

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 163060 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2602/85

(51) Int.Cl.5

C 07 D 475/14

(22) Indleveringsdag: 11 jun 1985

(41) Alm. tilgængelig: 13 dec 1985

(44) Fremlagt: 13 jan 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 12 jun 1984 DE 3421714

(71) Ansøger: *BASF AKTIENGESELLSCHAFT; Carl-Bosch-Strasse 38; D-W-6700 Ludwigshafen, DE

(72) Opfinder: Johannes *Grimmer; DK, Hans Christoph *Horn; DE

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til rensning af riboflavin

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag

2602-85

Fremgangsmåden til højrensning af riboflavin (I) foretages ved opløsning i fortyndet, vandig alkalilud, eventuel rensning af den alkaliske opløsning ved behandling af opløsningen med aktivt kul eller med et med vand ikke eller kun i ringe grad blødbart opløsningsmiddel, indføring af den fremkomne alkaliske opløsning under opretholdelse af temperaturer mellem 40 og 100 °C i 90 til 100 °C varmt vand, hvortil der er tilsat så meget af en syre, at der i reaktionsblandingen indstiller sig en pH-værdi mellem 6,5 og 0,8, fastholdelse af reaktionsblandingen ved temperaturer mellem 90 og 100 °C i 10 til 80 minutter og isolation af I efter afkøling af reaktionsblandingen. Fremgangsmåden er fordelagtigere i teknisk henseende, idet der under rensningsprocessen går mindre I tabt, og idet renheden af I kan gøres større.

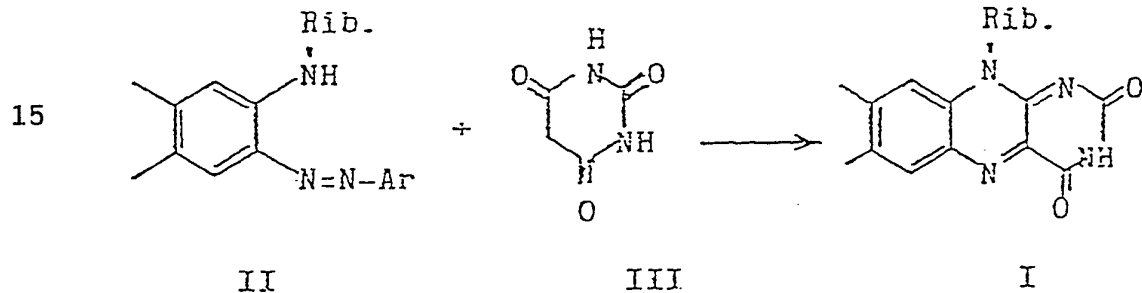
LN 103000 D

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til højrensning af rå riboflavin (formel I; vitamin B₂). Fremgangsmåden er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

5

Riboflavin fremstilles sædvanligvis som alment kendt (jvf. f.eks. W.H. Sebrell og R.S. Harris, "The Vitamins; Chemistry, Physiologie, Pathology, Methods", 2. oplag, bind 5, 1982, Academic Press, side 22) ved kondensation af et N-(D)-ribityl-2-arylazo-4,5-dimethylanilin (II) med barbitursyre (III) ad syntetisk vej.

10



20

Rib = D-ribityl
Ar = aryl, f.eks. phenyl.

Herved opnår man et råprodukt, der udover ca. 92 til 96 vægt-% I desuden indeholder forskellige forureninger, derunder f.eks. barbitursyre, dibarbitursyre, lumiflavin, lumichrom og N-(D)-ribityl-6-arylazo-4,5-dimethylanilin.

25

Også kondensationen af andre N-(D)-ribityl-4,5-dimethylanilinderivater med barbitursyrederivater til riboflavin er allerede beskrevet i Journal of Amer. Chem. Soc, Vol. 69 (1947) p 1487-92.

30

Fra litteraturen kendes desuden dannelsen af riboflavin ad biosyntetisk vej ved hjælp af mikroorganismer (Acta Mikrobiologi Polonia Ser. B (1971) bind 3 (20) nr. 1, p 29-34 og nr. 2, p 91-95 samt Bacteriol. Proc. 63 (1963)

35

p. 21).

