

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 特 許 公 報 ( B 2 )

(11) 特許番号

特許第3315158号  
(P3315158)

(45) 発行日 平成14年 8 月19日 (2002. 8. 19)

(24) 登録日 平成14年 6 月 7 日 (2002. 6. 7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I
C 0 7 K 5/02		C 0 7 K 5/02
1/18		1/18

請求項の数 1 (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平4-232627	(73) 特許権者	000142252 株式会社興人 東京都中央区日本橋室町4丁目1番21号
(22) 出願日	平成4年8月10日 (1992. 8. 10)	(72) 発明者	渡辺 幸一 大分県佐伯市大字二栄古江1218番地の2
(65) 公開番号	特開平6-56884	(72) 発明者	片岡 勝幸 大分県佐伯市字野岡11772の81
(43) 公開日	平成6年3月1日 (1994. 3. 1)	(72) 発明者	妹尾 義巳 大分県佐伯市字野岡11772の81
審査請求日	平成11年3月31日 (1999. 3. 31)	(72) 発明者	川畑 隆志 大分県佐伯市大字鶴望字白濁3823
		(72) 発明者	小嶋 孝司 大分県佐伯市字野岡11772の81
		(72) 発明者	松井 勝明 大分県佐伯市大字池田1411-4
		(72) 発明者	日野 忠行 東京都三鷹市下連雀6-14-6-23

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グルタチオンの精製法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルタチオンを含む液を弱塩基性陰イオン交換樹脂に通した後、酢酸水溶液でグルタチオンを溶離し、次いで溶離液を別の弱塩基性陰イオン交換樹脂に通液することにより酢酸を除くこと、並びに酢酸を除くための弱塩基性陰イオン交換樹脂のイオン交換基がポリアミンであることを特徴とするグルタチオンの精製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はグルタチオンの精製法に関するものである。一般にグルタチオンは酵母及び動物の肝臓などに広く分布しており、生体内の酸化還元系に関与しているトリペプチドで、肝機能回復作用や解毒作用などの重要な役割を果たす医薬上極めて有用な物質である。

2

【0002】

【従来の技術】 従来、グルタチオンの精製法としては以下の方法が知られている。

- 1) 硫酸酸性下亜酸化銅と銅塩を形成させる方法。
- 2) 強酸性陽イオン交換樹脂に吸着させ、酸または塩により溶離する方法 (特公昭44-239号、特公昭45-4755号、特公昭46-2838号)。
- 3) 弱塩基性陰イオン交換樹脂を通過させる方法 (特公昭45-27797号)
- 4) スチレン-ジビニルベンゼン共重合体よりなる多孔性非極性樹脂を使用する方法 (特開昭49-126889号、特開昭52-100421号)。
- 5) 弱塩基性陰イオン交換樹脂に吸着後、酢酸で溶離する方法 (特開昭61-282397号)。

【0003】

10

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来提案された上記 1) ~ 4) の方法によるグルタチオンの精製は、不純物であるシステインや  $\gamma$ -グルタミルシステインを除去できないという欠点があり、一方、5) の方法は精製は十分に行えるものの、溶離液として酢酸水溶液を使用するため、結晶化時に酢酸が大量に含有されるという欠点があった。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは酢酸を含有しない高純度のグルタチオンを工業的に製造する方法において鋭意研究を行った結果、ポリアミンをイオン交換基とする弱塩基性陰イオン交換樹脂にグルタチオンを含む液を通すことにより、酢酸を含有しない高純度のグルタチオンを取得することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至ったものである。即ち、本発明は酢酸を含有しないか、もしくは酢酸含量が極めて低い、高純度のグルタチオンの精製法を提供するものである。

【0005】以下本発明について詳しく述べる。本発明に使用されるグルタチオン含有液は、酵母などの微生物よりの抽出液、サルベージ合成により得られる反応液またはそれらの部分精製液等生化学的反應により得られるグルタチオン含有液であればいずれにも用いられる。本発明に用いられる一段目の弱塩基性陰イオン交換樹脂は、イオン交換基が 3 級アミンを有するものが好ましく、更に、弱塩基性陰イオン交換樹脂のイオン形は酢酸形、ギ酸形、遊離形またはそれらの混合形が用いられる。中でも酢酸形または酢酸形と遊離形との混合形が特に好ましい。硫酸形及び塩酸形の場合はグルタチオンを殆ど吸着せず好ましくない。酢酸を除くための二段目の弱塩基性陰イオン交換樹脂は、イオン交換基がポリアミンであり、そのイオン形は遊離形である。使用されるイオン交換樹脂の例としては、ダウエックス WGR - 2 (ダウケミカル社製)、アンバーライト IRA - 60E (ロームアンドハース社製) 等を挙げることが出来る。

