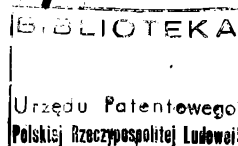


C 12 d 5/00



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 47117

Kl. 12 o, 27
Kl. internat. C 12 d**Chinoin Gyógyszer és Vegyszeti Termékek Gyára r. t.*)**

Budapeszt, Węgry

Sposób wytwarzania izomeru kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego

Patent trwa od dnia 28 marca 1961 r.

Pierwszeństwo: 29 marca 1960 r. (Węgry).

Wiadomo, że w czasie fermentacji kobalaminy, którą przeprowadza się za pomocą bakterii propionowych powstaje nie tylko witamina B₁₂ lecz również pokrewne związki kobalaminowe. Te, tak zwane czynniki mogą wykazywać takie same lub inne właściwości niż witamina B₁₂; istnieją również zdecydowanie antagonistyczne czynniki w stosunku do witaminy B₁₂.

Poza tym wiadomo, że przez częściową hydrolizę witaminy B₁₂ — związku stanowiącego amid kwasu trójkarboksylowego można wytworzyć kwas kobalaminomonokarboksylowy a więc jeden z czynników. Produkt tego chemicznego sposobu zawiera trzy możliwe izomery kwasu kobalaminokarboksylowego, które nie są równocenne pod względem biologicznym.

Stwierdzono, że jeden z aktywnych izomerów tego kwasu można otrzymać w sposób prosty i ekonomiczny, jeżeli bakterie propionowe szczepu PBS77 podda się fermentacji na hydrolizacie białkowym, zawierającym kwas pantotenowy i biotynę a izomer kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego powstały w wyniku fermentacji ciekłej kultury, oddzieli i odizoluje od również powstałej witaminy B₁₂.

Stwierdzono również, że tak otrzymany izomer kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego będący pod względem biologicznym antagonistą witaminy B₁₂, można skutecznie stosować jako środek leczniczy przeciw polycythemii.

Zwalczanie polycythemii stanowiło do dziś nierozwiązany problem w medycynie. Za pomocą otrzymanego według wynalazku aktywnego czynnika, osiągnięto, przy podaniu śródmięśniowym w dziennej dawce 1—3 mg po miesięcznym aplikowaniu, spadek liczby czerwonych

*) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są Agoston Simon, Agnès Mertha, József Borsy i Endre Csanyi.

ciałek krwi o 30—40%, względnie osiągnięto z powrotem normalną ich liczbę.

Bakterie propionowe szczepu PBS 77 zastosowane w tym sposobie posiadają następujące właściwości: dobry wzrost na ciekłej pożywce, zawierającej namok kukurydziany lub ekstrakt drożdżowy i glikozę przy hodowli w warunkach mikroaerobowych, zwłaszcza jeżeli do pożywki doda się CaCO_3 . Na podstawie klasyfikacji bakterii według Berge'ya Manuala i Krassilnikowa szczep ten odpowiada mniej więcej bakteriom *P. shermanii*.

Pod względem morfologicznym charakterystyczne jest to, że kultura, która w okresie młodości, w większej części składa się z pojedynczych coccusów i z nieregularnych oraz bardzo krótkich i cienkich pałeczek, w okresie dojrziałym ma prawie wyłącznie coccusy i mniejszą liczbę dużych, nabrzmiąłych form inwolucyjnych. Charakterystyczne właściwości biochemiczne: szczep rozwija się dobrze na pożywce zawierającej kwas mlekowy; ciekła kultura po zalkalizowaniu NaOH daje kłaczkowaty osad; w czasie fermentacji w obecności 5,6—dwumetylo-benzimidazolu środowisko fermentacyjne zawiera witaminę B_{12} i aktywny izomer kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego, który jest antagonistyczny w stosunku do witaminy B_{12} .

