

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 3 月 4 日 (04.03.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/036384 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 7/02 (2006.01)

[CN/CN]; 中国福建省厦门市海沧新阳工业
区, Fujian 361022 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/093960

(22) 国际申请日: 2020 年 6 月 2 日 (02.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910812709.4 2019 年 8 月 30 日 (30.08.2019) CN

(71) 申请人: 厦门金达威维生素有限公司 (XIAMEN
KINGDOMWAY VI TAMIN INC.) [CN/CN]; 中
国福建省厦门市海沧区新昌路 35 号, Fujian
361022 (CN)。 厦门金达威集团股份有限公
司 (XIAMEN KINGDOMWAY GROUP COMPANY)

(72) 发明人: 蔡育森 (CAI, Yusen); 中国福建省厦
门市海沧新阳工业区, Fujian 361022 (CN)。 余
曦 (YU, Xi); 中国福建省厦门市海沧新阳工业
区, Fujian 361022 (CN)。 何剑洋 (HE, Jianyang);
中国福建省厦门市海沧新阳工业区, Fujian
361022 (CN)。 王志强 (WANG, Zhiqiang); 中
国福建省厦门市海沧新阳工业区, Fujian 361022
(CN)。 许德兴 (XU, Dexing); 中国福建省厦
门市海沧新阳工业区, Fujian 361022 (CN)。 魏
高宁 (WEI, Gaoning); 中国福建省厦门市海沧
新阳工业区, Fujian 361022 (CN)。

(74) 代理人: 厦门市精诚新创知识产权代
理有限公司 (XIAMEN JINGCHENGXINCHUANG

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING VITAMIN D₃

(54) 发明名称: 一种维生素 D₃ 的提纯方法

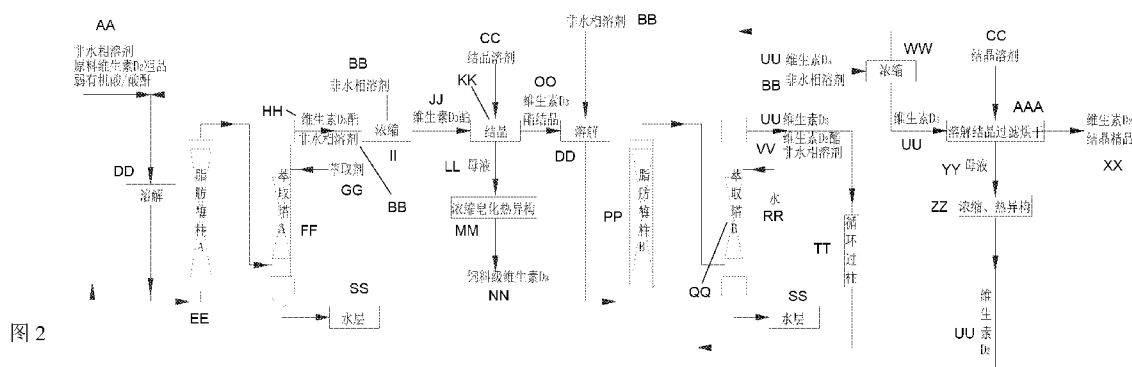


图 2

AA NON-AQUEOUS SOLVENT, CRUDE VITAMIN D₃ AS A RAW MATERIAL,
WEAK ORGANIC ACID/ANHYDRIDE
BB NON-AQUEOUS SOLVENT
CC CRYSTALLIZATION SOLVENT
DD DISSOLVING
EE LIPASE COLUMN A
FF EXTRACTION TOWER A
GG EXTRACTANT
HH, JJ VITAMIN D₃ ESTER
II, WW CONCENTRATION
KK CRYSTALLIZATION
LL, YY MOTHER LIQUOR

MM CONCENTRATION, SAPONIFICATION AND THERMAL ISOMERIZATION
NN FEED-GRADE VITAMIN D₃
OO VITAMIN D₃ ESTER CRYSTAL
PP LIPASE COLUMN B
QQ EXTRACTION TOWER B
RR WATER
SS AQUEOUS LAYER
TT COLUMN FOR CIRCULATING THROUGH
UU VITAMIN D₃
VV VITAMIN D₃ ESTER, NON-AQUEOUS SOLVENT
XX FINE VITAMIN D₃ CRYSTAL
ZZ CONCENTRATION AND THERMAL ISOMERIZATION
AAA DISSOLVING, CRYSTALLIZATION, FILTRATION AND DRYING

(57) Abstract: Disclosed is a method for purifying vitamin D₃, the method involving: mixing crude vitamin D₃ as a substrate with a weak organic acid or anhydride in a non-aqueous solvent, subjecting same to esterification with lipase column A and extraction with an extractant, concentrating the resulting organic layer, then adding a crystallization solvent to dissolve same, then reducing the temperature for crystallization, and filtering and drying same to obtain a vitamin D₃ ester crystal; re-dissolving same, subjecting same to saponification with lipase

INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO. LTD);
中国福建省厦门市思明区软件园二期观日路
54号601单元, Fujian 361000 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

column B and extraction, returning the resulting organic layer to the lipase column B for saponification and extracting same, and continuing the cycle until the vitamin D₃ ester residue in the organic layer is < 1 wt%; finally subjecting the organic layer to concentration, crystallization and drying to obtain a fine vitamin D₃ crystal; and treating the crystallization mother liquor for reuse as the substrate.

