dennes salte med den almene formel



hvori X betyder hydrogen, et alkalimetal eller et ækvivalent af et jordalkalimetal.

I det efterfølgende vil syren (I) udelukkende blive betegnet som 5-methyltetrahydrofolinsyre (MTHF).

Den hidtil ukendte fremgangsmåde kan anvendes industrielt til opnåelse af et produkt med høj renhedsgrad på enkel og økonomisk måde og med høje udbytter.

De omhandlede forbindelser er nyttige som hæmopoietiske (bloddannende) midler, ligesom de besidder beskyttelsesvirkning over for leveren samt anti-neoplastisk virkning.

Forbindelsen d,l,-5-methyltetrahydrofolinsyre fremstilles normalt ud fra folinsyre ved en fremgangsmåde, der omfatter følgende hovedsyntesettrin:

- a) folinsyre reduktion → tetrahydrofolinsyre
- b) udskillelse og oprensning af tetrahydrofolinsyren
- c) tetrahydrofolinsyre methylering → 5-methyltetrahydrofolinsyre
- d) udskillelse og oprensning af 5-methyltetrahydrofolinsyren.

Fremstillingstrinnet (a) er blevet gennemført såvel ved katalyseret hydrogenering som ved kemisk reduktion, særligt ved anvendelse af alkalimetalborhydrid. (Y. Hetefi et al. - Biochem. Prep. 7, 89 (1960); K.G. Serimgeour et al. - Biochemistry 5, 1438 (1966)). Ved dette fremstillingstrin dannes ligegyldigt hvilken metode, der anvendes, en blanding af folinsyre, tetrahydrofolinsyre og dihydrofolinsyre bestående overvejende af de to førstnævnte komponenter. Denne blanding er vanskelig at adskille. Den eneste anvendelige metode omfatter gennemførelsen af fremstillingstrin (b) med meget store chromatograferings-søjler og under anvendelse af en serie af elueringsmidler (L. Jaenicke et al. - Z.physiol. Chem. 326, 168 (1961); J.C. Keresztesy et al. - Biochem- Biophysic Res. Commun. 5, 286 (1961); H. Rüdiger et al. FE/BS/Letters 4, 316 (1969)). Overskuddet af borhydrid i denne opløsning, der underkastes chromatografisk adskillelse, nedbrydes forinden med en syre, fortrinsvis saltsyre eller eddikesyre.

Methyleringen af tetrahydrofolinsyre (fremstillingstrin c) kan også

udføres ved forskellige metoder, af hvilke den mest bekvemme og almindelige omfatter omsætning med formaldehyd og derpå reduktion med et kemisk reduktionsmiddel, igen fortrinsvis et alkalimetallborhydrid (W. Sakami et al., Biochem.Prepar. 10, 103 (1963)).

Adskillelsen og den endelige oprensning af 5-methyltetrahydrofolinsyren (fremstillingstrin d) er indtil nu altid blevet udført ved chromatograferingsmetoder, der er mere eller mindre komplicerede, afhængigt af arten af den blanding, der skal renses.

I en udførelsesform af nævnte metode (J.A. Blair et al., Britisk patentskrift nr. 1 293 541 og nærmere beskrevet i: Analytical Biochemistry 34, 376 - 381 (1970)) undlades fremstillingstrinnet (b), og reaktionsblandingen, i hvilken overskuddet af borhydrid er blevet nedbrudt, behandles direkte med formaldehyd og et andet alkalimetallborhydrid. Det er klart, at en sådan modifikation ikke forbedrer fremgangsmåden i væsentlig grad. Dette skyldes at fremstillingstrin (a) som tidligere nævnt i alle tilfælde fører til dannelsen af en blanding, og undladelsen af fremstillingstrin (b) vil derfor føre til en slutblanding, som er endnu mere kompliceret og vanskelig at adskille i komponenter, med deraf følgende forværring af oprensningstrinnet (d) samt et tab i dette fremstillingstrin på ca. 60% af materialet.

Yderligere opnår man ikke et produkt med høj renhedsgrad, som det vil være nødvendigt for anvendelse inden for lægemiddelindustrien.

De nævnte fremgangsmåder, som er de hidtil bedst kendte, er ikke blevet bragt ud over laboratorieanvendelse samt fremstillingen af små mængder stof til eksperimentelt brug.