Szczep bakterii propionowych PBS 77 wytworzono następująco: szczepionkę wytworzono ze spożywczej śmietany na bulionie, składającym się z 1,5% ekstraktu drożdżowego, 0,5% peptonu i 1% glukozy; przy czym szczep hodowano w termostacie w temperaturze 25° C w ciągu 48 godzin. Następnie dalej hodowano na płytkach Petriego na pożywce, zawierającej 2% namoku kukurydzianego (zawartość suchej substancji 50%), 2% glukozy i 1,8% agaru. Płytki przechowywano przez 8 dni w temperaturze 25°C w eksykatorze próżniowym w atmosferze azotu. Z całkowicie rozwiniętych kultur zbadano te, które pod względem morfologicznym uważano za bakterie propionowe na ich przydatność do otrzymywania witaminy B_{12} na drodze fermentacji na ciekłej pożywce w obecności Co^{++} i 5,6—dwumetylobenzimidazolu. Jedną z aktywnych kultur rozmnożono w ciekłym środowisku fermentacyjnym, składającym się z 2% namoku kukurydzianego (50% suchej substancji), 2% glukozy i 1% CaCO_3 , a następnie w celu otrzymania wyizolowanej kultury dalej hodowano na stałej pożywce,

której skład odpowiadał składowi stałej pożywki wyżej opisanej.

Nowy szczep PBS 77 został zarejestrowany w węgierskim Instytucie Zdrowia pod nr 601013.

W czasie fermentacji przy zastosowaniu tego szczepu, którą można przeprowadzić na pożywce, umożliwiającej wzrost bakterii propionowych, otrzymuje się obok 2—3 $\mu\text{g/ml}$ witaminy B_{12} , 0,4—0,6 $\mu\text{g/ml}$ kwasu kobalaminomonokarboksylowego antagonistycznego do witaminy B_{12} . Jako pożywkę można stosować dowolny hydrolizat białkowy pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego, który uzupełnia się kwasem pantotenowym i biotyną (np. namokiem kukurydzianym, ekstraktem drożdżowym itd).

Fermentację prowadzi się w warunkach mikroaerobowych, korzystnie w obecności 5,6—dwumetylobenzimidazolu w temperaturze 25—30°C.

W czasie przeróbki sfermentowanej ciekłej kultury otrzymany kwas kobalaminomonokarboksylowy można oddzielić ilościowo w sposób prosty od witaminy B_{12} i następnie wyizolować. Oddzielanie można przeprowadzić rozmaicie. Według jednej z odmian wykonania sposobu, sfermentowaną pożywkę lub otrzymany z niej koncentrat ekstrahuje się przy wartości pH 7,5—8,5 za pomocą rozpuszczalnika nierozpuszczalnego w wodzie, przy czym najpierw zostaje usunięta witamina B_{12} . Następnie wodny roztwór zakwasza się i w końcu ekstrahuje przy wartości pH korzystnie 2—4,5 za pomocą rozpuszczalnika nierozpuszczalnego w wodzie. Z roztworu tego można otrzymać kwas kobalaminomonokarboksylowy, np. przez rozpuszczenie i wykryształizowanie z wodnego roztworu rozpuszczalnika rozpuszczalnego w wodzie.

Jako rozpuszczalnik do ekstrakcji ze środowiska fermentacyjnego można korzystnie stosować fenol, krezol, chlorowco/pochodne fenolu lub rozpuszczalniki niepolarne, np. węglowodory alifatyczne lub ich chlorowco/pochodne albo ich mieszaniny.

Do ekstrakcji kwasu monokarboksylowego nadają się również wyżej wymienione rozpuszczalniki, względnie ich mieszaniny.

W dalszej odmianie postępowania, sposobem według wynalazku, oddziela się ze sfermentowanej pożywki kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy od witaminy B_{12} za pomocą wymieniaczy anionowych. Do tego celu można stosować średnio silne lub silnie zasadowe wymieniacze anionowe po obróbce alkalicznej, a więc w cyklu — OH. Na wymieniacz anio-

nowy nanosi się środowisko fermentacyjne względnie roztwór koncentratu w stanie słabo kwaśnym lub obojętnym, w ten sposób, że roztwór przeprowadza się przez kolumnę napełnioną granulowanym wymienniczem jonowym albo miesza się go z granulakami wymiennicza jonowego, przez 10—15 minut, po czym oddziela się wymiennicz jonowy, następnie do eluacji stosuje się roztwór kwaśny, alkaliczny lub obojętny. Korzystnie jest, jeżeli do eluacji stosuje się roztwór, zawierający również rozpuszczalny w wodzie polarny rozpuszczalnik organiczny np. aceton, etanol lub metanol. Eluację prowadzi się korzystnie przy wartości pH 2—9.

