

(11) Pátento numeris: **3238**

(51) Int.Cl.⁵: **B01D 17/038**

(21) Paraiškos numeris: **IP1891**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 03 04**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 10 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 04 25**

(31,32,33) Prioritetas: **93 03251, 1993 03 22, FR**

(72) Išradėjas:

Andre Durand, FR
Alain Gerbaud, FR
Rodolphe Margraff, FR

(73) Patento savininkas:

RHONE-POULENC RORER S.A., 20, avenue Raymond Aron, 92160 Antony, FR

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabollėnė, 7, UAB "Metlda", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Taksoidų valymo būdas

(57) Referatas:

Taksoidų (taksotero, 10-deacetil-bakatino III) valymo būdas, panaudojant centrifuginę padalinimo chromatografiją.

Šis išradimas skirtas taksoidų valymo būdui, panaudojant centrifuginę padalinimo chromatografiją.

5 Tiksliau, šis išradimas skirtas taksotero ir 10-deacetil-bakatino III valymo būdui.

10-deacetil-bakatinas III, išskirtas iš kukmedžio lapų, yra naudojamas gauti taksoterui, kurio gavimo sąlygos yra aprašytos, pavyzdžiui, Europos patentuose Nr. 10 0253738 arba Nr. 0335841, arba tarptautinėje paraiškoje PCT WO 92/09589.

10-deacetil-bakatinas III, gautas ekstrahuojant kukmedžio lapus, priklausomai nuo kukmedžio veislės, iš 15 kurio jis yra išskiriamas, turi priemaišų, kurios pagrindinai yra produktai, priklausantys taksoidų grupei, tokių kaip, pavyzdžiui, 2α -benzoil-4-aceto-ksi- 5β ,20-epoksi- 1β ,7 β ,10 β ,13 α ,19-pentahidroksi-9-okso-11-taksenas, 2α -benzoiloksi-4-acetoksi- 5β ,20-epoksi- 20 1β ,7 α ,10 β ,13 α -tetrahidroksi-11-taksenas, arba toksinų.

Taksotere, gautame dalinės sintezės būdu iš 10-deacetil-bakatino III, kaip pagrindinės priemaišos, yra priemaišų, esančių 10-deacetil-bakatine III, esterinimo 25 produktai, o taip pat yra ir kitos priemaišos, atsirandančios, pavyzdžiui, dėl šoninės grandinės 2' - padėtyje esančios anglies epimerizacijos.

10-deacetil-bakatinas III ir pats taksoteras aplamai 30 gali būti valomi, panaudojant skystinę chromatografiją per kolonėlę, konkrečiau - aukšto slėgio skystinę chromatografiją (HPLC) per silikagelio kolonėlę. Tačiau, jeigu šie metodai, aplamai imant, yra tinkami keleto dešimčių gramų valymui, jų ekstrapoliavimas į 35 pramonę susijęs su apribojimais, tokiais kaip sunaudojamų tirpiklių kiekis, proceso valdymas ir

stacionarinės fazės (silikagelio), užterštos toksinėmis liekanomis, suardymas, kurie tampa pirmosios svarbos.

5 Taksoidų, kuriuose dažnai būna labai toksiškų produktų ir kurie yra labai labilūs, atveju, ypatingai svarbu disponuoti valymo metodais, kurie pasižymėtų geru našumu, nereikalaudami kietos stacionarinės fazės, kurią reikia pirkti, panaudoti ir suardyti, nereikalaudami didelių kiekių tirpiklių ir būtų lengvai automatizuojami, kas užtikrintų nepertraukiamą gamybą.

15 Neseniai buvo rasta, ir tai yra šio išradimo objektas, kad taksoidai, tiksliau sakant taksoteras ir 10-deacetil-bakatinas III, gali būti valomi, panaudojant centrifuginę padalinimo chromatografiją (CPC) arba didelio greičio priešsrovės chromatografiją, kurios principą aprašė, pavyzdžiui, A. Foucault ir P. Rosset, Analysis, 16(3), 157-167 (1988).

20 Centrifuginę padalinimo chromatografiją leidžia atlikti mišinio sudedamųjų dalių, paskirstytų tarp dviejų nesimaišančių skysčių fazių, padalinimą, sudarant pusiausvyrą, nuosekliai realizuojamą loginiu ir automatinio būdu.

25 Šiam metodui charakteringas labai efektyvus padalinimo mechanizmas, didelis stacionarinės fazės stabilumas ir labai didelis mobilios fazės greitis, o tai duoda puikų atskyrimą per keletą valandų.