Da rensning af riboflavin ved krystallisationsmetoder kræver et forholdsvis stort forbrug af råvaren, underkaster man i stedet det rå riboflavin en oxidativ behandling i vandigt surt milieu således som angivet i US patentskrift nr. 2 324 800, hvorefter man fraskiller eventuelt bundfald og fortynder den tilbageblevne opløsning med meget vand. Herved fremkommer riboflavinet i form af gule nåle, som derudover kun behøver at blive frafiltreret og vasket.

Det er ved denne metode en ulempe, at ca. 15% af det anvendte riboflavin går tabt ved denne rensningsmetode, at denne arbejdsmåde er tidsrøvende og omstændelig i teknisk henseende, og at den fremstillede forbindelse I stadig indeholder spor af organiske forbindelser, såsom anilin, hvilket gør anvendelsen i forbindelse med menneskelig ernæring problematisk.

Det er derfor opfindelsens formål at tilvejebringe en fremgangsmåde til højrensning af I, som overvinder ulemperne ved teknikkens kendte stadi, dvs. en fremgangsmåde, der kan udformes således, at den i teknisk henseende er fordelagtigere, ved hvilken der under rensningsprocessen går mindre I tabt, og ved hvilken der fremkommer endnu renere I.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er særligt fordelagtig, når temperaturen af den alkaliske riboflavinopløsning i reaktionstrinnene a) og b) andrager mellem ca. 10 og 50 °C, fortrinsvis dog ca. 30 til 45 °C, eller når temperaturen 50 °C højst overskrides i kort tid.

Ved rensningsmetoden ifølge opfindelsen er tabene af I betydeligt mindre end ved en rensning i sur opløsning. Dette er meget overraskende, fordi det i litteraturen om

forbindelsen I, selv i den yngste litteratur (jvf. Fermente - Hormone - Vitamine, bind III/I, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1974, side 631 og Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, bind 23, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, side 664) angives, at I er let dekomponerbar i alkalisk opløsning.

Fra US patentskrift nr. 2 603 633 kendes ganske vist en fremgangsmåde til fremstilling af tre forskellige typer af I-krystaller, hvor I-krystallerne er fremkommet ved tilsætning af syrer til en alkalisk I-opløsning ved temperaturer fra 10 til 25 °C. Forsøg på at anvende de beskrevne krystallisationsmetoder til rensning af I i teknisk målestok udviste dog ingen acceptable resultater.

I sammenligning dermed opnår man i henhold til fremgangsmåden ifølge opfindelsen riboflavin i et udbytte på 90 til 92% af den teoretiske værdi og i en renhed på over 99,5% (bestemt i henhold til Pharmakopoea Europa).

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er velegnet til højrensning af rå I med et I-indhold på ca. 10 til 99,5%, sådan som det fremkommer ved den mikrobiologiske eller syntetiske fremstillingsmåde.

Til gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen suspenderes det rå I først i vand. Man anvender her i almindelighed en vandmængde på ca. 1130 til 6580 g, men fortrinsvis ca. 1880 til 3760 g pr. mol I. Med fordel anvender man vand med en temperatur mellem 25 og 50 °C, fortrinsvis mellem 35 og 45 °C.

Til denne vandige suspension af I sætter man herefter så meget af en vandig opløsning af et alkalihydroxid, at det suspenderede I går fuldstændigt i opløsning. Som vandig opløsning af et alkalihydroxid anvender man fortrinsvis vandig KOH eller NaOH, især den i teknisk henseende let

tilgængelige og billige NaOH i form af en ca. 25% opløsning. Til opløsning af I kræves ca. 1 til 1,25 mol alkalihydroxid pr. mol I, hvilket for 25% NaOH betyder ca. 0,5 kg pr. kg I. Man kan dog også straks opløse riboflavin i fortyndet vandig alkalilud. Til dette formål anvender man en ca. 0,16 til 0,63 molær, fortrinsvis en ca. 0,28 til 0,32 molær vandig KOH eller NaOH i mængder fra ca. 17,5 til 5, fortrinsvis 10 til 9 kg pr. kg I, afhængighed af koncentrationen af den anvendte alkalilud.