W dalszej odmianie sposobu według wynalazku witaminę B₁₂ oddziela się od kwasu kobalaminomonokarboksylowego na drodze elektrodializy. Sposób ten stosuje się, jeżeli rozdzielaniu poddaje się już oczyszczone roztwory. Rozdzielanie można prowadzić w środowisku obojętnym albo słabo alkalicznym w obecności środka buforującego.

Kwas kobalaminomonokarboksylowy można według wynalazku wyizolować z jego roztworu w rozpuszczalniku nierozpuszczalnym w wodzie np. w sposób następujący: roztwór zadaje się wodą w ilości 200—1000 mg kwasu kobalaminomonokarboksylowego oraz 3—6 litrami polarnego rozpuszczalnika, np. acetonu, metyloetyloketonu, eteru dwuetylowego, dioksanu, octanu etylowego, butanolu na litr roztworu, przez co kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy zostaje wyparty do fazy wodnej. Z tak otrzymanego wodnego roztworu można wydobyć kwas monokarboksylowy przez adsorpcję na węglu zwierzęcym i następujące po tym eluowanie wodnym roztworem alkoholu. Fazę wodną można również poddać ekstrakcji polarnym rozpuszczalnikiem np. butanolem, benzyną, alkoholem.

Oczyszczony kwas kobalaminomonokarboksylowy wytrąca się z wody w postaci grubych, czerwonych, iglastych kryształów, łatwo rozpuszczalnych w wodzie i etanolu i wykazujących takie samo widmo w ultrafiolecie jak witamina B₁₂. Na drodze chromatografii bibulowej metodą występującą Machery - Nagel, oznacza się za pomocą drugorzędowego butanolu na 214 próbce bibuły względną wartość $R_f = 0,3—0,6$. Produkt wędruje do anody w czasie elektroforezy na bibule w buforze fosforanowym o wartości pH = 6,8. Kwas monokarboksylowy można przeprowadzić w wi-

taminę B₁₂ przez amidowanie. Produkt chromatografowany na bibule za pomocą kombinacji rozpuszczalnika; drugorzędowego butanolu (nasyconego wodą) z lodowatym kwasem octowym w stosunku 100:1, okazał się jednolity. W teście na płycie z agaru produkt przy E. coli 113—3 okazał się antagonistyczny w stosunku do witaminy B₁₂. Antagonistyczne działanie posiada charakter kompetetywny i jest tylko wtedy całkowite, jeżeli stosunek kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego do witaminy B₁₂ wynosi 40:1 lub jest jeszcze wyższy. Pod względem farmakologicznym nie zaobserwowano toksycznego działania kwasu monokarboksylowego.

Witaminę B₁₂ można izolować z roztworu uwolnionego od kwasu kobalaminomonokarboksylowego według znanych metod (np. przez adsorpcję na węglu) po uprzednim oczyszczeniu.

Sposób przeróbki według wynalazku, a więc oddzielanie czystego kwasu monokarboksylowego od witaminy B₁₂ i następnie izolowanie można skutecznie stosować wtedy, gdy aktywny kwas kobalaminomonokarboksylowy znajduje się w wodnym roztworze obok witaminy B₁₂. W przykładzie V podano przykładowo jak należy przerabiać sposobem według wynalazku sfermentowaną ciekłą kulturę szczepu P. freudenreichii, który pod względem procentowym produkuje znacznie mniej aktywnego kwasu monokarboksylowego. Dalsze szczegóły opisane są w przykładach.