【0006】上記グルタチオン含有液を酢酸形または酢酸形と遊離形の弱塩基性陰イオン交換樹脂を詰めたカラムに、通液速度 (SV) 0.5 ~ 3 で通液してグルタチオンを吸着させる。適量の水で洗浄した後、酢酸溶液、続いて水を通液してグルタチオンを溶出させる。この時一段目の弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムの下端よりグルタチオンの溶出が認められると同時に、溶出液を二段目のポリアミンを交換基とする陰イオン交換樹脂を詰めたカラムに導く。二段目のカラムよりの溶出液中のグルタチオン及び酢酸の濃度推移を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) またはその他の適当な方法で測定する事によって、最初にグルタチオンが溶出し、続いて酢酸が溶出する事がわかる。溶出液の適当な分画部を集めることによって、酢酸を全く含まないか、もしくは酢酸濃度が非常に低いグルタチオン溶液を得ることができる。得られたグルタチオン溶液を濃縮し、次いで結晶

化や凍結乾燥することにより高純度のグルタチオンを製造することができる。

## 【0007】

【実施例】次に実施例により具体的に本発明を説明するが、これによって本発明が制限されるものではない。なお、本実施例中グルタチオンの定量法はヨード法及びグリオキサラーゼ法 (「メソッド・イン・エンザイモロジー」第 1 巻 540 頁、アカデミックプレス社、1955 年版) で行った。また HPLC の測定条件は以下の通りである。

1. カラム: TSK gel ODS - 80 - TM、長さ: 15 cm、内径: 4.6 mm
2. 緩衝液: 0.686% リン酸二水素カリウム及び 0.025% 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む 3% メタノール水溶液、PH 3.0
3. 流速: 1.0 ml/min.
4. 検出器: UV 検出器 (波長 210 nm)

## 【0008】実施例 1

キャンディダ・ウチルス KJS - 0582 株 (FERM P - 7396 株) の培養菌体 700 g (乾燥時換算) を熱水抽出し、除菌後常法により銅塩を形成させ、硫化水素で脱銅することにより、グルタチオン 30.5 g (グリオキサラーゼ法) を含む溶液 500 ml を得た。該グルタチオン含有液を酢酸形とした弱塩基性陰イオン交換樹脂ダイヤイオン WA 30 (三菱化成工業製) を詰めたカラム (内径 4.5 mm、高さ 180 mm) に、SV = 1 で通液し、500 ml の水で洗浄した。次いで 6.0% の酢酸水溶液 260 ml を用い SV = 1 で溶離した。さらに水で溶離を続けた。カラムよりグルタチオンの溶出が始まると同時に、直列に接続した弱塩基性陰イオン交換樹脂ダウエックス WGR - 2 (ダウケミカル社製) を詰めたカラム (内径 30 mm、高さ 170 mm) に通液する。本カラムクロマトグラフィーにおけるグルタチオン及び酢酸の溶離の様子を図 1 に示す。得られたグルタチオン画分を減圧濃縮することにより結晶グルタチオン 22.0 g を得た。得られた結晶グルタチオンを HPLC で分析した結果、 $\gamma$ -グルタミルシステインや酢酸を殆ど含んでいなかった。その測定結果を表 1 に示す。また、得られた結晶グルタチオンの HPLC チャートを図 2 に示す。

## 比較例

実施例 1 と同様にして得られたカラム処理前の液を、酢酸形とした弱塩基性陰イオン交換樹脂ダイヤイオン WA 30 を詰めたカラム (内径 4.5 mm、高さ 180 mm) に、SV = 1 で通液し、500 ml の水で洗浄した。次いで 6.0% の酢酸水溶液 260 ml 更に水を用い SV = 1 で溶離しグルタチオン画分 400 ml を得た。グルタチオンを含む画分をそのまま減圧濃縮し、結晶化することにより、結晶グルタチオン 24.4 g を得た。得られた結晶グルタチオンを HPLC で分析した結果、 $\gamma$ -