(57) 摘要: 公开了一种维生素D₃的提纯方法: 以维生素D₃粗品为底物, 在非水相溶剂中与弱有机酸或酸酐混合, 通过脂肪酶柱A酯化, 萃取剂萃取, 将得到的有机层进行浓缩, 然后加入结晶溶剂溶解后降温结晶, 过滤、烘干得到维生素D₃酯结晶; 再溶解后, 通过脂肪酶柱B皂化, 萃取, 将得到的有机层重回脂肪酶柱B皂化, 萃取, 直至有机相中维生素D₃酯残存<1wt%后, 停止循环; 最后将有机层进行浓缩、结晶、烘干, 得维生素D₃结晶精品; 结晶的母液处理后作为底物重新利用。

一种维生素 D₃ 的提纯方法

技术领域

本发明涉及维生素领域，尤其涉及一种维生素 D₃ 的提纯方法。

背景技术

维生素 D₃，又名胆骨化醇，具有促进肠道钙吸收、调节钙与磷的代谢、诱导骨质钙磷沉着的生理功能，可促进骨骼生长、防止佝偻病，大剂量也用于皮肤结核、皮肤及粘膜各型红斑狼疮等。

光化反应合成的维生素 D₃ 含有副反应生成的速甾醇、光甾醇以及残余原料 7-去氢胆固醇，一般仅能得到 2000-3000 万 IU/g 的维生素 D₃，这些副产物因结构相似，性质相近，较难进一步分离、提纯。

目前维生素 D₃ 提纯方法主要有化学法和柱层析法，另外还有超临界 CO₂ 柱分离法。化学法，例如 US3157678A，原理是把光照产物制成相应的酯，利用酯化后物质结构差异引起的在溶剂中的溶解度差异，通过多次的结晶将杂质分离，再皂化为维生素 D₃，而后进一步结晶提纯得到食品级维生素 D₃，酯化反应剂主要为各类酰氯。采用化学法提纯维生素 D₃，所用的酯化原料苯甲酰氯或丁酰氯等原料毒性大，过程中产生较多难处理的废水和废渣，另外化学法合成过程相对剧烈，收率也偏低，US3157678A 所述方法为文献记载化学法最高收率，做到维生素 D₃ 丁酯结晶步骤收率为 72%。柱层析法，例如 US3367950A，则是需要用层析柱分离，用大量溶剂进行洗脱得到主段，再浓缩更换溶剂进行结晶，得到高单位维生素 D₃。柱层析法需要使用大量的溶剂进行洗脱，后续回收溶剂量较大，能耗高，过柱也会产生较多的固废，且整体收率不高，工业化成本大于化学法。超临界 CO₂ 柱分离法，例如 CN1240209A 中提到的超临界法则是通过色谱柱使用超临界或液态二氧化碳，选用改性溶剂作流动相，改性硅胶作固定相进行分离，设备压力在 7.0~15.0MPa。超临界柱分离法需要使用 7MPa 以上的高压设备，设备安全性要求高，且需要较贵的改性硅胶，工业化成本高，难以工业化应用。

发明内容

本发明的目的在于提供一种高收率、低成本、环境友好的维生素 D₃ 的提纯方法。

为实现上述目的，本发明提供一种维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，包括如下步骤：

S1. 以维生素 D₃ 粗品为底物，在非水相溶剂中与弱有机酸或酸酐混合，通过脂肪酶柱 A 进行酯化反应，得到含维生素 D₃ 酯的酯化液；

S2. 将所得含维生素 D₃ 酯的酯化液用萃取剂进行萃取，残余酸进入水层，维生素 D₃ 酯进入有机层，将有机层进行浓缩得到浓缩的维生素 D₃ 酯；

S3. 将浓缩的维生素 D₃ 酯加入结晶溶剂溶解后降温结晶，过滤、烘干得到维生素 D₃ 酯结晶；任选的，结晶的母液经浓缩、皂化、热异构后得到饲料级维生素 D₃；

S4. 将所得的维生素 D₃ 酯结晶用非水相溶剂溶解后，通过脂肪酶柱 B 进行皂化反应，得皂化液；将皂化液用水进行萃取，分离出的有机酸进入水层，有机层重回脂肪酶柱 B 再次皂化水解残存的维生素 D₃ 酯，重复循环皂化-水解的步骤 2~5 次直至有机相中维生素 D₃ 酯残存 < 1wt% 后，停止循环；

