


 Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
 Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11)

646 716

(21) Gesuchsnummer: 7623/81

 (73) Inhaber:
 Nippon Oil Company, Ltd., Minato-ku/Tokyo
 (JP)

(22) Anmeldungsdatum: 27.11.1981

 (72) Erfinder:
 Kinoshita, Tatsuo, Kawasaki-shi/Kanagawa-ken
 (JP)
 Kojima, Ichiro, Yokosuka-shi/Kanagawa-ken
 (JP)
 Maruhashi, Kenji, Yokohama-shi/Kanagawa-ken
 (JP)
 Oguchi, Yutaka, Setagaya-ku/Tokyo (JP)
 Endoh, Noboru, Ohta-ku/Tokyo (JP)
 Satoh, Tetsuo, Yokohama-shi/Kanagawa-ken
 (JP)

 (30) Priorität(en): 29.11.1980 JP 55-167374
 29.11.1980 JP 55-167375

(24) Patent erteilt: 14.12.1984

 (45) Patentschrift
 veröffentlicht: 14.12.1984

 (74) Vertreter:
 Bovard AG, Bern 25

 (54) Verfahren zur Gewinnung von Vitamin B₁₂ in reiner Form.

 (57) Eine Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltende Flüssigkeit wird mit einem Adsorptionsmittel in Form eines teilchenförmigen Harzes in Berührung gebracht. Als teilchenförmiges Harz wird ein Copolymer aus entweder Divinylbenzol und Styrol mit einem hauptsächlich vorkommenden Porendurchmesser von mindestens 200 Å und einem Gesamt-Porenvolumen von mehr als 0,6 ml/g, oder aus Divinylbenzol, mindestens einem gegebenenfalls substituierten Styrol und mindestens einem ungesättigten Alkylester einer aromatischen Polycarbonsäure der Formel (COOR)_n, worin R einen ungesättigten Alkylrest mit 3-10C-Atomen und einer C=C-Doppelbindung und n 2 oder 3 bedeuten, das eine Oberfläche von mindestens 700 m²/g aufweist, oder ein Gemisch dieser beiden Harze verwendet. Das durch den Berührungskontakt der Flüssigkeit mit dem teilchenförmigen Harz bzw. Harzgemisch am Harz adsorbierte Vitamin B₁₂ wird mittels eines Eluierungsmittels aus dem Harz eluiert und das erhaltene aktive Eluat wird gesammelt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung von Vitamin B₁₂ in reiner Form, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltende Flüssigkeit mit einem Harz in Form eines Copolymers aus entweder

A) Divinylbenzol und Styrol mit einem am häufigsten vorkommenden Porendurchmesser von mindestens 200 Å und einem Gesamt-Porenvolumen von mehr als 0,6 ml/g, wobei das Copolymer A) eine gleichmässige makroretikuläre Struktur aufweist, oder aus

B) Divinylbenzol, mindestens einem gegebenenfalls substituierten Styrol und mindestens einem ungesättigten Alkyl-ester einer aromatischen Polycarbonsäure der Formel



worin R ein ungesättigter Alkylrest mit 3–10 C-Atomen und einer C = C-Doppelbindung und n 2 oder 3 bedeuten, wobei das Copolymer B) eine Oberfläche von mindestens 700 m²/g aufweist,

oder in Form eines Gemisches dieser beider Copolymere in Berührung bringt, um Vitamin B₁₂ am Harz zu adsorbieren, und dass man dann das adsorbierte Vitamin B₁₂ mittels eines Eluierungsmittels eluiert und das aktive Eluat sammelt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die mit dem Harz in Berührung gebrachte, Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltende Flüssigkeit einen pH-Wert von 5–8 aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Eluierungsmittel eine wässrige Lösung verwendet, die einen niederen aliphatischen Alkohol, eine Säure, ein Alkali oder ein Salz enthält.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist das im Patentanspruch 1 definierte Verfahren zur Gewinnung von Vitamin B₁₂ in reiner Form.

Das erfindungsgemässe Verfahren eignet sich beispielsweise für die Behandlung von Vitamin B₁₂ enthaltenden Flüssigkeiten, die nach einer Fermentationsmethode oder nach einer cellulären Extraktionsmethode erhalten wurden und führt bei hoher Gewinnungsrate mit hoher Ausbeute von mehr als 98% und oft von 100% zu Vitamin B₁₂ hoher Reinheit durch eine einfache und leicht ausführbare Adsorptions- und Elutionsbehandlung mittels einfacher Apparatur und ohne die Notwendigkeit irgend welcher zusätzlicher Behandlung, wie zusätzlicher Reinigung oder Vorreinigung, wobei befriedigend schnelle Adsorptions- und Elutionsraten bei guter Beständigkeit des Adsorptionsmittels erhalten werden.