Man har nu uventet fundet, og dette er genstanden for den foreliggende opfindelse, at det er muligt at omdanne folinsyre (en forbindelse, der let kan erhverves kommercielt til økonomisk rimelige priser) til d,l-5-methyltetrahydrofolinsyre med meget høje udbytter og i farmaceutisk renhedsgrad og uden anvendelsen af kostbare og komplicerede chromatografiske oprensningstrin, dersom folinsyren reduceres under visse kritiske reaktionsbetingelser, som medfører praktisk talt 100 % selektivitet ved fremstillingen af tetrahydrofolinsyre.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, der er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte, omfatter i det væsentlige følgende fremstillingstrin:

1. Reduktion af folinsyre til tetrahydrofolinsyre med natriumborhydrid i en vandig, basisk opløsning og en inert atmosfære ved en temperatur på mellem 60° og 80° C.

Forholdet NaBH_4 :folinsyre ligger mellem 0,5:1 og 3:1, og reaktionstiden er på mellem 30 minutter og 2 timer.

Baseret herpå er de foretrukne reaktionsbetingelser som følger:

- forholdet NaBH_4 : folinsyre mellem 0,7:1 og 2:1
- reaktionstid 1 time
- pH 7 - 8
- temperatur 70° C.

2. Methylering af tetrahydrofolinsyre til 5-methyltetrahydrofolinsyre ved behandling med en 37 % vandig opløsning af formaldehyd og derpå med natriumborhydrid.

Ved slutningen af omsætningen tilsættes igen 37 % formaldehyd.

Ved dette fremstillingstrin er de kritiske reaktionsbetingelser som følger:

- pH 6 - 8
- temperatur 25 - 30° C
- forholdet 37 % formaldehyd : tetrahydrofolinsyre mellem 0,8:1 og 2,5:1
- forholdet NaBH_4 : tetrahydrofolinsyre mellem 0,25:1 - 1,5:1
- inert atmosfære
- nærvær af et reduktionsmiddel i det afsluttende trin (cystein, reduceret glutathion eller pantethein).

Baseret herpå er de foretrukne reaktionsbetingelser som følger:

- pH 6,5
- temperatur 30° C
- forholdet 37 % formaldehyd : tetrahydrofolinsyre 1,4:1

- forholdet NaBH_4 : tetrahydrofolinsyre imellem 0,5:1 og 1:1
- reduktionsmiddel nærværende i reaktionsblandingen: cystein.

3. Adskillelse og oprensning af natrium-5-methyltetrahydrofolat.

Dette fremstillingstrin kan gennemføres under anvendelse af to lige fordelagtige alternativer, som begge muliggøres af den kendsgerning, at den opløsning, som skal behandles, og som er fremstillet i fremstillingstrin (2), praktisk talt udelukkende indeholder natrium-5-methyltetrahydrofolat:

A - Adskillelse ved adsorption/desorption på aktivt kul.

Til gennemførelse af dette fremstillingstrin røres en portion aktivt kul svarende til 5 - 20 gange vægten af udgangs-folinsyren til en pasta med vand og tilsættes ved pH 6,5 - 6,8 til den færdige reaktionsblanding under omrøring.

Det frafiltrerede kul bringes i suspension i en elueringsmiddelblanding bestående af en alkohol (indeholdende 1 - 4 carbonatomer) eller 2-methoxy-ethanol og vand i et forhold mellem 50/50 og 95/5. Elueringsmiddelblandingen indeholder også en lille procentdel (0,2 til 1,5 %) af et reduktionsmiddel, og en lille procentdel (0,5 til 5%) ammoniak i vandig opløsning. Natrium-5-methyltetrahydrofolat kan genvindes fra eluentblandingen, som er filtreret fra kulstoffet, ved udfældning med et organisk opløsningsmiddel blandbart med vand, eller ved inddampning af opløsningen og lyofilisering, eller i form af et jordalkalimetalsalt, fra hvilket 5-methyltetrahydrofolinsyren kan frigives.