S5. 将有机层进行浓缩、结晶、烘干，得维生素 D₃ 结晶精品；

任选的，结晶的母液经浓缩、热异构后作为 S1 步骤的底物利用。

进一步，所述 S1 步骤中的维生素 D₃ 粗品的含量为 1500-3500IU/g；

任选的，所述 S1 步骤中的底物与非水相溶剂的重量体积比为 1g: (5~30) ml，优选 1g: 8 ml。

任选的，所述 S1 步骤和 S4 步骤中，所述的非水相溶剂各自独立地为烷烃、卤代烃或芳香烃；优选的，所述烷烃选自正己烷、戊烷、庚烷、环己烷和石油醚中的至少一种。

进一步，所述 S1 步骤中，底物与弱有机酸的摩尔比为 1: (1.0~10)；优选的，所述底物与弱有机酸的摩尔比为 1: 1.1；

任选的，所述弱有机酸为丁酸、戊酸或月桂酸。

进一步，所述 S1 步骤中，所述酸酐为正丁酸酐、丁二酸酐或戊酸酐；

任选的，所述底物与酸酐的摩尔比为 1: (0.5~5)；优选的，所述底物与酸酐的摩尔比为 1: 0.55；

任选的，所述酯化反应的温度为 20~50℃，优选 35℃；

任选的，所述通过脂肪酶柱 A 时物料在柱内的停留时间为 0.5~5 小时，优选的，为 1

小时。

进一步，所述 S2 步骤中，所述萃取剂为水或含水甲醇；优选的，所述含水甲醇中甲醇的体积含量为 0~98%，更优选的，所述含水甲醇中甲醇的体积含量为 95%；

任选的，所述萃取剂与含维生素 D₃ 酯的酯化液的进料体积比为(0.2~3):1；优选的，所述萃取剂与含维生素 D₃ 酯的酯化液的进料体积比为 0.8: 1。

进一步，所述 S2 步骤和 S4 步骤中的萃取操作在萃取塔中进行。

进一步，所述 S3 步骤中，所述结晶溶剂为酮类或醇类溶剂；优选的，所述结晶溶剂为丙酮；

任选的，所述结晶的温度为-5~-30℃，优选的，所述结晶的温度为-20℃；

任选的，浓缩的维生素 D₃ 酯与结晶溶剂的比例为 1g: (0.7~5) ml，优选 1g: 1ml。

进一步，所述 S4 步骤中，所述维生素 D₃ 酯结晶与非水相溶剂的质量体积比例为 1g: (2~30) ml，优选 1g: 5ml；

任选的，所述皂化反应的温度为 20~50℃，优选 35℃。

进一步，所述 S5 步骤中，所述结晶的溶剂为甲酸甲酯或者乙酸乙酯，任选的，所述结晶的温度为 0~10℃，保温 3 小时以上；

任选的，所述有机层进行浓缩所得的浓缩物与结晶溶剂的质量体积比例为 1g: (4~20) ml，优选 1g: 6 ml。

进一步，所述 S1 步骤和 S4 步骤中，所述脂肪酶柱 A 和脂肪酶柱 B 中的脂肪酶为经固定化处理的南极假丝酵母脂肪酶 B，优选的，各自独立地为诺维信 435 固定化脂肪酶，或采用 CN105462952A 中公开的固定化方法处理的南极假丝脂肪酶 B；

优选的，所述 S1 步骤中，所述底物与脂肪酶柱 A 中的脂肪酶的质量比为 1: (0.2~30)，优选 1: (0.5-2)；

任选的，所述 S4 步骤中，所述维生素 D₃ 酯结晶与脂肪酶柱 B 中的脂肪酶的质量比为 1: (0.2~30)，优选 1: (0.5-2)。

本发明可处理的底物原料可选为 1500-3500IU/g 范围。含量太低酯化结晶效果差，且容易使酶活较快下降，影响脂肪酶套用次数，含量太高则可能不需要酯化，可通过结晶直接提纯。

本发明针对目前工业化成本相对较低的化学合成法存在问题进行改进，创新性地采用了酶酰化法进行维生素 D₃ 酯化反应，然后经过结晶提纯得到纯度较高的维生素 D₃ 酯，接着利用酶酰化反应的可逆性，将维生素 D₃ 酯结晶用酶皂化为维生素 D₃，最后结晶得到高单位维生素 D₃。本发明使用酶法进行酯化、皂化，不再使用毒性大的原料，且酶可重复使用，部分原料能够回收，循环利用，无固废排放，符合绿色化学理念，由于酶酰化反应更温和，收率较化学法有所提高，工业化应用成本更低。

全过程维生素 D₃ 结晶收率 50~75.3%，加上各结晶母液中的维生素 D₃，折纯维生素 D₃ 回收率为 90~97%，即全过程维生素 D₃ 损耗 3~10%。

所述脂肪酶柱 A 和脂肪酶柱 B 为不锈钢或其他耐溶剂材质管道加工圆柱形柱子，外形如附图 1 所示但尺寸不限于附图标注，进出口放置滤纸和脱脂棉花防止酶被溶液带出，所用脂肪酶为经固定化处理的南极假丝酵母脂肪酶 B，例如可以为诺维信 435 固定化脂肪酶 (Novozym^R435)，或者采用 CN105462952A 中公开的固定化方法处理的南极假丝脂肪酶 B。脂肪酶套用次数达 40 次以上。

所述维生素 D₃ 结晶检测根据 2015 年版《中国药典》方法检测比旋度和吸收系数，根据《中国药典》通则 0722 维生素 D 测定法测定产品含量。

本发明采用脂肪酶法进行维生素 D₃ 的酯化，在非水相溶剂中维生素 D₃ 原料与过量弱有机酸或酸酐混合，使用脂肪酶进行酯化反应。

本发明采用萃取塔萃取去除反应多余的酸。经分离后多余酸可继续套用于酯化。

本发明利用酶酯化反应的可逆性，在非水相溶剂中使用脂肪酶皂化水解维生素 D₃ 酯，并结合萃取塔萃取出水解产出的酸，有机相循环通过脂肪酶柱，促进可逆反应朝水解方向进行，最终使水解率达 99% 以上。萃取出有机酸经分离后可套用至酯化反应，达到循环利用。

本发明的有益效果：

1、本发明创造性的采用脂肪酶法替代原化学法对原料维生素 D₃ 进行酯化，避免使用高毒、强腐蚀性的苯甲酰氯、丁酰氯等原料。

2、反应采用脂肪酶酯化、皂化，过程较化学法温和，收率明显提高。仅酯化结晶步骤较化学法最高的 72% 提高了 8% 以上。

3、反应萃取的水层中酸可分离后回收使用，相对于化学法，没有难处理的废渣和较多

有害的废水排放，脂肪酶可多次循环使用，符合绿色环保的新工业需求。

4、利用脂肪酶酯化的可逆性，结合萃取塔，循环过柱水解，替代化学法使用强碱进行水解，过程更温和，水解出的酸可回收使用，减少原料使用。

5、本发明产出的维生素 D₃ 结晶精品的单位超过 3900 万 IU/g，检测指标符合《中国药典》要求。

综上所述，相较原来工业化成本最低的化学法，本发明收率更高，无高毒原料使用，原料可大部分循环使用，避免废渣和难处理废水的排放，是一种更绿色环保，成本更低更经济的维生素 D₃ 提纯方法。