Es ist bekannt, Vitamin B₁₂ aus einer Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltenden Flüssigkeit zu gewinnen durch eine Adsorptions/Elutions-Behandlung unter Verwendung von Adsorbentien, wie Aktivkohle, aktiviertes Aluminiumoxid «Sephadex» und Ionenaustauscherharzen. Derartige Methoden haben sich jedoch für den industriellen Einsatz als unbefriedigend erwiesen, da der Mengenanteil an das Adsorptionsmittel adsorbiertem Vitamin B₁₂ gering und die selektive Adsorptionsfähigkeit der Adsorptionsmittel niedrig ist. Ausserdem ist das Ausmass der Reinigung von Vitamin B₁₂ in der aktiven Fraktion gering und bei Einsatz eines zusätzlichen Reinigungsmittels ist es immer noch schwierig, Vitamin B₁₂ in einer befriedigenden Reinheit zu erhalten. Zudem hat eine Reinigungsmethode, die eine Kombination

von mehreren Behandlungsstufen umfasst, den Nachteil, dass während der Reinigungsbehandlung der Verlust an Vitamin B₁₂ ansteigt. Auch ist die physikalische Festigkeit der in solchen Methoden verwendeten Adsorptionsmittel gering. Bei Wiederholung der Adsorptions/Elution-Behandlung kann es zu einer Verstopfung der Adsorptionsmittel kommen und die erwünschte Durchflussrate kann dann nicht mehr eingehalten werden.

Im Bestreben, diese Nachteile zu beheben, wurden Methoden zur Reinigung von rohem Vitamin B₁₂ unter Verwendung von Styrol/Vinylbenzol-Harzen vom Type der «Amberlite» XAD-Reihe von Rohm & Haas Co., ausprobiert, wobei sich jedoch die Verwendung von Harzen dieser Sorte ebenfalls als unbefriedigend erwiesen hat.

Versuche haben gezeigt, dass die Harze der «Amberlite» XAD-Reihe einen am häufigsten vorkommenden Porendurchmesser von 50–100 Å und ein Gesamt-Porenvolumen von 0,3–0,6 ml/g aufweisen, deren Adsorptionsfähigkeit für Vitamin B₁₂ jedoch nicht befriedigend hoch ist und dass dieser Nachteil noch deutlicher zum Vorschein kommt bei Vitamin B₁₂ enthaltenden Flüssigkeiten, die einen relativ grossen Mengenanteil Verunreinigungen enthalten, wie Vitamin B₁₂ enthaltende Flüssigkeiten, die nach einer Fermentationsmethode oder nach einer cellulären Extraktionsmethode hergestellt wurden, und eine beträchtlich verminderte Adsorptionskraft für diese rohes Vitamin B₁₂ enthaltenden Flüssigkeiten aufweisen, und dass diese Harze nicht ionogene Adsorptionsharze hoher Porosität darstellen, die sich aus einer Oberfläche von etwa 700 m²/g ergibt, wobei jedoch die adsorbierende Oberfläche der Harze aus hydrophoben oder nicht polaren Molekülen aufgebaut ist, so dass wahrscheinlich nur die hydrophoben Teile von Vitamin B₁₂, das in seiner molekularen Struktur sowohl einen hydrophoben wie auch einen hydrophilen Teil aufweist, an der Adsorption teilnehmen, wodurch der vorstehend genannte Nachteil der verminderten Adsorptionsfähigkeit beträchtlich schwierig zu beheben ist.

Es wurde gefunden, dass nach dem erfindungsgemässen Verfahren Vitamin B₁₂ hoher Reinheit mit hoher Ausbeute von mehr als 98% und oft sogar 100% auf einfache Art und unter Verwendung einfacher Einrichtungen mit befriedigenden Durchlaufgeschwindigkeiten in industriellem Massstab und ohne jegliche zusätzliche oder vorgängige Reinigungsbehandlung gewonnen werden kann, wobei die verwendeten Adsorptionsmittel hohe Beständigkeit aufweisen und die Behandlung oft und ohne Verstopfen der Adsorptionsmittel in bis zu 100 Zyklen wiederholt werden kann.

Das im erfindungsgemässen Verfahren als Adsorptionsmittel verwendete Harz A) weist eine gleichmässige makroretikuläre Struktur auf und ist höchst porös, wobei die Adsorptionsfähigkeit für Vitamin B₁₂ um das 2–4fache grösser ist als diejenige der bisher als Adsorptionsmittel verwendeten, nicht ionogenen Harze, wie beispielsweise «Amberlite» XAD-2.

Der am meisten vorkommende Porendurchmesser von mindestens 200 Å, vorzugsweise mindestens 250 Å, kann beispielsweise im Bereich von 200–1200 Å, vorzugsweise 250–1200 Å liegen und das Gesamt-Porenvolumen von mehr als 0,6 ml/g kann bis zu 1,2 ml/g betragen und liegt vorzugsweise im Bereich von 0,68–1,2 ml/g.

