

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4024930号

(P4024930)

(45) 発行日 平成19年12月19日(2007.12.19)

(24) 登録日 平成19年10月12日(2007.10.12)

(51) Int. Cl.

C07H 23/00

(2006.01)

F I

C07H 23/00

請求項の数 3 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平10-163976	(73) 特許権者	000004444
(22) 出願日	平成10年6月11日(1998.6.11)		新日本石油株式会社
(65) 公開番号	特開2000-1491(P2000-1491A)		東京都港区西新橋1丁目3番12号
(43) 公開日	平成12年1月7日(2000.1.7)	(74) 代理人	100103285
審査請求日	平成15年7月8日(2003.7.8)		弁理士 森田 順之
		(74) 代理人	100093540
			弁理士 岡澤 英世
		(72) 発明者	平山 隆之
			神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石
			油株式会社中央技術研究所内
		(72) 発明者	遠藤 昇
			神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石
			油株式会社中央技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビタミンB12の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ビタミンB₁₂、またはメチルコバラミン、ヒドロキソコバラミンおよび補酵素型ビタミンB₁₂から選択されるビタミンB₁₂誘導体を含む水溶液に、晶析で回収しようとするビタミンB₁₂またはビタミンB₁₂誘導体よりも水に対する溶解度が高い水溶性のイオン性化合物を添加した後、晶析することを特徴とするビタミンB₁₂またはビタミンB₁₂誘導体の精製方法。

【請求項2】

水溶性のイオン性化合物が、ギ酸、シュウ酸、酢酸、プロピオン酸、ブタン酸、ピルビン酸、クエン酸、コハク酸、フタル酸、フマル酸、オキサミン酸、グルコン酸、リンゴ酸、マレイン酸、マロン酸、マンデル酸、酒石酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、ジエチルバルビツル酸、乳酸、酪酸、ケイ皮酸、グリシン、グリオキシル酸、ジメチルグリシンおよびエチレンジアミン四酢酸から選択される有機化合物のナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩あるいはマグネシウム塩、AgF、AgNO₃、AlCl₃、Al(NO₃)₃、Al₂(SO₄)₃、BaCl₂、CaCl₂、Ca(ClO₄)₂、Ca(NO₂)₂、Ca(NO₃)₂、CdCl₂、CoCl₂、Co(ClO₃)₂、Co(ClO₄)₂、Co(NO₃)₂、Cr(NO₃)₃、Cr(NO₃)₃、CrO₃、CsCl、Cs₂SO₄、CuBr₂、CuCl₂、Cu(NO₃)₂、FeCl₂、FeBr₂、FeCl₃、KClO₄、KBr、K₂CO₃、KCl、K₂CrO₄、KF、K₂HPO₄、KI、KNO₃、K₃PO₄、K₂SO₃、LiBr、LiCl、MgBr₂

10

20

、 $\text{Mg}(\text{ClO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 MgSO_4 、 NH_4Br 、 NH_4Cl 、 NH_4F 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaBr 、 NaBrO_3 、 NaCl 、 NaClO 、 NaClO_4 、 NaH_2PO_4 、 NaNO_2 、 NaNO_3 、 NaOH 、 NiBr 、 NiCl_2 、 NiSO_4 、 SbCl_3 、 SeO_2 、 SrBr_2 、 SrCl_2 、 ZnBr_2 、 ZnCl_2 、 $\text{Zn}(\text{ClO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ および ZnSO_4 から選択される 1 種または 2 種以上の化合物であることを特徴とする請求項 1 に記載の精製方法。

【請求項 3】

ビタミン B_{12} またはビタミン B_{12} 誘導体を含有する水溶液に対する水溶性のイオン性化合物の添加量が、10～80 重量%であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の精製方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はビタミン B_{12} および／またはビタミン B_{12} 誘導体の精製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ビタミン B_{12} やその誘導体は、近年合成または抽出により多量に製造され市販されているが、各種の方法で製造された粗製のビタミン B_{12} やメチルコバラミン、ヒドロキソコバラミン、補酵素型ビタミン B_{12} 等のビタミン B_{12} 誘導体を精製するに際しては、最終工程として一般に再結晶法が採用されている。

20

再結晶を行う場合、ビタミン B_{12} やその誘導体は、水への溶解度が非常に大きいため、純水を溶媒に使用した冷却晶析法を採用すると、回収率が低下し、製造コストが高くなるという問題がある。