附图说明

图 1 是本发明的具体实施方式的脂肪酶柱 A 和脂肪酶柱 B 的结构示意图。

图 2 是本发明的具体实施方式的流程简图。

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

以下实施例结合附图 1-2 进行说明和理解。

图 2 中若采用的非水相溶剂密度高于萃取剂时（如采用的非水相溶剂为卤代烃），萃取塔变为有机相上进下出，水相下进上出。

实施例 1

在溶解釜内投入树脂状维生素 D₃ 粗品（单位 2550 万 IU/g）20g（0.052mol），加入 5.04g（0.057mol）丁酸，160ml 正己烷溶解，用泵以 0.65ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 A（停留时间 1h），过柱温度 35℃，得到酯化液，转化率 99.5%，用泵按甲醇水：酯化液体积流量比 0.8：1 分别往萃取塔 A 打入 95% 含水甲醇和酯化液进行萃取，

得到上层有机相，控制内温小于 35℃浓缩干，浓缩得到的正己烷可重复利用，得到维生素 D₃ 酯，用 24ml 丙酮溶解后缓慢降温至-20℃，静置 3 小时，过滤洗涤烘干得到 98.8%维生素 D₃ 酯 12.79g，维生素 D₃ 酯总收率 83.8%。母液浓缩干后皂化异构得饲料级维生素 D₃ 832.8 万 IU/g，重量 6.89g。维生素 D₃ 酯 12.79g 用 64ml 正己烷溶解后按 1ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；萃取后有机相重新按 1ml/min 流量通过脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；如此循环 3 次后，取样检测维生素 D₃ 酯残存<1wt%后停止过柱，萃取剩余溶液后得到有机相，有机相 35℃以下浓缩后得维生素 D₃ 11.40g，单位 3688 万 IU/g，皂化收率 98.4%，浓缩得到的正己烷可重复利用。维生素 D₃ 加入乙酸乙酯 69ml 溶解，通过洁净过滤器过滤后，开始缓慢降温结晶，降温至 5℃后，保温 3 小时，过滤，用冷乙酸乙酯洗涤后，烘干结晶，得到 9.61g 维生素 D₃ 结晶精品，单位 3995 万 IU/g，比旋度+110°，吸收系数 471。母液浓缩异构后得维生素 D₃ 脚料 1.79g，单位 2042 万 IU/g，套用至酯化步骤。全过程维生素 D₃ 结晶收率 75.3%，加上各结晶母液所含维生素 D₃，折纯维生素 D₃ 回收率 96.7%。

实施例 2

在溶解釜内投入树脂状维生素 D₃ 粗品（单位 2550 万 IU/g）20g（0.052mol），加入 6.87g（0.078mol）丁酸，160ml 正己烷溶解，用泵以 0.65ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 A（停留时间 1h），过柱温度 35℃，得到酯化液，转化率 99.8%，用泵按甲醇水：酯化液体积流量比 0.8：1 分别往萃取塔 A 打入 95%含水甲醇和酯化液进行萃取，得到上层有机相，控制内温小于 35℃浓缩干，浓缩得到的正己烷可重复利用，得到维生素 D₃ 酯，用 24ml 丙酮溶解后缓慢降温至-20℃，静置 3 小时，过滤洗涤烘干得到 98.6%维生素 D₃ 酯 12.50g，维生素 D₃ 酯总收率 81.8%。母液浓缩干后皂化异构得饲料级维生素 D₃ 839.73 万 IU/g，重量 6.91g。维生素 D₃ 酯 12.50g 用 63ml 正己烷溶解后按 1ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；萃取后有机相重新按 1ml/min 流量通过脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；如此循环 3 次后，取样检测维生素 D₃ 酯残存<wt 1%后停止过柱，萃取剩余溶液后得到有机相，有机相 35℃以下浓缩后得维生素 D₃ 11.34g，单位 3624 万 IU/g，

皂化收率 98.5%，浓缩得到的正己烷可重复利用。维生素 D₃ 加入乙酸乙酯 68ml 溶解，通过洁净过滤器过滤后，开始缓慢降温结晶，降温至 5℃ 后，保温 3 小时，过滤，用冷乙酸乙酯洗涤后，烘干结晶，得到 9.48g 维生素 D₃ 结晶精品，单位 3942 万 IU/g，比旋度 +111°，吸收系数 473。母液浓缩异构后得维生素 D₃ 脚料 1.86 g，单位 2007 万 IU/g，套用至酯化步骤。全过程维生素 D₃ 结晶收率 73.2%，加上各结晶母液中维生素 D₃，折纯维生素 D₃ 回收率 95.0%。