30 Centrifuginėje padalinimo chromatografijoje reikia panaudoti du arba keletą tirpiklių, kurie duoda 2 dalinai susimaišančias fazes. Kadangi egzistuoja neribotas skaičius tirpiklių, turinčių šią savybę, 35 pramonėje yra ypatingai svarbu panaudoti pramoninius nechlorintus ir netoksiškus tirpiklius. Iš tirpiklių, kurie gali būti naudojami pramonėje su mažiausia

rizika, gali būti paminėti alkoholiai, tokie kaip metanolis, eteriai, tokie kaip metil-tret.-butileteris, esteriai, tokie kaip etilacetatas, ketonai, tokie kaip metilizobutilketonas, ir alifa-tiniai angliavandeniai, tokie kaip heptanas arba izooktanai.

Kad valymas būtų efektyviai atliekamas, reikia pasirinkti tirpiklių mišinį, kuriame greitą ir pilną atskyrimą valdytų dvi fazės, kuriose pasiskirstymo koeficientas yra 0,1-10 ribose, geriau 0,5-5 ribose ir ypatingai tinkamas - apie 1.

Produktas, kurio pasiskirstymo koeficientas (K) yra, pavyzdžiui, lygus 10, yra 10 kartų tirpesnis viršutinėje fazėje negu apatinėje fazėje. Taigi jis bus eliuuojamas labai greitai, jeigu viršutinė fazė yra mobili, ir bus eliuojamas po labai ilgo laiko, ir esant blogam atskyrimui, jeigu yra mobili apatinė fazė. Tuo atveju, kai K yra artimas 1, tirpumas bus praktiškai vienodas abiejose fazėse ir gali būti naudojami abu eliuliavimo būdai, kurie, esant reikalui, gali būti kombinuojami, norint gauti maksimalų atskyrimą.

Atskiru 10-deacetyl-bakatinio III atveju ypatingai gerai tinka alifatinio angliavandenilio, eterio, alkoholio ir vandens mišiniai, tokie kaip heptano-etilacetato-metanolio-vandens (1:2:1:2, pagal tūrį) mišinys, dar geriau - alifatinių ketonų ir vandens mišiniai, tokie kaip metilizobutilketono-acetono-vandens (2:3:2, pagal tūrį) mišinys.

Be to, reikia, kad sulaikymas stacionarinėje fazėje, kuri yra bendro aparato tūrio, užimto stacionarinės fazės, esančios pusiausvyroje, dalis, esant apibrėžtam mobilios fazės debitui, būtų kuo didesnis ir mažiausiai lygus 50%.

Be to, norint pagerinti našumą, yra ypatingai idomu turėti galimybę dirbti, esant didesniai debitui, kuri apriboja maksimalus rotoriaus duodamas slėgis.

- 5 Atskiru taksotero atveju geriausia naudoti alifatinio angliavandenilio, esterio, alkoholio ir vandens mišinį, tokį kaip heptano-etilacetato-metanolio-vandens (2:4:3:2, pagal tūrį) sistema, kurios sulaikymas yra 80% ir pasiskirstymo koeficientas apie 0,5, duodanti
10 siauresnį piką, kuris greitai eliuuojamas ir taip labai pagerinamas našumas.

- Centrifūginė padalinimo chromatografija gali būti vykdoma bet kokiame prekybiniame aparate, pritaikytame
15 šiam tikslui, tokiame kaip aparatai, kuriuos patobulino Yochiro Ito /CRC Crit. Rev. Anal. Chem., 17, 65 (1986)/ arba parduoda SANKI Engineering Limited, Kioto (Japonija).

- 20 Šis išradimas skirtas tiek taksotero, tiek ir 10-deacetil-bakatino III valymui, jeigu jie gaunami išradime aprašytu būdu.

- Toliau duodami pavyzdžiai rodo, kaip išradimą galima
25 panaudoti praktikoje.

1 pavyzdys

Taksotero valymas

- 30 Taksoteras (arba 4-acetoksi-2 α -benzoiloksi-5 β ,20-epoksi-1 α ,7 β ,10 β -trihidroksi-9-okso-11-taksen-13 α -ilo 3-tret.-butoksikarbonilamino-3-fenil-2-hidroksi-(2R,3S)-propionatas) yra gaunamas, veikiant cinku acto rūgštyje
35 4-acetoksi-2 α -benzoiloksi-5 β ,20-epoksi-1 β -hidroksi-7 β ,10 β -bis(2,2,2-trichloretoksikarbonil-oksi)-9-okso-11-taksen-13 α -ilo 3-tret.-butoksikarbo-nilamino-

3-fenil-2-hidroksi-(2R,3S)-propionatą, reakcijos sąlygomis, aprašytomis Europos patente EP 0336841.