10

Opløsningen af I foretages i almindelighed ved temperaturer mellem ca. 10 og 50 °C, fortrinsvis mellem 25 og 50 °C, især mellem 30 og 45 °C. Hvis I kun i kort tid udsættes for påvirkningen af den vandige alkaliske opløsning, sådan som det er tilfældet ved kontinuert gennemførelse af fremgangsmåden, kan man også anvende temperaturer, der er højere end 50 °C, f.eks. 50 til 60 °C.

15

Den fremkomne vandigt-alkaliske I-opløsning kan nu renses. Dette kan foregå ved behandling med aktivt kul og påfølgende filtrering eller ved ekstraktion med et med vand ikke eller kun dårligt blandbart indifferent opløsningsmiddel. Som aktivt kul kan man anvende praktisk talt alle de sorter deraf, der foreligger på markedet.

20

Som opløsningsmiddel for ekstraktionen kommer f.eks. ethylacetat, chloroform eller petrolether, især isobutylacetat og n-butylacetat i betragtning.

25

Ved rensningen af ad mikrobiologisk vej fremstillet rå-I foretrækker man en rensning af den vandigt-alkaliske I-opløsning ved behandling med et filterhjælpemiddel og påfølgende filtrering. Arten af filterhjælpemidlet er uden betydning. Det er udelukkende vigtigt, at man sikrer en tilstrækkeligt stor filtreringshastighed. F.eks. har Celite[®] fra firma Johns-Manville, USA vist sig velegnet.

30

35

Den fremkomne, eventuelt rensede I-opløsning indføres derpå under opretholdelse af temperaturen mellem 90 og 100 °C, fortrinsvis mellem 96 og 99 °C, i 96 til 100 °C, fortrinsvis 96 til 99 °C, varmt vand, hvortil der var
5 tilsat så meget af en syre, at der i reaktionsblandingen indstillede sig en pH-værdi mellem 6,5 og 0,8, fortrinsvis mellem 6 og 1. I særlige tilfælde, især ved rensning af ad mikrobiel vej fremstillet riboflavin, er det også muligt at indføre den eventuelt rensede I-opløsning under
10 opretholdelse af noget lavere temperaturer, dvs. mellem ca. 40 og 100 °C, i det let syrnede, varme vand.

Mængden af vandet afpasses således, at reaktionsblandingen efter tilsætning af den alkaliske opløsning indeholder ca. 18 til 30 kg vand, fortrinsvis ca. 20 til 25 kg
15 vand pr. kg I.

Som syrer, der sættes til vandet, er alle syrer velegnede, som mindst er lige så stærke som eddikesyre, dvs. har en pK_s -værdi på 4,76 eller derunder, og som ikke angriber
20 riboflavinet under reaktionsbetingelserne. Med fordel anvender man de sædvanlige mineralsyrer, såsom HCl (pK_s -værdi -6), H_2SO_4 (pK_s -værdi -3), HNO_3 (pK_s -værdi -1,32), H_3PO_4 (pK_s -værdi 2,09). Men også organiske syrer, såsom
25 myresyre (pK_s -værdi 3,77) og eddikesyre (pK_s -værdi 4,76) kan anvendes. Det har vist sig, at anvendelsen af salpetersyre er særligt fordelagtigt, fordi den åbenbart også i stærkt fortyndet vandig opløsning har en mild oxiderende indflydelse på biprodukterne i I. Ved anvendelsen af
30 HNO_3 opnår man rent I i en farve, der tydeligt, hvad angår brilliansen, adskiller sig fra den farve, der kan opnås under anvendelse af de andre syrer.

Mineralsyren anvendes i sådanne mængder, at den anvendte
35 alkalilud på den ene side neutraliseres fuldstændigt, og at opløsningen på den anden side reagerer surt, således at I med fordel og fuldstændigt udfældes. Ved rensning af

charger uden mellemliggende behandling med aktivt carbon eller ekstraktionsmiddel er det anbefalelsesværdigt at gøre chargen sur indtil en pH-værdi af under 3 for lettere at ødelægge eventuelle biprodukter under opvarmningen.

5

I almindelighed er 1,06 til 3,5 mol syre pr. mol I nødvendigt til dette formål afhængigt af den anvendte mængde alkalilud.