实施例 3

在溶解釜内投入树脂状维生素 D₃ 粗品（单位 2550 万 IU/g）20g（0.052mol），加入 4.52g（0.029mol）丁酸酐，160ml 正己烷溶解，用泵以 0.65ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 A（停留时间 1h），过柱温度 35℃，得到酯化液，转化率 99.6%，用泵按甲醇水：酯化液体积流量比 0.8：1 分别往萃取塔 A 打入 95% 含水甲醇和酯化液进行萃取，得到上层有机相，控制内温小于 35℃ 浓缩干，浓缩得到的正己烷可重复利用，得到维生素 D₃ 酯，用 24ml 丙酮溶解后缓慢降温至 -20℃，静置 3 小时，过滤洗涤烘干得到 98.8% 维生素 D₃ 酯 12.80g，维生素 D₃ 酯总收率 83.9%。母液浓缩干后皂化异构得饲料级维生素 D₃ 833.2 万 IU/g，重量 6.89g。维生素 D₃ 酯 12.8g 用 64ml 正己烷溶解后按 1ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；萃取后有机相重新按 1ml/min 流量通过脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；如此循环 3 次后，取样检测维生素 D₃ 酯残存 < wt 1% 后停止过柱，萃取剩余溶液后得到有机相，有机相 35℃ 以下浓缩后得维生素 D₃ 11.51g，单位 3661 万 IU/g，皂化收率 98.5%，浓缩得到的正己烷可重复利用。维生素 D₃ 加入乙酸乙酯 69ml 溶解，通过洁净过滤器过滤后，开始缓慢降温结晶，降温至 5℃ 后，保温 3 小时，过滤，用冷乙酸乙酯洗涤后，烘干结晶，得到 9.62g 维生素 D₃ 结晶精品，单位 3970 万 IU/g，比旋度 +111°，吸收系数 477。母液浓缩异构后得维生素 D₃ 脚料 1.82g，单位 2015 万 IU/g，套用至酯化步骤。全过程维生素 D₃ 结晶收率 75.4%，加上各结晶母液中维生素 D₃，折纯维生素 D₃ 回收率 96.9%。

实施例 4

在溶解釜内投入树脂状维生素 D₃ 粗品（单位 2550 万 IU/g）20g（0.052mol），加入 6.58g（0.042mol）丁酸酐，160ml 正己烷溶解，用泵以 0.65ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 A（停留时间 1h），过柱温度 35℃，得到酯化液，转化率 99.8%，用泵

按甲醇水：酯化液体积流量比 0.8：1 分别往萃取塔 A 打入 95%含水甲醇和酯化液进行萃取，得到上层有机相，控制内温小于 35℃浓缩干，浓缩得到的正己烷可重复利用，得到维生素 D₃ 酯，用 24ml 丙酮溶解后缓慢降温至 -20℃，静置 3 小时，过滤洗涤烘干得到 98.5%维生素 D₃ 酯 12.51g，维生素 D₃ 酯总收率 81.8%。母液浓缩干后皂化异构得饲料级维生素 D₃ 820.79 万 IU/g，重量 6.84g。维生素 D₃ 酯 12.51g 用 63ml 正己烷溶解后按 1ml/min 流量通过含 20g 诺维信 435 的 DN10×500 脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；萃取后有机相重新按 1ml/min 流量通过脂肪酶柱 B，过柱温度 35℃，过柱后泵打入萃取塔 B 中用水萃取分离；如此循环 3 次后，取样检测维生素 D₃ 酯残存 <wt 1%后停止过柱，萃取剩余溶液后得到有机相，有机相 35℃以下浓缩后得维生素 D₃ 11.34g，单位 3610 万 IU/g，皂化收率 98.2%，浓缩得到的正己烷可重复利用。维生素 D₃ 加入乙酸乙酯 68ml 溶解，通过洁净过滤器过滤后，开始缓慢降温结晶，降温至 5℃后，保温 3 小时，过滤，用冷乙酸乙酯洗涤后，烘干结晶，得到 9.23g 维生素 D₃ 结晶精品，单位 3935 万 IU/g，比旋度 +110°，吸收系数 474。母液浓缩异构后得维生素 D₃ 脚料 1.96g，单位 2051 万 IU/g，套用至酯化步骤。全过程维生素 D₃ 结晶收率 72.4%，加上各结晶母液中维生素 D₃，折纯维生素 D₃ 回收率 94.2%。

实施例 5

酯化溶剂使用 400ml，其余同实施例 1，酯化得到 99.0%维生素 D₃ 丁酯 12.40g，最终得到维生素 D₃ 结晶精品 9.43g，单位 3956 万 IU/g，比旋度 +107°，吸收系数 480。结晶总收率 73.3%，维生素 D₃ 总回收率 93.9%。

实施例 6

酯化用丁酸改为戊酸 5.84g (0.057mol)，其余同实施例 1，酯化得到 98.8%维生素 D₃ 戊酯 12.03g，最终得到维生素 D₃ 结晶精品 8.34g，单位 3962 万 IU/g，比旋度 +108°，吸收系数 469。结晶总收率 64.8%，维生素 D₃ 总回收率 91.9%。

实施例 7

过柱温度改用 45℃，其余同实施例 1，酯化得到 99.0%维生素 D₃ 丁酯 12.23g，最终得到维生素 D₃ 结晶精品 9.22g，单位 3945 万 IU/g，比旋度 +108°，吸收系数 475。结晶总收率 71.3%，维生素 D₃ 总回收率 91.5%。

实施例 8

脂肪酶用量改 10g，其余同实施例 1，酯化转化率为 98.5%，得到 99.1%维生素 D₃ 丁酯 12.36g；皂化水解步骤循环 4 次后检测合格最终得到维生素 D₃ 结晶精品 9.30g，单位 3979 万 IU/g，比旋度+110°，吸收系数 483。结晶总收率 72.5%，维生素 D₃ 总回收率 93.48%。

实施例 9

脂肪酶用量改 10g，其余同实施例 3，酯化转化率较实施例 1 变为 98.8%，得到 99.2%维生素 D₃ 丁酯 12.61g；皂化水解步骤循环 4 次后检测合格最终得到维生素 D₃ 结晶精品 9.51g，单位 3980 万 IU/g，比旋度+109°，吸收系数 479。结晶总收率 74.2%，维生素 D₃ 总回收率 95.19%。