Zusätzlich zu den vorstehenden Parametern soll das Harz A) zweckmässig die Anforderungen erfüllen, dass die Poren eines Durchmessers von mindestens 200 Å ein Porenvolumen von mindestens 0,1 ml/g, vorzugsweise von 0,2–1,0 ml/g aufweisen.

Das im erfindungsgemässen Verfahren verwendete Harz B) besitzt eine Oberfläche von mindestens 700 m²/g. Während konventionelle Harze der «Amberlite» XAD-Reihe keine polare Oberfläche aufweisen, zeigt das Harz B) eine

mässig polare, aus dem ungesättigten Alkylester der aromatischen Polycarbonsäure abgeleitete Oberfläche. Das Harz B) zeigt eine 4–6fache stärkere Adsorptionsfähigkeit für Vitamin B₁₂ als die konventionellen Harze. Die Oberfläche des Harzes B) beträgt mindestens 700 m²/g, vorzugsweise mindestens 800 m²/g und liegt beispielsweise im Bereich von 700–1200 m²/g, vorzugsweise von 800–1200 m²/g.

Die Form der im erfindungsgemässen Verfahren alternativ oder gemeinsam verwendeten Harze A) und B) kann frei gewählt werden. Beispielsweise können die Harze in Form eines Pulvers, Granulats, oder von Kügelchen, Tabletten oder dergleichen, vorliegen.

Die am meisten vorkommenden Porendurchmesser und das Gesamt-Porenvolumen des Harzes A) und die Oberfläche des Harzes B) werden bestimmt, wie nachstehend beschrieben:

Jedes der Harze A) und B) wird in eine Säule einer lichten Weite von 8 mm und einer Länge von 500 mm eingefüllt und durch die jeweilige, harzgefüllte Säule werden je eine Lösung von 10 Arten Polystyrol bekannter molekularer Kettenlänge, bzw. von Styrol in Chloroform hindurchgeleitet. Das Volumen V_i von jedem eluierten Polystyrol wird gemessen und in ml ausgedrückt.

Jedes Polystyrol hat eine molekulare Kettenlänge von 10⁴ A bis 10² A und die Verteilung der molekularen Kettenlänge ist sehr eng.

Unter Verwendung der molekularen Kettenlänge in Å und des Elutionsvolumens V_i in ml und des Gewichtes W in g eines in die Säule eingefüllten Harzes, können das Gesamt-Porenvolumen V in ml/g, das Porenvolumen V₂₀₀ in ml/g von 30 Poren eines Durchmessers von mindestens 200 Å und die Oberfläche S in m²/g nach den nachstehenden Gleichungen errechnet werden:

$$\begin{aligned} (1) \quad V_i \text{ (ml/g)} &= (V_m - V_n) / W \\ (2) \quad S_i \text{ (m}^2\text{/g)} &= 8 \cdot V_i \cdot 10^4 / (m+n) \\ &\quad i=8000 \\ (3) \quad V \text{ (ml/g)} &= \sum_{i=15}^{i=8000} V_i \\ (4) \quad V_{200} \text{ (ml/g)} &= \sum_{i=200}^{i=8000} V_i \\ (5) \quad S \text{ (m}^2\text{/g)} &= \sum_{i=15} S_i \end{aligned}$$

V_i: Das Porenvolumen von mA bis nA

V_m: Das Volumen von mit Polystyrol eluiertem mA

V_n: Das Volumen von mit Polystyrol eluiertem nA

S_i: Die Oberfläche von mA bis nA

m und n: Molekulare Kettenlänge

Der am meisten vorkommende Porendurchmesser wird definiert als ein Volumen von (m+n)/2 bei maximalem Wert von V_i in einem durch Auftragen von V_i auf der Ordinate und (m+n)/2 auf der Abszisse hergestellten Histogramm.

Die im erfindungsgemässen Verfahren alternativ oder im Gemisch verwendeten Harze A) und B) können durch bekannte Suspensionspolymerisation in wässrigem Medium hergestellt werden. Das Harz A) ist im Handel erhältlich unter der Handelsmarke «Diaion» HP-10, HP-20, HP-30, HP-40 und HP-50 der Mitsubishi Chemical Co., Ltd.