10 Det effektive udbytte af I ved rensningsmetoden kan forbedres yderligere derved, at man til den ifølge opfindelsen fremkomne vandigt-sure opløsning i reaktionstrin e) desuden sætter tilladte additiver til det pågældende anvendelsesformål, hvadenten det er til dyreernæring
15 eller til den farmaceutiske industri.

Den fordelagtige effekt kan man formentligt forklare på den måde, at adsorptionsforholdene af I udnyttes sådan, at man erstatter de 4 til 7% biprodukter, der er adsorberet til rå-I-materialet, med de uopløselige additiver, der er tilladt i forbindelse med dyreernæring eller i den
20 farmaceutiske industri.

Som additiver, der er tilladt i den farmaceutiske industri, kan f.eks. anføres majsstivelse, majsbladstrengemel, sojafinmel og grutet hvedeklid. Additiver, der er tilladt i forbindelse med dyreernæring, er f.eks. SiO_2 , calciumsilicat, kiselgur, steatit, talkum og bolus alba (hvidt ler). Additiverne anvender man i almindelighed i
30 mængder mellem 1 og 500 pr. kg I.

EKSEMPEL 1

Afhængighed mellem I-udbyttet og alkaliludkoncentrationen.
35

I hvert tilfælde suspenderedes 40 g riboflavin i 400 ml vand, suspensionen opvarmedes til 40 °C, i suspensionen indførte man den i tabel 1 angivne mængde af en 25% NaOH, og reaktionsblandingen blev omrørt i 15 minutter ved 40 °C. Derpå indførte man den alkaliske opløsning indenfor 20 minutter i en 98 °C varm blanding af 400 ml vand og den i tabel 1 angivne mængde af en koncentreret (37%) saltsyre, de alkaliske remanenser rensedes med vand, reaktionsblandingen omrørtes i 1 time ved 98-100 °C, blev derpå afkølet til 40 °C, bundfaldet blev frasuget og blev vasket med 400 ml 60 °C varmt vand og 200 ml methanol. Tørringen foretoges ved 80-100 °C. Udbyttet beregnedes på basis af vægten af I.

15 Tabel 1

Eks.	25% NaOH [g]	37% HCl [g]	[g]	Udbytte [% af den teoretiske værdi]
20 1a	20	30	38,7	96,75
1b	40	60	38,4	96,00
1c	60	90	37,8	94,50

EKSEMPEL 2

25 I-udbytte i afhængighed af temperaturen af den alkaliske I-opløsning.

I hvert tilfælde suspenderedes 40 g I i 400 ml vand, suspensionen blandedes med 20 g af en 25% NaOH-opløsning og opvarmedes derpå under omrøring i 15 minutter til den temperatur, der fremgår af tabel 2. Oparbejdningen af reaktionschargen samt udbyttebestemmelsen foregik analogt med eksempel 1a.

35

Tabel 2

Eks.	Temperatur [°C]	[g]	Udbytte [% af teoretisk værdi]
2a	30	38,7	96,75
2b	40	38,8	97,00
2c	50	38,4	96,00
2d	60	37,7	94,25
2e	70	34,9	87,25

5
10Eksempel 3

I-udbytte i afhængighed af HCl-koncentrationen.

15 I hvert tilfælde suspenderedes 40 g I i 400 ml vand, sus-
pensionen opvarmedes til 40 °C, 20 g af en 25% NaOH-
opløsning indførtes, og reaktionsblandingen opvarmedes i
15 minutter til 40 °C under omrøring. Derpå indførte man
indenfor 20 minutter den alkaliske opløsning i en 98 °C
20 varm blanding af 400 ml vand og den mængde af en 37% HCl,
som fremgår af tabel 3. Oparbejdningen af reaktionschar-
gen samt udbyttebestemmelsen foregik analogt med eksempel
1.

25

30

35

Tabel 3

Eks.	37% HCl [g]	[g]	Udbytte [% af teoretisk værdi]	
5	3a	30	38,9	97,25
	3b	40	38,6	96,50
	3c	50	38,3	95,75
	3d	60	38,5	96,25

10 EKSEMPEL 4

Yderligere rensning med aktivt kul.

15 40 g af et råriboflavin (93%) suspenderedes i 400 ml vand ved 40 °C, suspensionen blandedes med 20 g af en 25% NaOH og derpå med 1 g aktivt kul af type "2 S" fra firmaet Chemviron og opvarmedes under omrøring i 15 minutter til 40 °C. Derpå blev opløsningen frasuget over et G4 glasfiltersugefilter, og remanensen blev vasket med vand.