熱を加えて濃縮率を上げ、水単独溶媒から晶析することも理論的には可能であるが、実際には、濃縮後半の高濃度雰囲気下では加熱による分解が生じたり、あるいは水溶液の粘度が上がりすぎて晶析槽への仕込みおよび濾過操作が煩雑になるといった問題がある。

そのため、通常は水とメタノール、アセトン、ジオキサンといったような水溶性有機溶媒を併用した冷却晶析あるいは再沈殿が行われているのが現状である。例えば、メタノールを使う方法は、特公昭 46-8862 号公報、特公昭 46-43389 号公報などに、アセトンを使う方法は、特公昭 45-38059 号公報、特公昭 46-14664 号公報、特公昭 47-34720 号公報、特公昭 50-38120 号公報、特公昭 51-120 号公報、特開昭 64-16597 号公報などに開示されている。

30

しかし、有機溶媒を併用した場合には、得られた結晶中に有機溶媒が混入し、これが人体に悪影響を与える懸念がある。こうしたことから、結晶から有機溶媒を除去する方法等も提案されている。例えば、特開昭 49-18896 公報には、水蒸気を飽和させた密閉容器中にアセトンを含む補酵素型ビタミン B_{12} の結晶を入れ、室温または加熱しながら数時間～数日間放置したり、あるいは水蒸気飽和の空気を通風することによりアセトン含有量を 0.1% に低減させる方法が記載されている。

しかしながら、そのような手段を採っても、結晶に含まれる有機溶媒を完全に除去することは実際上不可能であり、コスト的にも割高になってしまうのが実状である。

40

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは上記した従来技術の実状に鑑みて、有機溶剤を全く使用することなく、溶剤に水だけを使い、かつ、回収率の高いビタミン B_{12} および／またはビタミン B_{12} 誘導体の精製方法を開発すべく鋭意検討した結果、遂に本発明を完成させた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明に係る精製方法は、ビタミン B_{12} および／またはビタミン B_{12} 誘導体を含有する水溶液に、水溶性のイオン性化合物を添加した後、晶析することを特徴とする。

50

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、本発明についてさらに詳しく説明する。

本発明の方法で精製されるビタミンB₁₂、すなわち、シアノコバラミンは、通常、補酵素型ビタミンB₁₂生産菌を用いて発酵により生産された補酵素型ビタミンB₁₂をシアン化処理することにより得られるが、本発明の方法はこれ以外の方法で得られたビタミンB₁₂の精製にももちろん適用可能である。

本発明で言うビタミンB₁₂誘導体には、メチルコバラミン、ヒドロキシコバラミン、補酵素型ビタミンB₁₂等が含まれる。

補酵素型ビタミンB₁₂は、工業的には、通常シアノコバラミンまたはヒドロキシコバラミンを原料にして化学的に製造される。シアノコバラミンを原料にする場合には、5'-トシルアデノシンと反応させて合成する方法がある（特公昭45-38059号公報、特公昭52-24040号公報参照）。また、ヒドロキシコバラミンを原料にする場合には、5'-デオキシ-5'-ハロゲノアデノシンと反応させて合成する方法（特公昭45-6273号公報、特公昭46-29154号公報参照）や、5'-トシルアデノシンと反応させて合成する（特公昭52-24040号公報参照）がある。

ヒドロキシコバラミンは、工業的には、シアノコバラミンを原料にして化学的に合成するか、発酵液から直接製造される。シアノコバラミンを原料にする場合には、亜鉛と接触させる方法（特公昭39-18418号公報、特公昭46-14664号公報）と、Pd触媒と接触させる方法がある。また、発酵液から直接製造方法は、特開平5-86089号公報に記載されている。

メチルコバラミンの製造方法としては、特開昭47-34720号公報、特開昭57-27119号公報に記載されているように、シアノコバラミンを原料にするか、特開昭47-34720号公報、特開昭50-38120号公報、特開昭51-120号公報に記載されているように、ヒドロキシコバラミンを原料にして、亜鉛等の還元剤とCH₃MgBr、あるいはシュウ酸モノメチルエステルを反応させて化学的に合成する方法が例示できる。

【0006】

本発明の精製方法を実施するに際し、ビタミンB₁₂および／またはビタミンB₁₂誘導体を含有する水溶液が有機溶媒を含む場合には、蒸留や膜分離などの手段で、あらかじめ水溶液中の有機溶媒含有量を1000ppm以下に減少させておくことが好ましい。また、水溶液中に含まれるビタミンB₁₂および／またはビタミンB₁₂誘導体の濃度が著しく低い場合には、濃縮しておくことも好ましく採用される。水溶液中に含まれるビタミンB₁₂および／またはビタミンB₁₂誘導体の量は、水溶液1リットル当たり、通常は10～500g、好ましくは50～300gの範囲に調整される。