Das Harz A) kann aus Divinylbenzol und Styrol oder einem funktionellen Derivat davon und das Harz B) aus Divinylbenzol, Styrol oder einem funktionellen Derivat davon und dem ungesättigten Alkylester einer aromatischen Polycarbonsäure abgeleitet werden. Funktionelle Derivate von Styrol sind beispielsweise alkyl-substituierte Derivate

mit 1–6 C-Atomen in der Alkylgruppe, wie Methyl-, Äthyl-, Dimethyl- und Propylstyrol. Ungesättigte Alkylester einer aromatischen Polycarbonsäure sind beispielsweise Di- oder Tri-alkenylester mit 3–10 C-Atomen, wie Triisoprenyl-1,2,4-benzoltricarboxylat und Diisopropenyl-terephthalat. Für die Herstellung des Harzes B kann beziehungsweise können 1 oder mehrere Styrol-Monomer(e) aus der Gruppe von Styrol und funktionellen Derivaten davon, und ein oder mehrere ungesättigte(r) Alkylester von aromatischen Polycarbonsäuren verwendet werden.

In den Harzen A) bzw. B) kann der Gehalt an Styrolmonomer bzw. des ungesättigten Alkylesters einer aromatischen Polycarbonsäure zweckentsprechend gewählt und verändert werden. Der Mengenanteil Styrolmonomer beträgt vorzugsweise 30–80 Gew.%, insbesondere 45–70 Gew.%, bezogen auf das Gesamtgewicht von Styrolmonomer und Divinylbenzol. Der Mengenanteil ungesättigter Alkylester einer aromatischen Polycarbonsäure beträgt vorzugsweise 30 Gew.%, insbesondere 0,1–30 Gew.%, besonders bevorzugt 1–10 Gew.%, bezogen auf das Gesamtgewicht von Divinylbenzol, Styrolmonomer und ungesättigtem Alkylester einer aromatischen Polycarbonsäure.

Handelsübliches Divinylbenzol enthält üblicherweise 40–70 Gew.% m- und p-Divinylbenzol und 30–60 Gew.% o-, m- und p-Äthylstyrol. Dieses im Handel erhältliche Divinylbenzol kann auch als solches anstelle des genannten Divinylbenzols und Styrolmonomers verwendet werden.

Die Copolymerisation kann nach bekannter Art ausgeführt werden. Beispielsweise kann das Harz A) bzw. B) durch Copolymerisation in Suspension von Divinylbenzol und Styrol oder einem funktionellen Derivat davon und gegebenenfalls des ungesättigten Alkylesters einer aromatischen Polycarbonsäure in Gegenwart eines Polymerisations-Initiators ausgeführt werden.

Es können hierfür bekannte, in den genannten Monomeren lösliche Radikal-Polymerisationsinitiatoren verwendet werden, beispielsweise Benzoyl- und Lauroylperoxid, tert.-Butylperacetat und -perpivalat sowie Azobisisobutyronitril. Der Mengenanteil Polymerisationsinitiator kann zweckentsprechend gewählt werden und beträgt beispielsweise 0,1–10 Gew.%, vorzugsweise 0,5–3 Gew.%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Polymerisationsansatzes.

Vorzugsweise wird bei wässriger Suspensions-Copolymerisation ein Dispergierungsmittel eingesetzt, um ein granuliertes Copolymer zu erhalten. Geeignete derartige Dispergiermittel sind beispielsweise schlecht lösliche Metallsalze von anorganischen Säuren, wie Bariumsulfat, Calciumcarbonat und Tricalcium-phosphat; schlecht lösliche Tonerde-mineralien, wie Bentonit und Ton; natürliche oder synthetische wasserlösliche polymere Materialien, wie Stärke, Methylcellulose, Gelatine, gegebenenfalls teilverseifter Polyvinylalkohol, Polyacrylsäuresalze, wie Poly(natriumacrylat) und -(kaliumacrylat). Der Mengenanteil Dispergiermittel kann zweckentsprechend gewählt werden und beträgt beispielsweise 0,1–10 Gew.%, vorzugsweise 0,5–7 Gew.%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Monomergemisches.

Bei Ausführung der wässrigen Suspensions-Copolymerisation kann auch ein Dispersions-Stabilisator eingesetzt werden, wie Natrium-dodecylbenzolsulfonat und verschiedene andere oberflächenaktive Mittel. Der Einsatz eines Dispergiermittels mit oder ohne Dispersions-Stabilisator verhindert die Vergrößerung eines durch teilweise Zusammenballung des Lösungsmittels und der Monomere in der Suspensionspolymerisation gebildeten Gels und ermöglicht es, auf leichte Art ein Copolymer von Divinylbenzol/Styrol oder von Divinylbenzol/Styrol/ungesättigtem Alkylester einer aromatischen Polycarbonsäure einheitlicher Teilchengrösse

herzustellen. Ausserdem ergibt sich daraus eine verbesserte Teilchengrösse-Verteilung des erhaltenen teilchenförmigen Harzes und es wird teilchenförmiges Harz A) oder B) mit hervorragender Adsorptionsfähigkeit für Vitamin B₁₂ erhalten.