Przykład I. W kolbie o poj. 50 l sterylizuje się 40 l następującej pożywki: 2% namoku kukurydzianego, 2% glikozy, 1% CaCO₃, 5 γ (ml Co(NO₃)₂), 1 γ/ml 5,6 — dwumetylobenzimidazolu. Środowisko naszczepia się 10% szczepionki PBS 77 otrzymanej na takiej samej pożywce i fermentuje w ciągu 6 dni w temperaturze 28—29°C mieszając 2 razy dziennie. Po 6 dniach środowisko fermentacyjne zawierało w sumie 150 mg witaminy B₁₂. Po skończonej fermentacji bakterie usuwa się przez odwirowanie. Zawiesinę bakterii gotuje się przez godzinę z 500 ml 70%-wego wodnego roztworu etanolu zawierającego 0,1% NaOH i przesącza. Wygotowywanie z etanolem powtarza się jeszcze dwukrotnie stosując każdorazowo 200 ml etanolu. Połączone ekstrakty o czerwonym zabarwieniu uwalnia od etanolu pod zmniejszonym ciśnieniem. Stężony wodny roztwór zadaje się 5 g węgla aktywnego, po 1 godzinnym staniu odsącza, przemywa wodą, po czym eluuje 67%-wym wodnym roztworem

etanolu w temperaturze 60–70°C. Eluat uwalnia się od etanolu pod zmniejszonym ciśnieniem. Wodny roztwór alkalinizuje się 10%-wym roztworem amoniaku do wartości $\text{pH} = 8$, a następnie ekstrahuje mieszaniną fenolu i czterochlorku węgla w stosunku 1:3, dopóki roztwór fenolu prawie przestanie być różowy. Następnie roztwór wodny zakwasza się kwasem solnym do wartości $\text{pH} = 3,5$. Ekstrakcję za pomocą fenolu i czterochlorku węgla prowadzi się dalej, aż rozpuszczalnik wykaże słabo różowe zabarwienie. Następnie kwaśny roztwór fenolu i czterochlorku węgla zadaje się taką samą ilością 50%-wego wodnego roztworu acetonu, tak, że kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy zostaje wyparty do fazy wodnej. Ekstrakcję acetonem prowadzi się dalej, dopóki faza rozpuszczalnika nie zabarwia się już na czerwono. Z wodnych roztworów usuwa się ślady rozpuszczalników organicznych przez destylację próżniową. Po dodaniu 0,3 g węgla aktywnego odsąca się. Węgiel przemywa się wodą i eluuje w temperaturze 60°C za pomocą 67%-wego wodnego roztworu etanolu. Eluat zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem do około 0,5–1,0 ml. Po 1 dniowym staniu w temperaturze 5°C otrzymuje się grube igielkowate kryształy, które odsąca się, przemywa małą ilością bardzo zimnej wody i suszy w strumieniu powietrza w temperaturze pokojowej.

Otrzymuje się 9,6 mg kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego, który po zbadaniu na drodze elektroforezy i chromatografii bibulowej okazuje się jednolity.

W czasie ekstrakcji alkalicznej wodnej fazy otrzymuje się frakcję fenolu — czterochlorku węgla zawierającą witaminę B_{12} . Z roztworu fenolu wypiera się witaminę B_{12} do fazy wodnej przez wstrząsanie z 50%-wym wodnym roztworem etanolu. Po jednorazowej adsorpcji na węglu zwierzęcym produkt poddaje się krystalizacji. Otrzymuje się 70 mg krystalicznej witaminy B_{12} .

Przykład II. 1000 litrów pożywki opisanej w przykładzie I sterylizuje się w ciągu godziny w fermenterze o pojemności 1 m³ z metalu kwasoodpornego w temperaturze 120°C. Następnie zaszczenia szczepionkę, zawierającą 10% — szczepu PBS 77 *Propionibacterium shermanii*. Szczepionkę wytworzono przez zaszczenie najpierw 10 litrów, a następnie 100 litrów środowiska fermentacyjnego za pomocą 400 ml hodowli szczepu każdorazowo po 6 dniach.