本発明によれば、ビタミンB₁₂および／またはビタミンB₁₂誘導体を含有する水溶液は、通常40～90℃、好ましくは、50～80℃に加温され、これに水溶性のイオン性化合物が添加される。水溶性イオン性化合物の添加量は、特に限定されないが、ビタミンB₁₂および／またはビタミンB₁₂誘導体を含有する水溶液に対して、通常10～80重量%、好ましくは20～70重量%の範囲で選択される。水溶性イオン性化合物の添加量を選定するに際しては、晶析で最終的に到達する最低温度でも添加したイオン性化合物が析出しない量を、予め見積もっておくことが好ましい。

また、イオン性化合物を添加した後に水溶液が強アルカリ性になっている場合には、塩酸、硫酸、酢酸、シュウ酸、ギ酸等の酸類を添加して水溶液を中性付近に維持することが好ましい。

【0007】

本発明で用いられる水溶性のイオン性化合物としては、イオン性有機化合物および／またはイオン性無機化合物が挙げられる。

これらの水溶性のイオン性化合物は、晶析で回収しようとするビタミンB₁₂および／またはその誘導体よりも、水に対する溶解度または分散性が高く、結晶性が乏しければ、特に制限はないが、通常は100℃以下でそれ自身が分解や重合等の変性を起こさず、かつ

10

20

30

40

50

、ビタミンB₁₂またはその誘導体との反応性を持たないものが好ましい。

イオン性有機化合物としては、例えば、ギ酸、シュウ酸、酢酸、プロピオン酸、ブタン酸、ピルビン酸、クエン酸、コハク酸、フタル酸、フマル酸、オキサミン酸、グルコン酸、リンゴ酸、マレイン酸、マロン酸、マンデル酸、酒石酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、ジエチルバルビツル酸、乳酸、酪酸、ケイ皮酸、グリシン、グリオキシル酸、ジメチルグリシン、エチレンジアミン四酢酸等のナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩あるいはマグネシウム塩などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、イオン性無機化合物としては、例えば、AgF, AgNO₃, AlCl₃, Al(NO₃)₃, Al₂(SO₄)₃, BaCl₂, CaCl₂, Ca(ClO₄)₂, Ca(NO₂)₂, Ca(NO₃)₂, CdCl₂, CoCl₂, Co(ClO₃)₂, Co(ClO₄)₂, Co(NO₃)₂, Cr(NO₃)₃, Cr(NO₃)₃, CrO₃, CsCl, Cs₂SO₄, CuBr₂, CuCl₂, Cu(NO₃)₂, FeCl₂, FeBr₂, FeCl₃, KClO₄, KBr, K₂CO₃, KCl, K₂CrO₄, KF, K₂HPO₄, KI, KNO₃, K₃PO₄, K₂SO₃, LiBr, LiCl, MgBr₂, Mg(ClO₃)₂, Mg(ClO₄)₂, Mg(NO₃)₂, MgSO₄, NH₄Br, NH₄Cl, NH₄F, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₃, (NH₄)₂SO₄, NaBr, NaBrO₃, NaCl, NaClO, NaClO₄, NaH₂PO₄, NaNO₂, NaNO₃, NaOH, NiBr, NiCl₂, NiSO₄, SbCl₃, SeO₂, SrBr₂, SrCl₂, ZnBr₂, ZnCl₂, Zn(ClO₃)₂, Zn(NO₃)₂, ZnSO₄等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。必要に応じてこれらのイオン性有機化合物または無機化合物を2種類以上混合して使用してもよい。

【0008】

イオン性化合物が添加された溶液は、次に、液温を通常0～30℃、好ましくは5～25℃の範囲に徐々に冷却され、これによってビタミンB₁₂および／またはビタミンB₁₂誘導体が晶析する。

なお、結晶の粒径を揃えるために晶析前に種晶を溶液に添加しておいてもよい。

冷却によって析出した結晶は吸引濾過し、結晶の周りに付着している水が乾燥しないうちに、すみやかに冷水で洗浄するのが好ましい。洗浄した結晶は通常減圧乾燥して製品化する。

このようにして精製したビタミンB₁₂またはその誘導体は、結晶中に有機溶媒を全く含まず、しかも水を単独溶媒に使用する方法と比べて著しくビタミンB₁₂またはその誘導体の回収率を向上させることができるので、本発明の工業的な価値は極めて高い。