Gewünschtenfalls kann auch ein Gemisch von Lösungsmitteln verwendet werden, die gute Lösungsmittel für mindestens das Divinylbenzol oder den ungesättigten Alkylester einer aromatischen Polycarbonsäure darstellen. Geeignete derartige gute Lösungsmittel sind beispielsweise alkyl-substituierte Benzole, wie Diäthyl- und Trimethylbenzol sowie Methylisopropylbenzol als gute Lösungsmittel für Divinylbenzol; und aliphatische Alkohole, wie tert.-Isoamylalkohol und -Butylalkohol als gute Lösungsmittel für ungesättigte Alkylester von aromatischen Polycarbonsäuren. Wenn beispielsweise als Lösungsmittel ein Gemisch von tert.-Isoamylalkohol und Diäthylbenzol verwendet wird, wirkt dieses als gutes Lösungsmittel für eines der Monomere, jedoch als schlechtes Lösungsmittel für das andere Monomer. Demzufolge dient es dazu, dem resultierenden teilchenförmigen Harz eine gleichmässige, makroretikuläre Struktur zu verleihen und die Porosität des gesamten Harzes zu erhöhen. Dies ist wirksam für die Verminderung des Ausmasses der Quellung der im erfindungsgemässen Verfahren als Adsorptionsmittel verwendeten Harze und ergibt bessere Trennfähigkeit der Harze für Vitamin B₁₂.

Bevorzugt wird wässrige Suspensions-Copolymerisation üblicherweise in inerter Gasatmosphäre, wie Stickstoff, ausgeführt und die Copolymerisationstemperatur und -dauer kann in Abhängigkeit des jeweiligen Polymerisationsinitiators und anderer Fakten gewählt werden. Beispielsweise eine Temperatur von 0–110°C, vorzugsweise 50–100°C und eine Zeitdauer von 8–16 h.

Die nach dem erfindungsgemässen Verfahren der Adsorptions- und Elutionsbehandlung zu unterziehende, Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltende Flüssigkeit, enthält beispielsweise rohes Vitamin B₁₂, und wird erhalten durch Extraktion von in der Zuchtbrühe oder in gezüchteten mikrobiellen Zellen angesammeltem Vitamin B₁₂, das durch Züchtung eines bekannten, Vitamin B₁₂ produzierenden Mikroorganismus in einem Nährmedium erhalten wurde, mittels Wasser oder einem Alkohol, wie Methanol, Äthanol oder Isopropanol, oder erhalten durch Zerstörung der Zellmembranen der Vitamin B₁₂ enthaltenden, gezüchteten mikrobiellen Zellen durch Mahlen oder andere mechanische Mittel oder Ultraschall, gegebenenfalls mit an die Zerstörung der Zellmembranen anschliessender Extraktion mit Wasser oder einem Alkohol.

Die Herstellung von Vitamin B₁₂ durch Fermentationsverfahren und Vitamin B₁₂ erzeugende Mikroorganismen sind bekannt und können für die Herstellung der das rohe Vitamin B₁₂ enthaltenden, nach dem erfindungsgemässen Verfahren zu behandelnden Flüssigkeit eingesetzt werden.

Bekanntes Vitamin B₁₂ erzeugende Mikroorganismen sind beispielsweise solche der Sorten *Propionibacterium*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodopseudomonas*, *Mycobacterium* und *Pseudomonas*. Spezifische Beispiele dieser bekannten Mikroorganismen sind nachstehend angeführt und von den angegebenen Depotstellen frei erhältlich:

Propionibacterium freudenreichii (ATCC 6207),
Propionibacterium shermanii (ATCC 8262),
Streptomyces olivaceus (ATCC 3335),
Arthrobacter hyalinus (ATCC 31263),
Arthrobacter simplex (ATCC 6946),
Rhodopseudomonas spheroides (ATCC 11167),
Rhodopseudomonas capsulata (ATCC 11166),
Corynebacterium sp. (IFO 12320),

Mycobacterium smegmatis (IFO 3082) und
Pseudomonas denitrificans (ATCC 13867).

Das Verfahren zur Herstellung von Vitamin B₁₂ durch Fermentation unter Verwendung der bekannten, vorstehend angeführten, Vitamin B₁₂ erzeugenden Mikroorganismen, ist ebenfalls bekannt und beispielsweise in «*Microbial Technology*» 2. Ausg., Bd. 1, S. 497–519, 1979, Verlag: «Academic Press, Inc.», offenbart.

Das erfindungsgemässe Verfahren umfasst, dass die rohes Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltende Flüssigkeit mit einem Adsorptionsmittel in Form des Harzes A) und/oder des Harzes B) in Berührung gebracht wird, um Adsorption von Vitamin B₁₂ an das Harz zu erzielen, wonach das adsorbierte Vitamin B₁₂ mittels eines Eluierungsmittels aus dem Harz eluiert und das aktive Eluat gesammelt wird.