Baseret på ovenstående er de foretrukne betingelser for adskillelses- og oprensningstrinnet i henhold til alternativ A som følger:

- forholdet aktivt kul : folinsyre 7:1
- elueringsmiddelblanding bestående af ethanol, methanol eller 2-methoxyethanol og vand i et rumfangsforhold på 80/20
- reduktionsmiddel i reaktionsblandingen: cystein i en mængde af 1 % af den totale eluatblanding
- 34 % vandig ammoniakopløsning i en mængde af 2 % af den totale eluatblanding (0,7 % ammoniak).

B - Adskillelse ved direkte bundfældning af 5-methyltetrahydrofolinsyren fra den opløsning, der indeholder den, som jordalkalimetalsalt, særligt som calciumsalt.

Denne alternative fremgangsmåde, som er endnu mere enkel end alternativ A, er særlig nyttig, når fremstillingstrinnene (1) og (2) er blevet udført i koncentreret vandigt miljø, og 5-methyltetrahydrofolinsyren derfor skal udskilles fra en koncentreret, vandig opløsning.

Den ved fremstillingstrin (2) fremstillede opløsning behandles med en koncentreret, vandig opløsning af CaCl_2 , og man lader den henstå ca. 12 timer ved en temperatur mellem 0° og 5°C i nærvær af en lille mængde reduktionsmiddel.

Det således udskilte calcium-methyl-tetrahydrofolat, pentahydrat oprenses ved opløsning i et lille rumfang kogende vand og udkrystallisation ved henstand af opløsningen ved $0^\circ - 5^\circ \text{C}$.

Det foretrukne forhold folinsyre : CaCl_2 befinder sig imellem 2:1 og 3:1, fortrinsvis med værdien 2,5:1.

Reduktionsmidlet udvælges fortrinsvis blandt cystein, cysteamin, reduceret glutathion og pantethein.

Det ved den ovenfor beskrevne hidtil ukendte fremgangsmåde fremstillede produkt udviser en renhed større end 99 % og opstår med udbytter, der stedse overskrider 80 % i forhold til udgangsfolinsyren.

De hidtil beskrevne fremstillingstrin udføres efter hinanden i samme reaktionsbeholder uden adskillelse af syntese-mellemprodukterne.

De anførte forhold er stedse vægtforhold.

Ved sammenligning af den nye fremgangsmåde i henhold til opfindelsen med de bedste fremgangsmåder ifølge den kendte teknik, hvis vigtigste trin er blevet anført i begyndelsen af denne tekst, er

det umiddelbart klart, at den hidtil ukendte fremgangsmåde tillader udeladelsen af den chromatografiske adskillelse og oprensning såvel i mellemtrinnet som i sluttrinnet.

Dette fører ikke alene til betydelig forenkling og billiggørelse af fremgangsmåden, idet den kendte fremgangsmåde kræver lange og kostbare kolonner og lang bearbejdningstid; men den fører også til betydelig forøgelse i udbyttet, fordi den chromatografiske adskillelse fører til store tab af anvendeligt produkt.

Yderligere tab opstår ved genvinding af produktet fra de meget fortyndede opløsninger. Sådan genvinding er ligeledes meget kostbar. Det afsluttende adskillelses- og oprensningstrin erstattes med et adsorptions-/desorptionstrin på aktivt kul eller med bundfældning med calciumsalte, som er særdeles enkle og fører til højt udbytte. Disse trin er helt ukendte i forbindelse med fremstilling af 5-methyltetrahydrofolinsyre og salte deraf.

Af den ovenfor anførte beskrivelse fremgår det, at hele fremstillingsprocessen for 5-methyltetrahydrofolinsyre udføres i nærvær af en inert gas, og i visse fremstillingstrin i nærvær af et reduktionsmiddel. Dette skyldes nødvendigheden af at forhindre auto-oxidation af enten tetrahydrofolinsyren eller af 5-methyltetrahydrofolinsyren til de tilsvarende dihydrofolin- og folinsyrer.

I det følgende er anført nogle praktiske eksempler på fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse.