10 g 4-acetoksi-2 α -benzoiloksi-5 β ,20-epoksi-1 β -hidroksi-7 β ,10 β -bis(2,2,2-trichloretoksikarbonilo-ksi)-9-okso-11-taksen-13 α -ilo 3-tret.-butoksikarbonilamino-3-fenil-2-hidroksi-(2R,3S)-propionato ištirpinama 150-je ml metil-tret.-butileterio ir pridedama 10 g cinko. Sausai nugarinus, gaunami pilki milteliai, kurie sudedami į reaktorių.

Po to, maišant, per 5 minutes pridedamas 6 ml acto rūgšties ir 50 ml acetonitrilo mišinys. Šildoma vandens vonioje, kurios temperatūra 45°C, 1 valandą. Atšaldžius ledo vonioje, intensyviai maišant, pridedama 850 ml metil-tret.-butileterio ir nufiltruojamos cinko druskos ir cinko perteklius per 4-to poringumo sukepinto stiklo filtrą.

Filtratas sausai nugarinamas. Gaunama liekana (12 g), kuri tuo pat tirpinama 20 ml etilacetato, 15 ml metanolio, 10 ml heptano ir 10 ml vandens.

Centrifuginė padalinimo chromatografija vykdoma, panaudojant SANKI LLI-07 aparatą. Centrifūgavimas maintained 2 stūmokliniais siurbliais, kurie turi vožtuvus su 55 barų slėgio riba. Vienas siurblys, dėka užtvartinio vožtuvo, skirtas paduoti vienai arba antrai iš dviejų fazių; antrasis siurblys yra skirtas įleidimui.

Užpildžius aparatą stacionarine faze nesmarkiai sukant (200 aps./min) ir esant dideliui debitui (110 ml/min), tuo pat įleidžiama.

Įleidžiamos dvi fazės, pradedant nuo vandeninės fazės, ir eliuuojama, esant 60 ml/min debitui, heksano-etilacetato-metanolio-vandens (2:4:3:2, pgal tūrį)

sistemos vandenine faze. Surenkama 1,9 litro stacionarinės fazės, esant 71% sulaikymui, paskui renkamos 15 ml tūrio frakcijos. 72-110-ta frakcijos sumaišomos ir sukonzentruojamos iki 140 ml tūrio. Susidariusios nuosėdos nufiltruojamos. Taip gaunama 5,2 g (80,5% išeiga) taksotero trihidrato, kurio grynumas pagal vidinį standartą yra 99,7%.

2 pavyzdys

10

Taksotero valymas

Dirbant pagal 1 pavyzdyje aprašytą metodiką, tik paimus 82 g 4-acetoksi-2 α -benzoiloksi-5 β ,20-epoksi-1 β -hidroksi-7 β ,10 β -bis(2,2,2-trichloretoksikarboniloksi)-9-okso-11-taksen-13 α -ilo 3-tret.-butoksikarbonilamino-3-fenil-2-hidroksi-(2R,3S)-propionato, 82 g cinko ir 150 ml mišinio iš 49,2 ml acto rūgšties ir 328 ml acetonitrilo, gaunama 115 g negryno produkto, kuriame teoriškai yra 49,69 g taksotero arba 53 g taksotero trihidrato.

Negrynas produktas tirpinamas 450 ml metil-tret.-butileterio ir plaunamas iš viso 450 ml vandens, kuriame yra 15 g natrio chlorido. Vandeniniai sluoksniai sumaišomi ir ekstrahuojami du kartus 200 ml metil-tret.-butileterio. Trys eteriniai ekstraktai sumaišomi ir sausai nugarinami. Gaunama 72 g liekanos, kuri tirpinama 120 ml metanolio.

30

Į gautą gelsvą tirpalą pridedama iš eilės 160 ml etilacetato, 80 ml vandens ir 80 ml heptano.

Gaunama 2 skystos skaidrios fazės, kurių bendras tūris yra 460 ml, ir viršutinis sluoksnis yra apie 1/4 bendro tūrio, vietoj 35%, kai nėra taksotero.

35

Centrifūginės padalinimo chromatografijos aparatas užpildomas organine faze, esant 110 ml/min debitui ir 200 aps/min sukimosi greičiui. Kai aparatas prisi-
 pildo, nustatomas 800 aps/min. sukimosi greitis.
 5 Įleidžiama vandeninė fazė, po to, įleidus organinę
 fazę, plaunama 200 ml organinės fazės, paskui
 eliuuojama, esant 60 ml/min. debitui, vandenine faze.