Für den Kontaktierungsschritt kann jedes beliebige Mittel eingesetzt werden, das vollständige Berührung von Harz und Flüssigkeit ermöglicht. Beispielsweise kann eine Ansatzmethode verwendet werden, wobei das Harz als Adsorbierungsmittel mit der das Vitamin B₁₂ enthaltenden Flüssigkeit gemischt und das Gemisch gewünschtenfalls gerührt wird, um Flüssigkeit und Harz vollständig miteinander in Berührung zu bringen. Es kann aber auch Säulenchromatographie zum Einsatz gelangen, wobei das Harz als Adsorptionsmittel in eine Säule gefüllt und die das Vitamin B₁₂ enthaltende Flüssigkeit durch die harzgefüllte Säule hindurch geleitet wird. Im Fall des diskontinuierlichen Ansatzverfahrens wird der pH-Wert der das Vitamin B₁₂ enthaltenden Flüssigkeit zweckmässig auf 5–8, vorzugsweise etwa 7, gestellt und ein zweckentsprechender Menganteil, beispielsweise 1–50 Vol. Teil(e)/Vol. Teil, der das rohe Vitamin B₁₂ enthaltenden Flüssigkeit des Adsorptionsmittels beigemischt. Danach wird das Gemisch zweckmässig während 10 min bis 2 h, üblicherweise 20 min bis 1 h, sachte gerührt. Die Temperatur dieser Adsorptionsbehandlung kann Zimmertemperatur sein, liegt jedoch zweckmässig so tief wie möglich, beispielsweise bei 10–30°C.

In der Methode der Säulenchromatographie kann die das Vitamin B₁₂ enthaltende Flüssigkeit unter ähnlichen Bedingungen von pH-Wert und Temperatur durch die in die Säule als Adsorptionsmittel eingefüllte Harzschicht geleitet werden, wie im diskontinuierlichen Ansatzverfahren.

Nach der Adsorptionsbehandlung wird das Harz zweckmässig gewaschen und dann mittels eines Eluierungsmittels eluiert. Beispielsweise kann das Harz, nachdem das Vitamin B₁₂ adsorbiert wurde, mit Wasser oder wässrigem Alkohol niedriger Konzentration, beispielsweise 5%igem wässrigem Methanol, 2%igem wässrigem Äthanol oder 1%igem wässrigem Isopropanol gewaschen und dann mittels eines Eluierungsmittels eluiert werden.

Durch die Eluierungsbehandlung von Vitamin B₁₂ von Harz als Adsorptionsmittel mittels eines Eluierungsmittels, wird ein aktives Eluat erhalten, das gereinigtes Vitamin B₁₂ enthält.

Es können gewöhnliche Eluierungsmittel verwendet werden, beispielsweise wässrige Lösungen von niedrigen aliphatischen Alkoholen, Säuren, Alkalien und Salzen. Spezifische Beispiele hierfür sind niederaliphatische Alkohole, wie Methanol, Äthanol und Isopropanol; Säuren, wie anorganische Säuren, z.B. Phosphor-, Bor- und Salzsäure, sowie organische aliphatische Carbonsäuren, z.B. Essigsäure; Alkalien, wie Natriumhydroxid, Mono- und Diammonium-phosphat und Ammoniumnitrat; Salze, wie Natriumcarbonat, -acetat, -phosphat und Kaliumphosphat. Das jeweilige Eluierungsmittel kann zweckentsprechend und in Abhängigkeit der jeweiligen Arten und Mengenanteile der Verunreinigungen und der Art des als Adsorbierungsmittels verwendeten

Harzes gewählt werden. Bevorzugt werden wässrige Lösungen von niederen aliphatischen Alkoholen, beispielsweise wässrige Alkohole einer Alkoholkonzentration von weniger als 50 Vol.%, beispielsweise 25–50 Vol.% Methanol, 15–40 Vol.% Äthanol, 6–20 Vol.% Isopropanol.

Die Eluierungsbehandlung kann bei Zimmertemperatur erfolgen, wobei weder eine besondere Erwärmung noch Kühlung benötigt wird. Gewünschtenfalls kann jedoch erwärmt oder gekühlt, beispielsweise auf 30–80°C erwärmt werden.

Nach dem beschriebenen Vorgehen wird ein aktives Eluat erhalten, das gewünschtenfalls konzentriert, umkristallisiert oder auf andere Art aufgearbeitet werden kann.

In den nachstehenden Beispielen werden Ausführungsformen der Erfindung näher erläutert.