以上实施例采用脂肪酶柱 A 和脂肪酶柱 B 为 DN10 不锈钢管道加工的 DN10×500 柱子进出口放置滤纸和棉花防止酶带出，所用酶为诺维信 435 脂肪酶，酶活 10000U/g。以实施例 1 方案做酶套用实验 40 次，酶仍有较高效率，脂肪酶柱 A 检测酶活 7230U/g，脂肪酶柱 B 检测酶活 8243U/g。水洗萃取塔为实验室玻璃塔节加丝网填料搭建而成，其余过滤、浓缩等步骤均为实验室常用仪器。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权 利 要 求 书

1、一种维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，包括如下步骤：

S1. 以维生素 D₃ 粗品为底物，在非水相溶剂中与弱有机酸或酸酐混合，通过脂肪酶柱 A 进行酯化反应，得到含维生素 D₃ 酯的酯化液；

S2. 将所得含维生素 D₃ 酯的酯化液用萃取剂进行萃取，残余酸进入水层，维生素 D₃ 酯进入有机层，将有机层进行浓缩得到浓缩的维生素 D₃ 酯；

S3. 将浓缩的维生素 D₃ 酯加入结晶溶剂溶解后降温结晶，过滤、烘干得到维生素 D₃ 酯结晶；

S4. 将所得的维生素 D₃ 酯结晶用非水相溶剂溶解后，通过脂肪酶柱 B 进行皂化反应，得皂化液；将皂化液用水进行萃取，分离出的有机酸进入水层，有机层重回脂肪酶柱 B 再次皂化水解残存的维生素 D₃ 酯，重复循环皂化-水解的步骤 2~5 次直至有机相中维生素 D₃ 酯残存 < 1wt% 后，停止循环；

S5. 将有机层进行浓缩、结晶、烘干，得维生素 D₃ 结晶精品。

2、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，S3 步骤中结晶的母液经浓缩、皂化、热异构后得到饲料级维生素 D₃。

3、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，S5 步骤中结晶的母液经浓缩、热异构后作为 S1 步骤的底物利用。

4、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中的维生素 D₃ 粗品的含量为 1500-3500IU/g。

5、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，所述 S1 步骤中的底物与非水相溶剂的重量体积比为 1g: (5~30) ml。

6、如权利要求 5 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中的底物与非水相溶剂的重量体积比为 1g: 8 ml。

7、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，所述 S1 步骤和 S4 步骤中，所述的非水相溶剂各自独立地为烷烃、卤代烃或芳香烃。

8、如权利要求 7 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述烷烃选自正己烷、戊烷、庚烷、环己烷和石油醚中的至少一种。

9、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，底物与弱有机酸的摩尔比为 1: (1.0~10)。

10、如权利要求 9 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述底物与弱有机酸的摩尔比为 1: 1.1。

11、如权利要求 10 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述弱有机酸为丁酸、戊酸或月桂酸。

12、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，所述酸酐为正丁酸酐、丁二酸酐或戊酸酐。

13、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，所述底物与酸酐的摩尔比为 1: (0.5~5)。

14、如权利要求 13 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述底物与酸酐的摩尔比为 1: 0.55。

15、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，所述酯化反应的温度为 20~50℃。

16、如权利要求 15 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述酯化反应的温度为 35℃。

17、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，所述通过脂肪酶柱 A 时物料在柱内的停留时间为 0.5~5 小时。

18、如权利要求 17 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述通过脂肪酶柱 A 时物料在柱内的停留时间为 1 小时。

19、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S2 步骤中，所述萃取剂为水或含水甲醇。

20、如权利要求 19 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述含水甲醇中甲醇的体积含量为 0~98%。

21、如权利要求 20 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述含水甲醇中甲醇的体积含量为 95%。

22、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S2 步骤中，所述萃取剂与含维生素 D₃ 酯的酯化液的进料体积比为(0.2~3):1。

23、如权利要求 22 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述萃取剂与含维生素 D₃ 酯的酯化液的进料体积比为 0.8: 1。

24、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S2 步骤和 S4 步骤中的萃取操作在萃取塔中进行。

25、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S3 步骤中，所述结晶溶剂为酮类或醇类溶剂。

26、如权利要求 25 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述结晶溶剂为丙酮。

27、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S3 步骤中，所述结晶的温度为-5~-30℃。

28、如权利要求 27 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述结晶的温度为-20℃。

29、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S3 步骤中，浓缩的维生素 D₃ 酯与结晶溶剂的比例为 1g: (0.7~5) ml。

30、如权利要求 29 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述浓缩的维生素 D₃ 酯与结晶溶剂的比例为 1g: 1ml。

31、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S4 步骤中，所述维生素 D₃ 酯结晶与非水相溶剂的质量体积比例为 1g: (2~30) ml。

32、如权利要求 31 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述维生素 D₃ 酯结晶与非水相溶剂的质量体积比例为 1g: 5ml。

33、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S4 步骤中，所述皂化反应的温度为 20~50℃。

34、如权利要求 33 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述皂化反应的温度为 35℃。

35、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S5 步骤中，所述结晶的溶剂为甲酸甲酯或者乙酸乙酯。

36、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S5 步骤中，所述结晶的温度为 0~10℃，保温 3 小时以上。

37、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S5 步骤中，所述有机层进行浓缩所得的浓缩物与结晶溶剂的质量体积比例为 1g: (4~20) ml。

38、如权利要求 37 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述有机层进行浓缩所得的浓缩物与结晶溶剂的质量体积比例为 1g: 6 ml。