1000 litrów środowiska fermentacyjnego podaje się sterylnej kultywacji przez 6 dni w temperaturze 28–30°C i miesza ostrożnie co 2 godziny. Po ukończeniu fermentacji roztwór posiada przy *E. coli* zawartość witaminy B_{12} — 2,8 g. Środowisko fermentacyjne gotuje się przez godzinę, chłodzi i zakwasza do wartości $\text{pH} = 2,5$, po czym dodaje 2% ziemi bielącej. Po 1 godzinnym mieszaniu odwirowuje się od absorbenta i w końcu eluuje za pomocą 70%-wego roztworu etanolu nastawionego do wartości $\text{pH} = 8,5$ –9,0 za pomocą amoniaku. Eluację powtarza się 3-krotnie, podczas gdy ziemi bielącą odsąca się. Połączone obojętne etanolowe roztwory zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem do 1/20 objętości. Dodaje się 1% NaCN i 20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, po czym ekstrahuje się w 3 porcjach za pomocą alkoholu benzylowego, w sumie 20% objętości. Roztwór alkoholu benzylowego zadaje się taką samą objętością mieszaniny benzyna — benzen (2:1), jak też połową objętości wody tak, że witaminę B_{12} i kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy przeprowadza się do fazy wodnej. Wodną ekstrakcję powtarza się jeszcze dwukrotnie. Następnie wodny roztwór zadaje 150 g węgla zwierzęcego i odsąca się. Węgiel zwierzęcy przemywa się na nuczycie wodą zawierającą 0,5% NaCN a następnie eluuje 67%-wym wodnym roztworem etanolu. Etanol usuwa się przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Tak otrzymany wodny koncentrat zawiera witaminę B_{12} i kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy. Przez dodanie 3% NaHCO_3 czerwony wodny roztwór zostaje zalkalizowany do wartości $\text{pH} = 8$, po czym ekstrahuje się go mieszaniną fenolu i chloroformu w stosunku 1:4 tak długo, aż faza fenolowa prawie nie jest zabarwiona na różowo. Połączony ekstrakt fenolowy zawiera witaminę B_{12} , którą izoluje się jak to opisano w przykładzie I. Otrzymuje się 1,3 g krystalicznej witaminy B_{12} .

Alkaliczny wodny roztwór, zawierający kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy zakwasza się do wartości $\text{pH} = 2,5$, po czym ekstrahuje mieszaniną fenolu i chloroformu w stosunku 1:4 tak długo, aż faza fenolowa prawie nie jest zabarwiona na różowo. Faza wodna pozostaje żółto-brązowa. Połączone ekstrakty fenolowe wytrząsa się z 50%-wym wodnym roztworem acetonu, po czym kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy przechodzi do fazy wodnej. Dodaje się 2 g węgla zwierzęcego, który odsąca się po 0,5 godzinnym staniu,

dokładnie przemywa wodą destylowaną, a następnie eluuje 87%-wym roztworem etanolu. Roztwór etanolowy kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego uwalnia się od etanolu pod zmniejszonym ciśnieniem i zagęszcza. Tak otrzymany wodny roztwór po ochłodzeniu zawiera kryształy. Po 24 godzinnym przechowywaniu w temperaturze 5°C otrzymuje się grubą warstwę kryształów. Kryształy odsąca się na zimno na szklanej nuczyci 6—4, przemywa małą ilością lodowatej wody i suszy. Otrzymuje się 92 mg krystalicznego kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego. Produkt po zbadaniu na drodze elektroforezy i chromatografii bibułowej okazał się jednolity.

Przykład III. W fermenterze o pojemności 20 m³ poddaje się fermentacji pożywką za pomocą szczepu PBS 77 P. Shermanii jak opisano w przykładzie II. Po skończonej fermentacji środowisko zawiera 31,2 g witaminy B₁₂. Bakterie usuwa się przez odwirowanie, po czym z bakterii otrzymuje wspólnie witaminę B₁₂ i kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy jak opisano w przykładzie I. Po adsorpcji na węglu zwierzęcym otrzymuje się oczyszczony ekstrakt, zawierający witaminę B₁₂ i kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy. Rozdzielenie witaminy B₁₂ od kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego prowadzi się następująco:

2 litry koncentratu, zawierającego 19,6 g witaminy B₁₂ i 2,15 g kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego wprowadza się do kolumny wypełnionej (800 g) silnie zasadowym Amberlieia IRC—410 (wymieniacz jonowy znajduje się w cyklu CH, przemyty został wodą i jest wolny od alkaliów). Po przejściu koncentratu przez kolumnę z wymieniaczem przemywa się tak długo destylowaną wodą, aż woda z przemycia nie wykaże różowego zabarwienia. Przeciek i eluaty zawierają całą zawartość witaminy B₁₂ podczas gdy kwas monokarboksylowy pozostaje w kolumnie. Następnie eluuje się go za pomocą 0,01 n HCL zawierającego 50% acetonu (800 ml).