Beispiel 1

In einer Glassäule wurden 100 ml eines granulierten Divinylbenzol/Styrol-Copolymers mit einem hauptsächlich vorkommenden Porendurchmesser von 320 Å und einem Gesamt-Porenvolumen von 0,91 ml/g, das durch Suspensionspolymerisation in wässrigem Medium unter Verwendung von industriellem Divinylbenzol einer Reinheit von etwa 55%, Rest Äthylvinylbenzol, hergestellt worden war, eingefüllt.

Das Porenvolumen der Poren dieses Harzes mit einem Porendurchmesser von mindestens 200 Å betrug 0,50 ml/g.

Ein gemahltes Produkt von mikrobiellen Zellen, die durch Zentrifugieren einer Zuchtbrühe von *Propionibacterium shermanii* (IFO 12391), einem Vitamin B₁₂ erzeugenden Mikroorganismus, erhaltenes Vitamin B₁₂ enthielt, wurde mit KCN enthaltendem, 80%ige, wässrigem Äthanol extrahiert. Die erhaltene, Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltende Flüssigkeit wurde auf 1/10 konzentriert und dann mit der 10fachen Menge Wasser verdünnt, so dass eine Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltende Flüssigkeit mit einem gewichtsmässigen Gehalt an Vitamin B₁₂ von 23 ppm erhalten wurde.

Von der erhaltenen, Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltenden Flüssigkeit wurde 1 l mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 4 ml/min von oben nach unten durch die mit dem granulierten Harz gefüllte Glassäule geleitet, wobei das Vitamin B₁₂ am Harz adsorbiert wurde. Danach wurden kontinuierlich 2 l entionisiertes Wasser durch das Harz geleitet, um die Verunreinigungen in die Abgangsflüssigkeit der Adsorptionsbehandlung zu spülen.

Dann wurde das adsorbierte Vitamin B₁₂ durch Hindurchleiten von 3 l 40%igem wässrigem Methanol mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 3 ml/min durch die Harzfüllung der Säule eluiert.

Vom erhaltenen aktiven Eluat wurde 1 l gesammelt und darin der Gehalt an Vitamin B₁₂ nach einer mikrobiologischen Messmethode bestimmt, wobei eine gewichtsmässige Konzentration von 23 ppm Vitamin B₁₂ ermittelt wurde. Das Gewinnungsverhältnis von gereinigtem Vitamin B₁₂ aus der Vitamin B₁₂ und Verunreinigungen enthaltenden Flüssigkeit betrug somit 100%.

Beispiel 2

Beispiel 1 wurde mit der Ausnahme wiederholt, dass in die Glassäule als Adsorptionsmittel 100 ml des handelsüblichen Divinylbenzol/Styrol-Copolymers «Diaion» HP-20 mit einem hauptsächlich vorkommenden Porendurchmesser von 460 Å und einem Gesamt-Porenvolumen von 1,08 ml/g eingefüllt wurden.

Im schlussendlich erhaltenen aktiven Eluat wurde ebenfalls ein gewichtsmässiger Gehalt an Vitamin B₁₂ von 23 ppm und somit ein Rückgewinnungsverhältnis von gereinigtem Vitamin B₁₂ von 100% ermittelt.

Beispiel 3

Ein Rührwerksbehälter von 150 l Inhalt wurde mit 5,0 kg industriellem Divinylbenzol einer Reinheit von etwa 55%, Rest Äthylvinylbenzol, 1 kg Tripropenyl-1,2,4-benzoltricarboxylat, 6,0 kg Diäthylbenzol, 3,0 kg Isoamylalkohol, 80 g Benzoylperoxid, 100 l Wasser, 4 kg Tricalciumphosphat und 6 g Natriumdodecylbenzolsulfonat beschickt und das Gemisch wurde unter Rühren bei 90°C während 8 h suspensionspolymerisiert, wobei ein granuliertes, vernetztes Polymer erhalten wurde.

Das erhaltene granuliert Polymer wurde abfiltriert, in einer Säule mit Methanol und Chloroform gewaschen, erneut abfiltriert und unter vermindertem Druck bei 60–80°C getrocknet, wobei 5,3 kg eines weissen, nicht-transparenten, granulierten Polymers erhalten wurden.

Das erhaltene Polymer zeigte eine Oberfläche von 874 m²/g und ein Gesamt-Porenvolumen von 1,7 ml/g.

Das Porenvolumen der Poren eines Durchmessers von mindestens 200 Å im erhaltenen Harz betrug 0,30 ml/g.

Das erhaltene Harz zeigte eine für die Carbonylgruppe charakteristische IR-Absorption bei 1740 cm⁻¹, woraus hervorgeht, dass das Tripropenyl-1,2,4-benzoltricarboxylat wirksam durch Copolymerisation in das Polymer einpolymerisiert worden war.