【0009】

【実施例】

以下に実施例を述べるが、本発明はこれらに制限されるものではない。

実施例1

ビタミンB₁₂を15.5g含む水溶液930mlを加熱して60℃に昇温したあと、攪拌しながらゆっくりフタル酸ナトリウム0.5水和物740gを加えた。そのまま攪拌を続けながら、1N塩酸水溶液を添加してpH7に調整した。攪拌しながら10時間かけて60℃から10℃まで冷却し、さらに10℃で3時間放置した。析出した結晶を10ミクロンメッシュフィルターを使って吸引濾過したあと、直ちに8℃冷水30mlで洗浄し、40℃で10時間減圧乾燥した。回収率は89%であった。日本薬局方に基づいて製品純度を求めた結果、97%で合格品であった。

比較例1

フタル酸ナトリウムと1N塩酸水溶液の添加を省略した以外は実施例1と同様にしてビタミンB₁₂の回収を行った。その結果、回収率が36%にとどまった。

実施例2

補酵素型ビタミンB₁₂を13.0g含む水溶液620mlを加熱して60℃に昇温したあと、攪拌しながらゆっくり酢酸ナトリウム3水和物540gを加えた。そのまま攪拌を続けながら、酢酸を添加してpH7に調整した。攪拌しながら10時間かけて60℃から10℃まで冷却し、さらに10℃で3時間放置した。析出した結晶を10ミクロンメッシュフィルターを使って吸引ろ過したあと、直ちに8℃冷水30mlで洗浄し、40℃で10時間減圧乾燥した。回収率は73%であった。シアン化して製品純度を求めた結果、96%であった。

10

20

30

40

50

比較例 2

酢酸ナトリウムと酢酸の添加を省略した以外は実施例 2 と同様にして補酵素型ビタミン B₁₂ の回収を行った。その結果、回収率は 25 % にとどまった。

実施例 3

ヒドロキシコバラミン 12.5 g 含む水溶液 310 ml を加熱して 60 °C に昇温したあと、攪拌しながらゆっくり塩化ナトリウム 75 g を加えた。そのまま攪拌を続けながら、酢酸を添加して pH 6 に調整した。攪拌しながら 10 時間かけて 60 °C から 10 °C まで冷却し、さらに 10 °C で 3 時間放置した。析出した結晶を 10 ミクロンメッシュフィルターを使って吸引濾過したあと、直ちに 8 °C 冷水 30 ml で洗浄し、40 °C で 10 時間減圧乾燥した。回収率は 71 % であった。日本薬局方に基づいて酢酸定性試験を行った結果、酢酸の存在が確認され、さらに同方法に基づいて製品純度を求めた結果、98 % で合格品であった。

10

比較例 3

塩化ナトリウムの添加を省略した以外は実施例 3 と同様にしてヒドロキシコバラミンの回収を行ったところ、結晶は全く回収されなかった。

実施例 4

メチルコバラミン 11.0 g 含む水溶液 690 ml を加熱して 60 °C に昇温したあと、攪拌しながらゆっくり酪酸カルシウム 1 水和物 122 g を加えた。攪拌しながら 10 時間かけて 60 °C から 10 °C まで冷却し、さらに 10 °C で 3 時間放置した。析出した結晶を 10 ミクロンメッシュフィルターを使って吸引濾過したあと、直ちに 8 °C 冷水 30 ml で洗浄し、40 °C で 10 時間減圧乾燥した。回収率は 91 % であった。シアン化して製品純度を求めた結果、97 % であった。

20

比較例 4

酪酸カルシウムの添加を省略した以外は実施例 4 と同様にしてメチルコバラミンの回収を行った。その結果、回収率は 41 % にとどまった。

【0010】

【発明の効果】

本発明の精製方法により精製されたビタミン B₁₂ および／またはその誘導体は、結晶中に有機溶媒を全く含まない。また、本発明の精製方法は、水のみを溶媒に使用する従来法に比較して、ビタミン B₁₂ および／またはその誘導体の回収率が著しく高い。

30

フロントページの続き

(72)発明者 水田 美能
神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内

審査官 伊藤 幸司

(56)参考文献 特開昭49-018896 (JP, A)
特開昭59-095299 (JP, A)
特開昭59-095298 (JP, A)
英国特許第00816426 (GB, B)
英国特許第00833067 (GB, B)
英国特許第00718454 (GB, B)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07H23/00
CAPLUS(STN)
REGISTRY(STN)