EKSEMPEL 1

80 l demineraliseret vand anbringes i en reaktionsbeholder, og 2,4 kg d,l-folinsyre suspenderes i vandet. Fast Na_2CO_3 tilsættes under omrøring, indtil folinsyren er fuldstændig opløst (pH i slutopløsningen 7,8), derpå tilsættes 4,8 kg NaBH_4 opløst i 40 l H_2O , og reaktionsblandingen opvarmes til 70° C. Blandingen omsættes gennem 1 time under omrøring og stadig overstrømning af nitrogen. Når omsætningen er afsluttet, nedkøles reaktionsbeholderen til 30° C, og der tilsættes under omrøring 3,5 kg 37 % vandig formaldehyd og 2,4 kg natriumborhydrid opløst i 20 l vand. Omsætningen fortsættes

i 1 time under omrøring under overstrømning af nitrogen. Derefter tilsættes yderligere 0,15 kg 37 % formaldehyd og 1 kg cystein.

17 kg aktivt kul bringes i suspension i 100 l afluftet vand, og aktivtkulsuspensionen tilsættes under omrøring til reaktionsblandingen, der er blevet justeret til pH 6,5. Efter nogle få minutter filtreres under nitrogen-dække, og kul-filterkagen vaskes med vand indeholdende 1 % cystein, indtil alle uorganiske salte er blevet fuldstændig fjernet. Kullet bringes i suspension i 100 l af en elueringsmiddel-blanding med følgende rumfangssammensætning:

2-methoxy-ethanol 80, vand (indeholdende 5 % cystein) 20, ammoniak (34 %) 2.

Den således dannede suspension henstår under omrøring i nogle minutter, filtreres derpå, og filtratet inddampes til et volumen på 20 liter.

Det inddampede filtrat hældes i en opløsning indeholdende 700 g CaCl_2 i 100 l ethanol.

Calcium-5-methyltetrahydrofolat bundfældes og frafiltreres under nitrogen-dække, vaskes med ethanol og tørres derpå under vakuum.

Der indvindes 2,3 kg slutprodukt svarende til et udbytte på 86 % beregnet på udgangs-folinsyren.

Ved UV-analyse viste produktet følgende karakteristika:

(pH = 7; $\zeta = 32 \cdot 10^3$):

maksimum absorption ved 290 nm

minimum absorption ved 245 nm

forholdet $E_{290}/E_{245} = 3,8$.

Analyse på en "Sephadex[®] DEAE A-25" chromatografisk kolonne under anvendelse af Nixon og Bertino's metode (P.F. Nixon, J. R. Bertino, Methods in Enzym. 18, 661 (1971)) viste kun udslag for 5-methyltetrahydrofolinsyre.

HPLC-analyse ("Partisil"-10SAX 4,6 x 250 mm kolonne, elueringsmiddel 5% ammoniumcitrat; pH = 6) viste kun udslag for 5-methyltetrahydrofolinsyren.

NMR-spektrum: Enkeltbånd karakteristisk for N_5-CH_3 -gruppen ved $\delta = 7,5$.

1 kg calcium-5-methyltetrahydrofolat fremstillet på denne måde opløstes i 40 l vand indeholdende 1 kg cystein under opvarmning og nitrogen-dække.

pH blev justeret til 6 med fortyndet saltsyre, og blandingen fik lov at henstå i et køleskab.

5-Methyltetrahydrofolinsyre bundfældes og frafiltreres, vaskes med lidt koldt vand og tørres. Et således fremstillet produkt viste en værdi for forholdet E_{290}/E_{245} på 3,8.

Den samme fremgangsmåde blev gentaget, idet man dog erstattede 2-methoxyethanol i elueringsmiddelblandingen med henholdsvis ethanol, methanol, 1 eller 2-propanol, n-butanol, tert.-butanol, sek.-butanol og isobutanol. I hvert af tilfældene blev fremstillet et produkt med samme karakteristika og samme udbytte.

EKSEMPEL 2

Natrium-5-methyltetrahydrofolat fremstilles som beskrevet i eksempel 1. Kullet elueres med en blanding med følgende sammensætning: methanol 80, vand (indeholdende 5% reduceret glutathion) 20, ammoniak (34%) 2.

Efter frafiltrering af aktivkullet blev 700 g $CaCl_2$ opløst i lidt vand sat til eluatet.

Calcium-5-methyltetrahydrofolat bundfældes og frafiltreres under nitrogen-dække, vaskes med ethanol og tørres under vacuum.

2,1 kg slutprodukt udvindes, svarende til et udbytte på 80% beregnet på folinsyre.