Ein Vitamin B₁₂ enthaltendes, durch Züchtung des Vitamin B₁₂ erzeugenden Mikroorganismus *Propionibacterium shermanii* (IFO 12391) erhaltenes Produkt wurde zentrifugiert und das Vitamin B₁₂ wurde zusammen mit Verunreinigungen aus den abgetrennten mikrobiellen Zellen unter Verwendung von KCN enthaltendem wässrigem, 80%igem Äthanol extrahiert. Die erhaltene Flüssigkeit wurde durch Verdampfung auf 1/10 des Volumens konzentriert, wobei ein rohes Vitamin B₁₂ in einer gewichtsmässigen Konzentration von 500 ppm enthaltende Zuchtflüssigkeit erhalten wurde. 100 ml der erhaltenen Zuchtflüssigkeit wurden mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 200 ml/min von oben nach unten durch eine mit 3 l des wie vorstehend beschrieben hergestellten, teilchenförmigen Harzes gefüllte Säule geleitet, um Vitamin B₁₂ am Harz zu adsorbieren. Dann wurden kontinuierlich 10 l einer 1%igen wässrigen Lösung von Essigsäure von oben nach unten durch die Säule geleitet, um die Verunreinigungen in die Abgangsflüssigkeit der Adsorptionsbehandlung zu spülen. Danach wurde das am Harz adsorbierte Vitamin B₁₂ mit 30%igem wässrigem Methanol eluiert und 8000 ml des erhaltenen aktiven Eluates wurden gesammelt und getrocknet, wobei mit einer Ausbeute von 100%, bezogen auf den Gehalt der Zuchtflüssigkeit, pulverförmiges Vitamin B₁₂ einer Reinheit von 80% erhalten wurde.

Beispiel 4

Ein Rührwerksbehälter von 150 l Inhalt wurde mit 5,0 kg industriellem Divinylbenzol einer Reinheit von etwa 55%, Rest Äthylvinylbenzol, 0,25 kg Tripropenyl-1,2,4-benzoltricarboxylat, 4,0 kg Diäthylbenzol, 2,0 kg Isoamylalkohol, 80 g Benzoylperoxid, 100 l Wasser, 4 kg Tricalciumphosphat und 45 g polymerem oberflächenaktivem Mittel vom Polycarbonsäure-Typ «Caribon»-B beschickt. Das Gemisch wurde unter Rühren bei 90°C während 8 h suspensionspolymerisiert, wobei ein granuliertes, vernetztes Polymer erhalten wurde.

Das erhaltene Polymer wurde abfiltriert, in einer Säule mit Methanol und Chloroform gewaschen, erneut abfiltriert und bei vermindertem Druck bei 60–80°C getrocknet, wobei 4,9 kg eines weissen, nicht-transparenten, granulierten Polymers erhalten wurden.

Die Oberfläche des erhaltenen Polymers betrug 905 m²/g und dessen Gesamt-Porenvolumen 1,6 ml/g.

Das Porenvolumen von Poren eines Durchmessers von

mindestens 200 Å im erhaltenen Harz betrug 0,30 ml/g.

Das erhaltene Harz zeigte gute Affinität zu in einer Säule durch dieses hindurch geleitetem Wasser, so dass leicht eine mit diesem Harz gefüllte Säule für Säulenchromatographie hergestellt werden konnte.

Ein durch Züchtung des Vitamin B₁₂ erzeugenden Mikroorganismus *Propionibacterium shermanii* (IFO 12391) hergestelltes, Vitamin B₁₂ enthaltendes Produkt wurde zentrifugiert und aus den abgetrennten mikrobiellen Zellen wurde unter Verwendung von KCN enthaltendem 80%igem wässrigem Äthanol Vitamin B₁₂ zusammen mit Verunreinigungen extrahiert. Die erhaltene Flüssigkeit wurde durch Verdampfen auf 1/10 des Volumens konzentriert, wobei eine rohes Vitamin B₁₂ in einer gewichtsmässigen Konzentration

von 500 ppm enthaltende Zuchtbrühe erhalten wurde. 100 ml der erhaltenen Flüssigkeit wurden mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 200 ml/min durch eine mit 3 l des wie vorstehend beschrieben hergestellten, teilchenförmigen Harzes gefüllte Säule geleitet, um Vitamin B₁₂ am Harz zu adsorbieren. Dann wurden kontinuierlich 10 l 1%ige wässrige Essigsäure von oben nach unten durch die Säule geleitet, um die Verunreinigungen in die Abgangsflüssigkeit der Adsorptionsbehandlung zu spülen.

10 Danach wurde das adsorbierte Vitamin B₁₂ mit 20%igem wässrigem Isopropanol aus dem Harz eluiert. 600 ml des erhaltenen aktiven Eluats wurden gesammelt und getrocknet, wobei mit einer Ausbeute von 98%, bezogen auf Zuchtflüssigkeit, gereinigtes pulverförmiges Vitamin B₁₂ erhalten wurde.