39、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤和 S4 步骤中，所述脂肪酶柱 A 和脂肪酶柱 B 中的脂肪酶为经固定化处理的南极假丝酵母脂肪酶 B，或采用 CN105462952A 中公开的固定化方法处理的南极假丝脂肪酶 B。

40、如权利要求 39 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述脂肪酶柱 A 和脂肪酶柱 B 中的脂肪酶为各自独立地为诺维信 435 固定化脂肪酶。

41、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S1 步骤中，所述底物与脂肪酶柱 A 中的脂肪酶的质量比为 1: (0.2~30)。

42、如权利要求 41 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述底物与脂肪酶柱 A 中的脂肪酶的质量比为 1: (0.5-2)。

43、如权利要求 1 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述 S4 步骤中，所述维生素 D₃ 酯结晶与脂肪酶柱 B 中的脂肪酶的质量比为 1: (0.2~30)。

44、如权利要求 43 所述维生素 D₃ 的提纯方法，其特征在于，所述维生素 D₃ 酯结晶与脂肪酶柱 B 中的脂肪酶的质量比为 1: (0.5-2)。

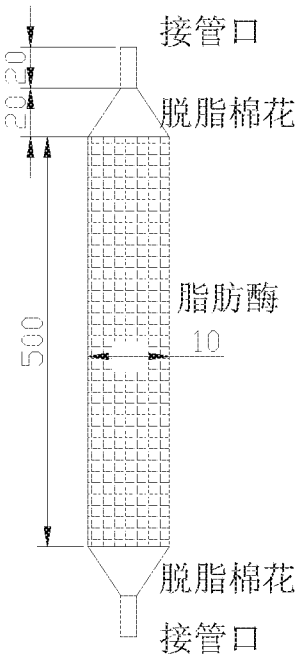
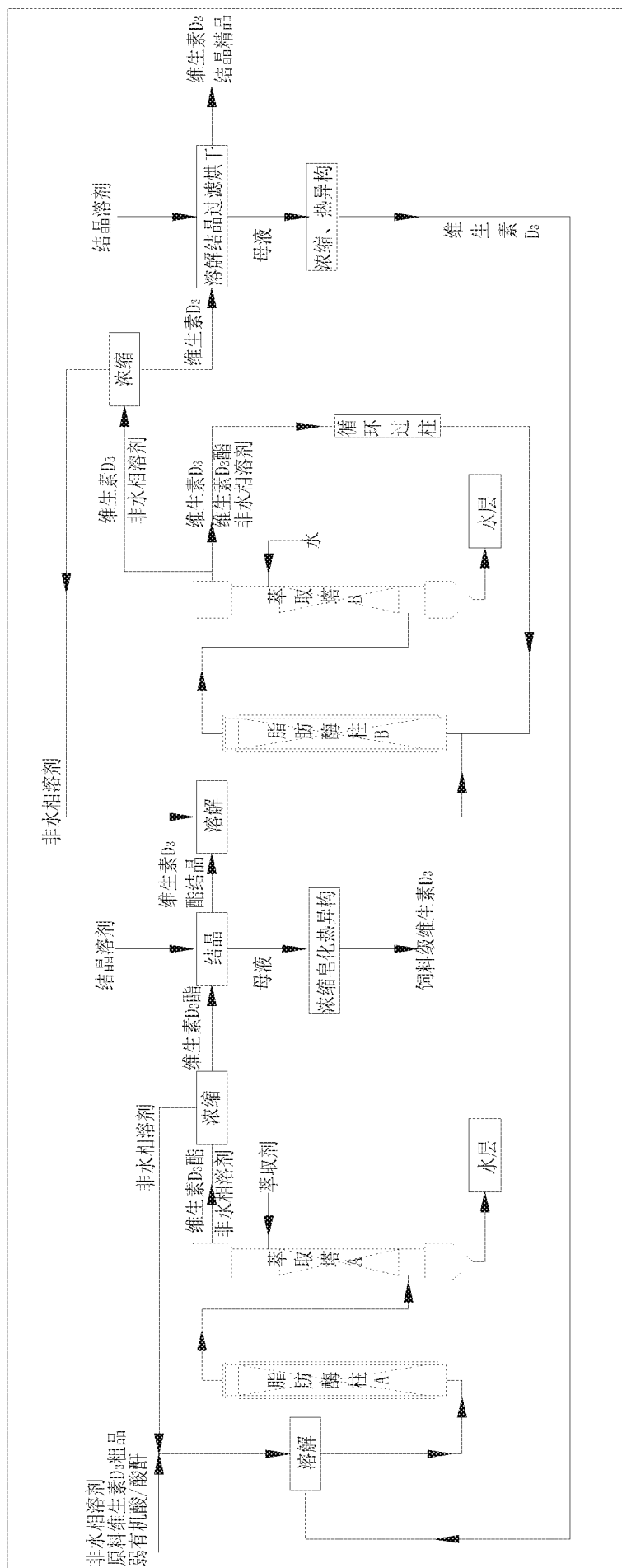


图 1

2


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/093960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ISI web of science: 维生素D3, 胆骨化醇, 酯化, 皂化, 脂肪酶, 纯化, vitamin, saponif+, esterif+, lipase, purif+ et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110527700 A (XIAMEN KINGDOMWAY VITAMIN CO., LTD.; XIAMEN KINGDOMWAY GROUP COMPANY) 03 December 2019 (2019-12-03) claims 1-10	1-44
A	US 3157678 A (PHILIPS CORP.) 17 November 1964 (1964-11-17) description column 1 line 67- column 3 line 21	1-44
A	CN 1223639 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 21 July 1999 (1999-07-21) abstract, claims 1-29	1-44
A	CN 1240209 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD.) 05 January 2000 (2000-01-05) abstract, and claims 1-6	1-44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 August 2020

