

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 80 09005

⑤4 Nouveau procédé d'obtention de l'hydroxocobalamine.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl. ³). C 07 H 23/00.

⑫ Date de dépôt..... 22 avril 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④1 Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 43 du 23-10-1981.

⑦1 Déposant : BOUCHARA Emile, résidant en France.

⑦2 Invention de : Emile Bouchara.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

⑦4 Mandataire : J. F. Burtin,
5 *bis*, rue Parmentier, 92200 Neuilly-sur-Seine.

- 1 -

NOUVEAU PROCEDE D'OBTENTION DE L'HYDROXOCOBALAMINE

Docteur Emile BOUCHARA

La présente invention a pour objet un nouveau procédé d'obtention de l'hydroxocobalamine à partir de la cyanocobalamine. Ce nouveau procédé permet d'obtenir l'hydroxocobalamine sous une forme sensiblement plus purifiée que par les procédés antérieurs, de telle sorte que le produit en résultant satisfait aisément aux normes de pureté les plus sévères instituées par les diverses pharmacopées françaises et étrangères.

Le procédé selon l'invention consiste essentiellement en ce que l'on transforme la cyanocobalamine en sulfitocobalamine que l'on n'isole pas et que l'on convertit en hydroxocobalamine par oxydation à l'aide d'iode en présence d'un accepteur de protons.

La phase d'oxydation est la phase essentielle du procédé. Elle permet l'élimination de l'anion sulfite sous forme oxydée et la transformation de la sulfitocobalamine (III) en hydroxocobalamine (III). L'oxydant utilisé est l'iode en solution alcoolique ou en solution aqueuse dans l'iodure de potassium.

La production d'hydroxocobalamine par fermentation à partir de cultures de micro-organismes, présente des difficultés inhérentes à l'isolement de la substance du milieu de fermentation. Il est donc préférable de produire d'abord la cyanocobalamine et ensuite de la transformer en hydroxocobalamine.

Les procédés usuels de fabrication de l'hydroxocobalamine font appel soit à la photochimie, soit à la réduction, soit à la sulfitation de la cyanocobalamine.

Les rendements quantiques de la réaction photochimique ne sont pas excellents ; l'adaptation à la production industrielle n'est pas aisée et, de plus, il existe des risques certains de dégradation de la molécule.

Les procédés par réduction conduisent à des rendements relativement faibles avec une dégradation partielle indésirable.

.../...

- 2 -

La conversion de la cyanocobalamine en hydroxocobalamine par sulfitation puis conversion en nitrito et traitement à l'acide sulfamique ou à l'urée conduit aussi à la formation de produits indésirables, ce qui nécessite une purification ultérieure sur résine de cellulose.

De plus, dans tous ces procédés, on opère à des concentrations faibles voisines de 1 pour cent, ce qui nécessite de gros volumes de solvant.

Le procédé selon l'invention permet d'obtenir l'hydroxocobalamine à partir de cyanocobalamine en procédant dans une première étape à la conversion de la cyanocobalamine en sulfitocobalamine selon une technique améliorée, puis en transformant la sulfitocobalamine sans isolement ou purification supplémentaire par action d'iode. Toutes ces réactions sont conduites à la température ordinaire.

Le procédé selon l'invention peut encore inclure les modes opératoires suivants, actuellement préférés :

- 1°) La formation de sulfitocobalamine est effectuée par action d'un metabisulfite de métal alcalin sur une suspension aqueuse de cyanocobalamine.
- 2°) La formation de sulfitocobalamine est effectuée sous barbotage d'un fort courant d'air.
- 3°) La formation de sulfitocobalamine est effectuée en maintenant le pH réactionnel entre 3,1 et 3,3.
- 4°) L'oxydation de la sulfitocobalamine en hydroxocobalamine est effectuée sur la solution réactionnelle, sans isolement préalable.
- 5°) L'oxydation est effectuée à un pH voisin de 3,5.
- 6°) L'oxydation est effectuée avec la quantité juste calculée d'iode en solution alcoolique ou aqueuse.
- 7°) L'isolement de l'hydroxocobalamine s'effectue par fixation sur une colonne échangeuse d'ions puis élution par un acide minéral.
- 8°) L'élution s'effectue à l'aide d'un acide minéral dans un solvant polaire oxygéné.
- 9°) La transformation de l'hydroxocobalamine en sel et notamment en acétate d'hydroxocobalamine est effectuée par neutralisation au moyen d'ammoniaque puis addition d'un acide comme l'acide acétique à l'éluat d'hydroxocobalamine.