Produktet udviser samme karakteristika, som det i eksempel 1 fremstillede.

EKSEMPEL 3

Fremgangsmåden gentages analogt med eksempel 1 op til behandlingen af aktiv kul-filterkagen med elueringsmiddel-blandingen bestående af 2-propanol og vand indeholdende små procentdele ammoniumhydroxid og cystein, hvorpå det filtrerede inddampes til et volumen på 20 liter.

Denne opløsning udsættes for lyofilisering, hvilket fører til 2,1 kg natrium-5-methyltetrahydrofolat med et udbytte på 80%.

Produktet viste en værdi for E_{290}/E_{245} på 3,8.

EKSEMPEL 4

Der gås frem analogt med eksempel 1 op til inddampningen af eluatet.

Ved denne afprøvning behandles eluatet med 1,3 kg $BaCl_2$ opløst i 100 liter ethanol.

Barium-5-methyltetrahydrofolat bundfældes med et udbytte på 83%. $E_{290}/E_{245} = 3,79$.

EKSEMPEL 5

Der gås frem analogt med eksempel 1 indtil inddampning af eluatet.

I denne afprøvning behandles eluatet med 0,6 kg $MgCl_2$ opløst i 100 liter ethanol.

Magnesium-5-methyltetrahydrofolat bundfældes med et udbytte på 82%.

$$E_{290}/E_{245} = 3,8.$$

EKSEMPEL 6

100 g calcium-5-methyltetrahydrofolat fremstillet som beskrevet i eksempel 1 opløses i 4 liter H_2O .

Den støkiometriske mængde Na_2SO_4 sættes til denne opløsning.

$CaSO_4$ bundfældes og frafiltreres.

Den klare opløsning underkastes lyofilisering, hvilket fører til natrium-5-methyltetrahydrofolat.

EKSEMPEL 7

Fremstilling af MTHF-syrens calciumsalt.

2,50 kg folinsyre bringes i suspension i 10 l vand og 1 l 40%'ig Na_2CO_3 tilsættes under omrøring.

pH justeres til 7,8 med $NaCO_3$, hvorpå der, efter afkøling, tilsættes 1,700 kg $NaBH_4$ under nitrogen-dække.

Man lader blandingen henstå til reaktion gennem 2 timer under opvarmning til ca. $70^\circ C$ til fuldendelse af omsætningen; 4,00 kg 37%'ig vandig formaldehyd tilsættes, og derpå 0,80 kg natriumborhydrid.

Det udfældede natriumborat frafiltreres, og overskuddet af borhydridet nedbrydes ved justering af opløsningens pH til 6 med HCl.

1 kg $CaCl_2$ opløst i 2 l vand tilsættes under omrøring, og den derved fremstillede reaktionsblanding efterlades ved $3^\circ C$ natten over.

Calcium-methyltetrahydrofolat udfælder som et amorft, hvidt pulver, der frafiltreres og vaskes med vand.

Dette salt opløses i 10 l kogende vand, og den nedkølede opløsning henstår i ro natten over.

Det udfældede krystallinske salt frafiltreres, vaskes og tørres under vacuum.

2,40 kg calcium-methyltetrahydrofolat, pentahydrat blev udvundet med et totalt udbytte på 80% beregnet på udgangs-folinsyren.

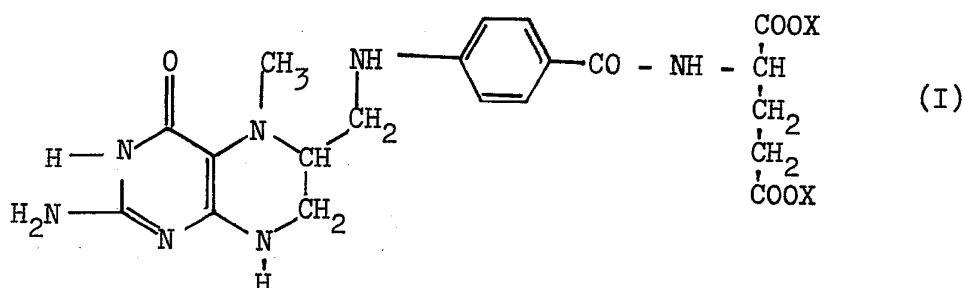
Under identiske reaktionsbetingelser blev der ligeledes fremstillet Mg-salt, som imidlertid er vanskeligt at filtrere.