20 forenede filtrater pumpedes indenfor 30 minutter til en 98 °C varm blanding af 400 ml vand og 30 g af en 37% HCl, reaktionsblandingen opvarmedes endnu i 1 time under omrøring til 98-100 °C, derpå lod man den afkøle til 40 °C, og I blev isoleret analogt med eksempel 1a.

25

Udbyttet androg 35,7 g, svarende til 89,25% af den teoretiske værdi, renheden var 99,9% (Pharm. Europ.), anilinindholdet var ca. 3 ppm.

30 EKSEMPEL 5

Yderligere ekstraktion med iso-butylacetat.

35

I hvert tilfælde suspenderedes 40 g rå-I (93%) i 500 ml vand, suspensionen blandedes med 20 g af en 25% opløsning af NaOH, og den fremkomne opløsning omrørtes endnu i 15 minutter ved stuetemperatur (RT). Derpå udrystede man med 5 150 ml iso-butylacetat og derpå med 100 ml iso-butylacetat. Efter separation af de organiske faser indførte man den vandige alkaliske opløsning i en ca. 98 °C varm blanding af 300 ml vand og 30 g af en 37% HCl, reaktionsblandingen opvarmedes endnu i 1 time under omrøring til 98-10 100 °C, hvorpå man lod den afkøle, og der oparbejdedes analogt med eksempel 1.

Udbyttet androg 35,3 g, svarende til 88,25% af den teoretiske værdi, renheden var 100,1% (Pharm. Europ.).

15 Den fraskilte organiske fase indeholdt 1,3 g tørstof, der for ca. halvdelen vedkommende bestod af det for fremstillingen af I ubrugelige N-(D)-ribityl-6-phenyl-azo-4,5-dimethylanilin samt mange ikke nærmere undersøgte 20 produkter.

EKSEMPEL 6

Alkalisk rensning under tilsætning af majsstivelse til I.

25 40 g rå-I blev suspenderet i 400 ml vand, suspensionen blev opvarmet til 40 °C, blandet med 20 g af en 25% NaOH og derpå med 1 g aktivt kul, og den fremkomne blanding holdes under omrøring i 15 minutter ved 40 °C. Derpå fra- 30 skiltes kullet med et G-4 glasfilter, remanensen blev vasket riboflavin frit med vand, de forenede alkaliske filtrater indførtes i løbet af 8 minutter i en 98 °C varm blanding af 400 ml vand og 30 g koncentreret HCl, reaktionsblandingen blev holdt i 1 time under omrøring ved 98 35 °C, blev afkølet til 50 °C og blandet med 1,5 g majsstivelse. Efter 15 minutters omrøring ved 40 °C sugede man fra, produktet vaskedes analogt med eksempel 1a med vand

og methanol og tørredes ved 90-100 °C.

Udbyttet androg 35,3 g, svarende til et nettoudbytte på 94,9% (under hensyntagen til majsstivelsen).

5

EKSEMPEL 7 - 11

I hvert tilfælde suspenderedes den i tabel 4 viste mængde af fugtigt rå-I i 400 ml vand, suspensionen opvarmedes til den i tabellen viste temperatur og blev blandet med 20 g af en 25% NaOH. Efter 15 minutters omrøring ved den angivne temperatur indførte man den alkaliske opløsning indenfor 30 minutter i en 98% varm blanding af 400 ml vand og den i tabel 4 angivne mineralsyre, hvorved den i tabel 4 viste pH-værdi indstillede sig i reaktionsblandingen. Derpå holdt man reaktionsblandingen i 1 time under omrøring ved 98-100 °C, derpå afkøledes til 40 °C, bundfaldet blev frasuget, vasket med 400 ml 60 °C varmt vand og 200 ml methanol og tørret ved 80 til 100 °C. Udbytterne af I og renhederne af I er angivet i tabel 4. Renhederne bestemmes i henhold til forskriften fra (Pharm. Europ., bind 1).