Surenkama 2,5 l stacionarinės fazės pertekliaus, esant
 10 67,7% sulaikymui.

Praleidus 200 ml mobilios vandeninės fazės, renkama 360
 frakcijų po 12-13 ml. 25-110-ta frakcijos, su-
 koncentruotos iki 200 ml tūrio, duoda 46,5 g (87,7%
 išeiga) taksotero trihidrato, kurio grynumas yra 99,1%.

15

3 pavyzdys

10-deacetil-bakatino III valymas

20 Centrifūginė padalinimo chromatografija atliekama
 serijos 1000 SANKI HPCPC chromatografu, kurio bendras
 tūris yra 250 ml.

25 Rotorius, besisukantis 100 aps/min. greičiu, užpil-
 domas, naudojant žemyneigį būdą, tuo pačiu metu pum-
 puojant metilizobutilketono-acetono-vandens (2:3:2,
 pagal tūrį) mišinio organinę fazę, esant 6 ml/min.
 debitui, ir vandeninę fazę, esant 3 ml/min. debitui.

30 Tada nustatomas 1200 aps./min. sukimosi greitis ir
 įleidžiama 1,5 g nešvaraus, kristalinio 10-deacetil-
 bakatino III, turinčio 83,3% 10-deacetil-bakatino III
 ir 3,4% 10-deacetil-19-hidroksi-bakatino III.

35 Po to eliuuojama žemyneigiu būdu, esant 3 ml/min.
 debitui, ir renkamos 6 ml frakcijos kas 2 minutės.

10-deacetil-19-hidroksi-bakatinas III yra 39-52-je frakcijose.

5 Pradedant nuo 61-osios frakcijos, eliuavimo kryptis pakeičiama, naudojant organinę fazę kaip mobilią fazę ir aukštyneigį būdą, esant 5 ml/min. debitui, ir renkamos 10 ml frakcijos kas 2 minutės.

10 70-84-ji frakcijos, kuriose yra 10-deacetil-bakatinas III, koncentruojamos sumažintame slėgyje. Perkristalinius iš 15 ml acetonitrilo, gaunama 1,25 g baltų kristalų pavidalo 10-deacetil-bakatino III solvato su acetonitrilu (1 molis/moluiui), kurio grynumas, nustatytas aukšto slėgio skystinės chromatografijos metodu, 15 naudojant vidinį standartą, yra 98%.

Pakoreguota išeiga yra 91,2%.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. 10-deacetil-bakatiño III ir taksotero valymo būdas, panaudojant centrifūginę padalinimo chromatografiją tarp dviejų dalinai besimaišančių fazių, susidedančių iš vandens ir nechlorintų ir netoksiškų tirpiklių, pasirinktų iš alkoholių, eterių, esterių, ketonų ir alifatinių angliavandenilių, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad 10-deacetilbakatino III valymui naudoja alifatinio angliavandenilio, esterio, alkoholio ir vandens mišinį, kurio pasiskirstymo tarp dviejų fazių koeficientas yra 0,1-10 ribose, arba alifatinių ketonų ir vandens mišinį, kurio pasiskirstymo tarp dviejų fazių koeficientas yra 0,1-10 ribose, ir taksotero valymui naudoja alifatinio angliavandenilio, esterio, alkoholio ir vandens mišinį, kurio pasiskirstymo tarp dviejų fazių koeficientas yra 0,1-10 ribose.
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pasiskirstymo tarp dviejų fazių koeficientas yra 0,5-5 ribose.
3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pasiskirstymo tarp dviejų fazių koeficientas yra artimas 1.
4. Būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad 10-deacetil-bakatino III atskyrimui naudoja heptano, etilacetato, metanolio ir vandens mišinį.
5. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudoja heptano-etilacetato-metanolio-vandens, kurių santykis 1:2:1:2 (pagal tūrį), mišinį.

6. Būdas pagal bet kurią iš 1-3 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad naudoja metilizobutilketono,
acetono ir vandens mišinį.
- 5 7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad naudoja metilizobutilketono-acetono-vandens,
kurių santykis 2:3:2 (pagal tūrį), mišinį.
- 10 8. Būdas pagal bet kurią iš 1-3 punktų, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad taksotero valymui naudoja
heptano, etilacetato, metanolio ir vandens mišinį.
- 15 9. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad naudoja heptano-etilacetato-metanolio-van-
dens, kurių santykis 2:4:3:2 (pagal tūrį), mišinį.