5

グルタミルシステイン及びシステインは含まないものの多量の酢酸の混入が認められた。この様にして得られた結晶グルタチオン及び実施例 1 で得られた結晶グルタチオンについて、H P L C で測定したグルタチオンの純度\*

6

\* 及びグルタチオン中に含まれる酢酸の濃度を表 1 に示す。

【 0 0 0 9 】

【 表 1 】

試 料	H P L C 純度 (%)	酢酸濃度 ( P P M )
本発明による結晶グルタチオン	9 8 . 5	1 0
比較例で得られた結晶グルタチオン	9 8 . 1	4 5 0

【 0 0 1 0 】

【 図 1 】

【 0 0 1 1 】

【 図 2 】

【 0 0 1 2 】

【 発明の効果 】 以上説明してきたように、本発明の精製法によればグルタミルシステイン等の不純物を含まず、且つ酢酸をほとんど含有しないグルタチオンを工業的に有利に取得することが出来る。

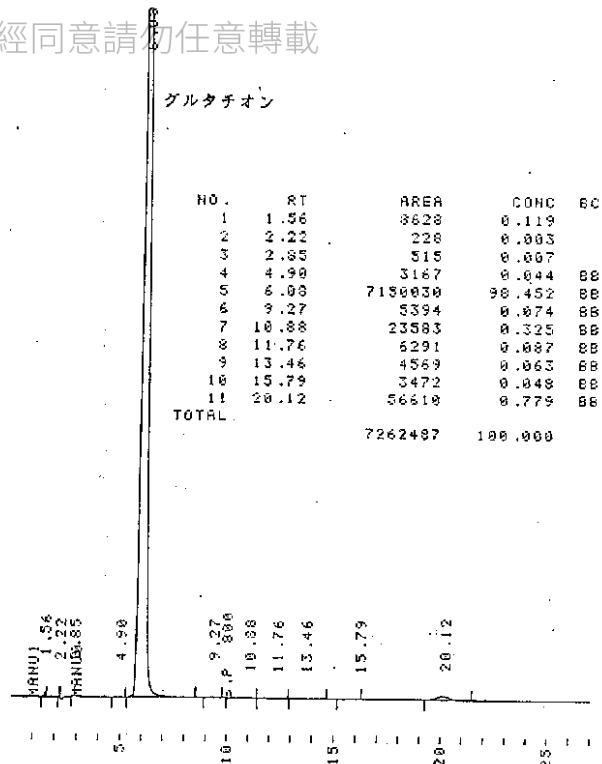
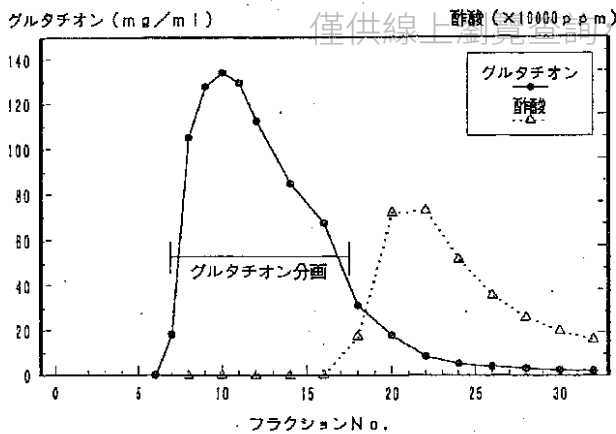
【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 弱塩基性陰イオン交換樹脂ダウエックス W G R - 2 によるグルタチオン含有液の分画の様子を示したものである。

【 図 2 】 弱塩基性陰イオン交換樹脂ダウエックス W G R - 2 により分画したグルタチオン画分を減圧濃縮することにより得られた結晶グルタチオンの H P L C 測定チャートを示したものである。

【 図 1 】

【 図 2 】



フロントページの続き

審査官 鈴木 恵理子

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

C07K 1/14 - 1/22

C07K 5/02



僅供線上瀏覽查詢，未經同意請勿任意轉載