Date of mailing of the international search report

28 August 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/093960

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110527700	A	03 December 2019	None			
US	3157678	A	17 November 1964	None			
CN	1223639	A	21 July 1999	AT	325788	T	15 June 2006
				IL	127861	D0	28 October 1999
				HK	1018438	A1	29 September 2006
				TW	I247001	B	11 January 2006
				US	2007225513	A1	27 September 2007
				CN	1637017	A	13 July 2005
				EP	0924199	B1	10 May 2006
				US	6831183	B2	14 December 2004
				US	7323580	B2	29 January 2008
				ES	2264164	T3	16 December 2006
				TW	200502205	A	16 January 2005
				AU	717568	B2	30 March 2000
				US	7235679	B2	26 June 2007
				CN	1276927	C	27 September 2006
				KR	20050008861	A	21 January 2005
				EP	1693363	A3	16 May 2012
				CA	2259339	A1	08 January 1998
				EP	1693363	A2	23 August 2006
				US	2005009794	A1	13 January 2005
				DE	69735845	T2	28 December 2006
				KR	100487269	B1	03 May 2005
				CN	1216861	C	31 August 2005
				EP	0924199	A1	23 June 1999
				IL	127861	A	01 June 2004
				CA	2259339	C	21 April 2009
				US	2006217354	A1	28 September 2006
				US	2003018206	A1	23 January 2003
				AU	3107397	A	21 January 1998
				TW	584627	B	21 April 2004
				WO	9800397	A1	08 January 1998
				US	6448421	B1	10 September 2002
				EP	0924199	A4	28 July 1999
				DE	69735845	D1	14 June 2006
				US	2002111503	A1	15 August 2002
CN	1240209	A	05 January 2000	KR	20000006347	A	25 January 2000
				US	2001001801	A1	24 May 2001
				EP	0969001	A3	14 September 2005
				CN	1144782	C	07 April 2004
				CA	2275557	A1	23 December 1999
				EP	0969001	A2	05 January 2000
				BR	9903274	A	16 May 2000
				JP	2000053640	A	22 February 2000

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/093960

A. 主题的分类

C12P 7/02 (2006.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ISI web of science和检索词:维生素D3, 胆骨化醇, 酯化, 皂化, 脂肪酶, 纯化, vitamin, saponif+, esterif+, lipase, purif+, 等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110527700 A (厦门金达威维生素有限公司 厦门金达威集团股份有限公司) 2019年12月 3日 (2019 - 12 - 03) 权利要求1-10	1-44
A	US 3157678 A (PHILIPS CORP) 1964年 11月 17日 (1964 - 11 - 17) 说明书第1栏第67行-第3栏第21行	1-44
A	CN 1223639 A (中外制药株式会社) 1999年 7月 21日 (1999 - 07 - 21) 摘要, 权利要求1-29	1-44
A	CN 1240209 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2000年 1月 5日 (2000 - 01 - 05) 摘要, 权利要求1-6	1-44

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 8月 5日

国际检索报告邮寄日期

2020年 8月 28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

王颖

电话号码 86-(10)-62412197

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/093960

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110527700	A	2019年 12月 3日	无			
US	3157678	A	1964年 11月 17日	无			
CN	1223639	A	1999年 7月 21日	AT	325788	T	2006年 6月 15日
				IL	127861	D0	1999年 10月 28日
				HK	1018438	A1	2006年 9月 29日
				TW	1247001	B	2006年 1月 11日
				US	2007225513	A1	2007年 9月 27日
				CN	1637017	A	2005年 7月 13日
				EP	0924199	B1	2006年 5月 10日
				US	6831183	B2	2004年 12月 14日
				US	7323580	B2	2008年 1月 29日
				ES	2264164	T3	2006年 12月 16日
				TW	200502205	A	2005年 1月 16日
				AU	717568	B2	2000年 3月 30日
				US	7235679	B2	2007年 6月 26日
				CN	1276927	C	2006年 9月 27日
				KR	20050008861	A	2005年 1月 21日
				EP	1693363	A3	2012年 5月 16日
				CA	2259339	A1	1998年 1月 8日
				EP	1693363	A2	2006年 8月 23日
				US	2005009794	A1	2005年 1月 13日
				DE	69735845	T2	2006年 12月 28日
				KR	100487269	B1	2005年 5月 3日
				CN	1216861	C	2005年 8月 31日
				EP	0924199	A1	1999年 6月 23日
				IL	127861	A	2004年 6月 1日
				CA	2259339	C	2009年 4月 21日
				US	2006217354	A1	2006年 9月 28日
				US	2003018206	A1	2003年 1月 23日
				AU	3107397	A	1998年 1月 21日
				TW	584627	B	2004年 4月 21日
				WO	9800397	A1	1998年 1月 8日
				US	6448421	B1	2002年 9月 10日
				EP	0924199	A4	1999年 7月 28日
				DE	69735845	D1	2006年 6月 14日
				US	2002111503	A1	2002年 8月 15日
CN	1240209	A	2000年 1月 5日	KR	20000006347	A	2000年 1月 25日
				US	2001001801	A1	2001年 5月 24日
				EP	0969001	A3	2005年 9月 14日
				CN	1144782	C	2004年 4月 7日
				CA	2275557	A1	1999年 12月 23日
				EP	0969001	A2	2000年 1月 5日
				BR	9903274	A	2000年 5月 16日
				JP	2000053640	A	2000年 2月 22日