5-Methyltetrahydrofolinsyre og salte deraf fremstillet ved den foreliggende fremgangsmåde kan danne stabile, terapeutiske blandinger ved stuetemperatur, dersom de blandes med fra 5 til 50% af en stabiliserende forbindelse udvalgt fra gruppen bestående af forbindelser af biologisk oprindelse indeholdende mindst én -SH-gruppe.

Karakteristiske forbindelser af denne type er cystein, cysteamin, pantethein og reduceret glutathion.

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af d,l-5-methyl-tetrahydrofolinsyre eller dennes salte med den almene formel



hvori X betyder et hydrogenatom, et alkalimetallatom eller en ækvivalent af et jordalkalimetall, k e n d e t e g n e t ved, at

a) folinsyre reduceres til tetrahydrofolinsyre med NaBH_4 i en vandig opløsning med en pH-værdi på 7 - 8 og under en inert atmosfære ved en reaktionstemperatur på 60 - 80° C og en reaktionstid på fra 30 minutter til 2 timer og under anvendelse af et vægtforhold NaBH_4 : folinsyre på fra 0,5:1 til 3:1;

b) den dannede tetrahydrofolinsyre methyleres til 5-methyltetrahydrofolinsyre med formaldehyd og natriumborhydrid i vandig opløsning i en inert atmosfære ved en temperatur på 25 - 30° C og en pH-værdi på 6 - 8 under anvendelse af et totalvægtforhold imellem 37% - vandig formaldehyd og tetrahydrofolinsyre på 0,8:1 til 2,5:1 og et vægtforhold imellem NaBH_4 og tetrahydrofolinsyre på fra 0,25:1 til 1,5:1, idet formaldehydet tilsættes i på hinanden følgende fraktioner hvoraf den sidste fraktion har et vægtforhold imellem formaldehyd og tetrahydrofolinsyre på 0,15:1 og tilsættes i nærvær af et reduktionsmiddel, og

c) det dannede natrium-5-methyltetrahydrofolat, subsidiært jordalkalimetallsaltet eller den frie syre, udskilles fra den vandige opløsning, hvori det befinder sig, idet samtlige fremstillingstrin udføres efter hinanden i en enkelt reaktionsbeholder uden isolering af syntesemellemprodukterne.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det afsluttende isoleringstrin (c) gennemføres ved behandling af reaktionsblandingen med aktivkul i en mængde svarende til 5-20 gange vægtmængden af udgangs-folinsyren og efterfølgende desorption af natrium-5-methyltetrahydrofolat fra kullet med et elueringsmiddel bestående af en alkohol med 1-4 carbonatomer eller 2-methoxyethanol og vand i forholdet 50/50 - 95/5.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det afsluttende isoleringstrin (c) gennemføres ved behandling af reaktionsblandingen med en vandig opløsning af et calciumsalt og nedkøling af opløsningen til 0-5°C, idet forholdet folinsyre: anvendt calciumsalt befinder sig mellem 2:1 og 3:1.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det indledende reduktionstrin (a) gennemføres under anvendelse af et NaBH_4 :folinsyre-forhold på fra 0,7:1 til 2:1, ved en temperatur på 70°C, pH 7-8 og en reaktionstid på 1 time, samt ved, at methyleringstrinnet (b) gennemføres under anvendelse af et totalforhold 37%-formaldehyd:tetrahydrofolinsyre på 1,4:1, et forhold NaBH_4 :tetrahydrofolinsyre på mellem 0,5:1 og 1:1, ved en temperatur på 30°C og ved pH 6,5.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at det afsluttende isoleringstrin (c) gennemføres under anvendelse af en aktivkul-mængde på syv gange vægten af udgangs-folinsyren og af et elueringsmiddel bestående af methanol, ethanol, 2-methoxyethanol, 1- eller 2-propanol, n-butanol, tert.-butanol, sec.-butanol eller isobutanol og vand i rumfangsforholdet 80:20 med 1 volumenprocent reduktionsmiddel og 0,7% ammoniak i vandig opløsning.

Fremdragne publikationer:

GB patent nr. 1293541.