.../...

PARTIE EXPERIMENTALEa) Sulfitation

Dans un réacteur de 20 litres muni d'une agitation et d'une électrode pH-métrique, on verse 12 litres d'eau distillée et 600 cm³ d'acide acétique. On introduit 600 g de cyanocobalamine puis 600 g de métabisulfite de potassium et commence le barbotage d'air comprimé. Les gaz effluents sont envoyés dans un barboteur à soude. Dès que le pH atteint 3,3, on le ramène à 3,1 par addition d'acide chlorhydrique N. On enregistre le spectre U.V. au bout de 6 heures : il montre les absorptions caractéristiques de la sulfitocobalamine avec les rapports suivants :

$$\begin{aligned} 365 \text{ nm}/276 \text{ nm} &= 0,720 \pm 0,1 \\ 365 \text{ nm}/311 \text{ nm} &= 0,99 \pm 0,01 \\ 276 \text{ nm}/242 \text{ nm} &= 1,42 \pm 0,02 \end{aligned}$$

b) Traitement à l'iode

Dans le même récipient, on supprime le barbotage d'air, puis on installe un dispositif d'agitation mécanique, une deuxième ampoule à introduire et une sonde à potentiel. Dans la première ampoule, vidée du contenu d'acide chlorhydrique, on place une solution de soude 2N ; dans la deuxième ampoule on met : - soit une solution d'iode à 15 % dans l'éthanol, - soit une dissolution d'iode à 20 % dans une solution aqueuse équimoléculaire d'iodure de potassium.

On coule simultanément la solution de soude et la solution d'iode de manière à maintenir le pH à 3,5 et à amener le potentiel de la solution à + 3,5 mV. Le bisulfite de potassium en excès étant oxydé, on ajoute alors la quantité suffisante d'iode pour transformer la sulfitocobalamine en hydroxocobalamine (soit environ 700 cm³ de solution aqueuse) et laisse 16 heures sous agitation. Le pH atteint alors 2 - 2,5. L'hydroxocobalamine est partiellement précipitée. On ramène le pH à 3,5, filtre et envoie la solution sur une colonne de résine échangeuse d'ions polycarboxylique faiblement acide AMBERLITE CG 50. Le précipité est épuisé peu à peu avec de l'eau distillée et de l'alcool et les solutions obtenues envoyées sur la colonne. La colonne est lavée à l'eau distillée et à l'alcool jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de traces de composés minéraux dans les liquides de lavage. L'hydroxocobalamine fixée est désorbée par un mélange dioxanne-acide chlorhydrique 0,1 N (60 - 40).

.../...

- 4 -

c) Isolement de l'acétate

L'éluat est neutralisé (pH 7) avec de l'ammoniaque concentrée et ramené à pH 4,8 avec de l'acide acétique. On ajoute trois volumes d'acétone (elle-même amenée à pH 4,8 avec de l'acide acétique) et laisse cristalliser quelques heures.

Après essorage et séchage, on isole 600 à 650 g d'acétate d'hydroxocobalamine ayant un titre spectrophotométrique supérieur à 98 %, une teneur en acides rouges voisine de 1,5 pour cent et une teneur en cyanocobalamine inférieure à 0,6 pour cent.

RE V E N D I C A T I O N S

1. Nouveau procédé de préparation d'hydroxocobalamine à partir de cyanocobalamine puis de sulfitocobalamine caractérisé en ce que l'on transforme la sulfitocobalamine non isolée en hydroxocobalamine par action d'iode en présence d'un accepteur de protons.
2. Un procédé selon la revendication 1 dans lequel l'iode est utilisé en solution aqueuse dans l'iodure de potassium ou en solution éthanolique.
3. Un procédé selon la revendication 1 dans lequel l'accepteur de protons est un hydroxide de métal alcalin.
4. Un procédé selon la revendication 1 dans lequel le pH réactionnel est voisin de 3,5.
5. Un procédé selon la revendication 1 dans lequel l'isolement de l'hydroxocobalamine s'effectue par fixation sur une colonne échangeuse d'ions puis élution à l'aide d'un acide minéral dans un solvant polaire oxygéné.
6. Un procédé selon la revendication 1 dans lequel l'hydroxocobalamine est transformée en sel par addition d'acide sur l'éluat neutralisé.