Otrzymany roztwór kwasu kobalaminomonokarboksylowego w stanie obojętnym zostaje uwolniony od rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany koncentrat zawiera 1,8 g kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego, co oznacza się na drodze fotometrycznej. Wodny roztwór oczyszcza się przez adsorpcję, jak opisano w przykładzie II. Po odpędze-

niu etanolu dodaje się tak długo acetonu, aż roztwór zmętnieje, po czym przechowuje się go przez noc w temperaturze 5°C. Wydzielone igielkowate kryształy odsąca się, przemywa 80%-wym wodnym roztworem acetonu i suszy w temperaturze pokojowej. Otrzymuje się 1,5 g kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego.

Przykład IV. 100 litrów materiału fermentacyjnego poddaje się fermentacji jak w przykładzie I. Sfermentowana ciecz wykazywała aktywność 257 mg witaminy B₁₂. Przeróbkę prowadzi się, jak opisano w przykładzie I, przez odwirowanie, ekstrakcję etanolem i adsorpcję. Po adsorpcji na węglu zwierzęcym otrzymuje się wodny roztwór, zawierający 151 mg witaminy B₁₂ i 26,1 mg kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego.

Koncentrat wprowadza się do komory aparatu do elektrolizy, składającego się z dziesięciu około 50 ml komór. Aparat napełnia się 0,1 molarowym buforem fosforanowym o wartości pH=6,8, po czym poddaje się elektrodializie w ciągu 3 godzin przy napięciu 220 Volt. Kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy wędruje do anody. Oddzielone w ten sposób związki oczyszcza się oddzielnie przez adsorpcję, po czym witaminę B₁₂ wykrystalizuje się z wodnego roztworu acetonu a kwas cyjanokobalaminomonokarboksylowy — z gorącej wody. Otrzymuje się 150 mg witaminy B₁₂ i 23,1 mg kwasu cyjanokobalaminomonokarboksylowego.

Przykład V. W fermenterze ze stali kwasoodpornej o pojemności 1 m³ zaopatrzonym w mieszadło sterylizuje się 1000 litrów pożywki, zawierającej drożdże prasowane (2% suchej substancji), które poddaje się w ciągu 10 godzin autolizie w temperaturze 45°C. Nierozpuszczone części odwirowuje się z autolizatu a płynający na powierzchni czysty roztwór przerabia się dalej. Pożywka zawiera oprócz tego 2% glikozy, 1% CaCO₃, 5 γ/ml Co(NO₃)₂ i 1 γ/ml 5,6—dwumetylobenzimidazolu. Pożywkę zaszczenia się 10% środowiska, zawierającego *Propionibacterium freudenreichii*, które wyhodowano na tej samej pożywce. Po 6 dniowej sterylnej fermentacji w temperaturze 28—30°C i po dwudniowym mieszanu środowisko fermentacyjne wykazuje aktywność 2,57 g witaminy B₁₂ (*E. Coli*). Bakterie usuwa się przez odwirowanie. Ciecz wypływającą górą wylewa się. Zawiesinę bakterii gotuje się przez godzinę z 30 litrami 50%-wego wodnego roztworu acetonu