25

30

35

Tabel 4

Eks.	Fugtigt rå-I [g]	Syre	pH-værdi	Temp. [°C]	[g]	Udbytte (% af teoretisk værdi)	Renhed [g]
7	48,7	34,8 g HNO ₃ 65%	0,85	30	35,8	95,4	100,5
8	49,1	31,0 g H ₂ SO ₄ 96%	0,84	40	35,1	93,55	100,5
9	49,1	35,1 g H ₃ PO ₄ 85%	0,98	40	35,8	95,4	>99,9
10	49,0	14 g myresyre 100%	3,5	40	34,5	92,1	>99,9
11	49,0	18,3 g iseddike	4,5	40	34,0	90,6	>99,9

EKSEMPEL 12

Rensning af ad fermentativ vej fremstillet riboflavin.

5 50 g af et ad fermentativ vej fremstillet riboflavin
(62%) og 20 g af filterhjælpemidlet Celite (standard
Super-Cel[®] fra firmaet Johns-Manville, USA) suspenderedes
i 500 ml vand ved 20 °C, suspensionen blandedes med 18 g
af en 25% vandig NaOH, der omrørtes i 15 minutter, og
10 derpå filtreredes. Filterkagen blev vasket riboflavinfri
med 200 ml vand. Vaskevandet blev forenet med moderluden,
og det hele blev indenfor 30 minutter pumpet ind i en 98
til 100 °C varm blanding af 100 ml vand og 27 g koncen-
treret saltsyre. Efter omrøring i 1 time ved 98-100 °C
15 afkølede man langsomt til 40 °C, det udskilte riboflavin
blev frasuget, vasket neutralt og tørret.

Udbyttet androg 30 g, svarende til 96,7% af den teoretis-
ke værdi, beregnet i forhold til råvaren, og renheden var
20 100,1% (Pharm. Europ.).

25

30

35

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til rensning af rått riboflavin,
5 k e n d e t e g n e t ved, at man
- a) suspenderer det riboflavin, der skal renses, i vand
og bringer det i opløsning ved tilsætning til den van-
dige opløsning af et alkalihydroxid eller opløser
10 riboflavinet i ca. 0,16 til 0,63 molær alkalilud,
- b) om ønsket renser den fremkomne alkaliske riboflavin-
opløsning, eventuelt ved behandling med aktivt kul og
efterfølgende filtrering eller ved ekstraktion med et
15 med vand ikke eller kun i ringe grad blandbart, inert
opløsningsmiddel,
- c) indfører den fremkomne alkaliske riboflavinopløsning,
under opretholdelse af en temperatur mellem 90 og 100
20 °C ved rensning af kemisk fremstillet riboflavin og
mellem 40 og 100 °C ved rensning af på mikrobiel måde
fremstillet riboflavin, i 96 til 100 °C varmt vand,
hvortil der er sat så meget af en syre med en pK_s -
værdi på 4,76 eller derunder, at der i reaktionsblan-
25 dingen indstiller sig en pH-værdi mellem 6,5 og 0,8,
- d) yderligere opvarmer reaktionsblandingen i 10 til 80
minutter, eventuelt under omrøring, til en temperatur
på 90 til 100 °C, og
30
- e) efter afkøling af reaktionsblandingen isolerer det
udkrystalliserede riboflavin.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
35 ved, at man gennemfører reaktionstrinnene a) og b) ved
temperaturer mellem 30 og 45 °C.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at man i reaktionstrin e) til reaktionsblandingen
desuden sætter additiver, der er tilladt i forbindelse
med det i hvert tilfælde foreliggende anvendelsesformål
5 til dyreernæring eller til den farmaceutiske industri.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at man ved rensning af kemisk fremstillet riboflavin
i reaktionstrin c) indfører den alkaliske riboflavinop-
10 løsning i det varme vand under opretholdelse af tempera-
turer mellem 96 og 99 °C.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at man ved rensning af på mikrobiel måde fremstillet
15 riboflavin renser den i reaktionstrin a) fremkomne alka-
liske riboflavinopløsning ved behandling med et filter-
hjælpemiddel og påfølgende filtrering.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
20 ved, at man for at rense på mikrobiel måde fremstillet
riboflavin i reaktionstrin c) sætter riboflavinopløsning-
gen til det varme vand tilsat syre under opretholdelse af
en temperatur mellem 90 og 100 °C.

25

30

35