o zawartości 0,05% NaCN i odsąca. Wygotowywanie z wodnym roztworem acetonu powtarza się jeszcze dwukrotnie, po 15 litrów za każdym razem. Połączone czerwone roztwory uwalnia się w próżni od acetonu, po czym wodny roztwór zadaje się 140 g węgla zwierzęcego i odsąca po 1/2 godzinie. Węgiel przemywa się małą ilością wody i eluuje wodnym roztworem etanolu o temperaturze 60–70°C. Eluat uwalnia się w próżni od etanolu, po czym wodny roztwór alkalizuje się za pomocą 10%-owego amoniaku do wartości pH = 8 i ekstrahuje mieszaniną fenol-chloroform w stosunku 1:5, aż faza fenolowa prawie nie wykaze różowego zabarwienia. Następnie część wodną zakwasza się kwasem solnym do wartości pH = 3 i ekstrakcję prowadzi dalej za pomocą fenolu i chloroformu, aż rozpuszczalnik prawie nie wykazuje różowego zabarwienia. Kwaśny roztwór fenolowo-chloroformowy zadaje się 4-krotną objętością eteru i połową objętości wody tak, że kwas cyjanokobalamonomonokarboksylowy przechodzi do fazy wodnej. Następnie ekstrakcję za pomocą wody prowadzi się dalej, aż faza rozpuszczalnika nie wykaze więcej czerwonego zabarwienia. Ślady rozpuszczalnika organicznego usuwa się z wodnego roztworu na drodze destylacji próżniowej. Dodaje się 0,5 węgla zwierzęcego, po 1/2 godzinie odsąca się, przemywa wodą i eluuje 70%-owym wodnym roztworem etanolu w temperaturze 60–70°C. Eluat zagęszcza się w próżni do stanu suchego, po czym dodaje się gorącej wody tyle, ażeby pozostałość przeszła do roztworu. Po 2 godzinnym staniu w temperaturze 5°C odsąca się wydzielone kryształy, przemywa wodą lodową i suszy się powietrzem. Otrzymuje się 2,2 mg kwasu cyjanokobalamonomonokarboksylowego.

Ekstrakty fenolowo-chloroformowe, otrzymane w czasie ekstrakcji alkalicznych wodnych roztworów, zawierają witaminę B₁₂. Z ekstraktów tych przeprowadza się witaminę B₁₂ do roztworu wodnego przez dodanie 4-krotnej objętości eteru i połowy objętości wody. Po jednorazowej adsorpcji na węglu zwierzęcym prowadzi się krystalizację. Otrzymuje się 810 mg krystalicznej witaminy B₁₂.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania izomeru kwasu cyjanokobalamonomonokarboksylowego, znamieny tym, że pożywkę z hydrolizatu białkowego

pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego, zawierającą kwas pantotenowy i biotynę, korzystnie namok kukurydziany względnie ekstrakt drożdżowy, poddaje się fermentacji za pomocą *Propionibacterium shermanii* szczepu PBS 77 w warunkach mikroaerobowych w temperaturze 25–30°C i w obecności 5,6 — dwumetylobenzimidazolu, przy czym breję fermentacyjną lub wytworzony z niej i ewentualnie oczyszczony koncentrat ekstrahuje się rozpuszczalnikami nierozpuszczalnymi w wodzie przy wartości pH 7,5–8,5 w celu usunięcia witaminy B₁₂, a następnie fazę wodną ekstrahuje rozpuszczalnikami nierozpuszczalnymi w wodzie przy wartości pH = 2–4,5, albo breję fermentacyjną lub jej koncentrat traktuje się zasadowym wymieniaczem anionowym w cyklu CH, lub breję fermentacyjną lub jej koncentrat poddaje się elektrolizie, a kwas cyjanokobalamonomonokarboksylowy izoluje z roztworu otrzymanego przy każdym rodzaju rozdzielania.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że do ekstrakcji jako rozpuszczalniki polarne stosuje się: fenol, krezol, chlorowcopochodne fenolu lub niepolarne takie jak: węglowodory alifatyczne lub ich chlorowcopochodne, względnie mieszaniny wymienionych rozpuszczalników, korzystnie mieszaninę fenolu i chloroformu lub fenolu i czterochlorku węgla.
3. Sposób według zastrz. 1–2, znamieny tym, że kwas cyjanokobalamonomonokarboksylowy przeprowadza się z jego roztworu do rozpuszczalnika nierozpuszczalnego w wodzie przez wypieranie go najpierw do fazy wodnej, przez dodanie mieszaniny wody i polarnego rozpuszczalnika, przy czym otrzymany wodny roztwór oczyszcza się przez adsorpcję na węglu zwierzęcym, a następnie eluuje wodnym roztworem etanolu lub ekstrahuje rozpuszczalnikami polarnymi jak benzyna lub alkohol, a w końcu wykrystalizowuje z wodnego roztworu alkoholu lub wody.

Chinoín Gyógyszer és Vegyszéti
Termékek Gyára rt.

Zastępca: mgr Józef Kamiński
rzecznik patentowy