



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43333 (13) C2

(51) 7 C07D305/14, G01N30/02,
A61K31/335МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ 10-ДЕЗАЦЕТИЛБАККАТИНУ III ТА ТАКСОТЕРУ

(21) 95094232

(22) 18 03 1994

(24) 17 12 2001

(31) 93/03251

(32) 22 03 1993

(33) FR

(86) PCT/FR94/00300, 18 03 1994

(46) 17 12 2001, Бюл. № 11, 2001 р

(72) Андре Дюран, FR, Ален Гербо, FR, Родольф
Марграфф, FR

(73) POH-ПУЛЕНК РОРЕР С А, FR

(56) 1 JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY,
vol 15, no 4, 1992, pages 697 - 7062 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol 587,
1991, AMSTERDAM NL, pages 300-305

(57) 1 Способ очистки 10-дезацетилбаккатина III и таксотера центрифужной распределительной хроматографией между двумя фазами, частично смешивающимися, состоящими из воды и нехлорированных и нетоксичных растворителей, выбранных среди спиртов, простых эфиров, сложных эфиров, кетонов и алифатических углеводородов, отличающийся тем, что при очистке 10-дезацетилбаккатина III используют смесь алифатического углеводорода, сложного эфира, спирта и воды, коэффициент распределения которой между двумя фазами лежит между 0,1 и 10, или смесь алифатических кетонов и воды, коэффициент распределения которой между двумя фазами

лежит между 0,1 и 10, а при очистке таксотера используют смесь алифатического углеводорода, сложного эфира, спирта и воды, коэффициент распределения которой между двумя фазами лежит между 0,1 и 10

2 Способ по п. 1, отличающийся тем, что коэффициент распределения между двумя фазами лежит между 0,5 и 5

3 Способ по п. 1, отличающийся тем, что коэффициент распределения между двумя фазами близок к 1

4 Способ по одному из пп. 1-3, отличающийся тем, что для очистки 10-дезацетилбаккатина III используют смесь гептана, этилацетата, метанола и воды

5 Способ по п. 4, отличающийся тем, что используют смесь гептан-этилацетат-метанол-вода (1-2-1-2 по объему)

6 Способ по одному из пп. 1-3, отличающийся тем, что используют смесь метилизобутилкетона, ацетона и воды

7 Способ по п. 6, отличающийся тем, что используют смесь метилизобутилкетон-ацетон-вода (2-3-2 по объему)

8 Способ по одному из пп. 1-3, отличающийся тем, что для очистки таксотера используют смесь гептана, этилацетата, метанола и воды

9 Способ по п. 8, отличающийся тем, что используют смесь гептан-этилацетат-метанол-вода (2-4-3-2 по объему)

Настоящее изобретение относится к способу очистки центрифужной распределительной хроматографией таксотера и 10-дезацетилбаккатина III от таксоидов

10-Деацетилбаккатин III, извлеченный из листьев тисса, используется для получения таксотера в условиях, описанных, например, в европейских патентах EP 0253738 или EP 336841, или в международной заявке PCT WO 92/09589

10-Деацетилбаккатин III, полученный экстракцией из листьев тисса, содержит, в зависимости от веществ, которые содержатся в этих листьях, примеси, которые в основном являются про-

дуктами, относящимися к группе таксоидов, например, 2 α -бензоилокси-4-ацетокси-5 β , 20-эпокси-1 β , 7 β , 10 β , 13 α , 19-пентаокси-9-оксо-11-таксен, 2 α -бензоилокси-4-ацетокси-5 β , 20-эпокси-1 β , 7 α , 10 β , 13 α -тетраокси-11-таксен, или таксины

Таксотер, который получают полусинтетическим путем из 10-дезацетилбаккатина III, содержит в качестве основных примесей продукты этерификации примесей, содержащих в 10-дезацетилбаккатине III, а также другие примеси, происходящие, например, от элимеризации углерода в положении 2 боковой цепи

10-Деацетилбаккатин III и сам таксотер обычно могут быть очищены методами жидкост-

ной хроматографии на колонке, более конкретно высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке с оксидом кремния. Однако, если эти методики хорошо применимы к очистке нескольких десятков грамм, то при использовании их в промышленном масштабе сталкиваются с такими проблемами, как количество потребляемых растворителей, работа с носителем (оксид кремния), загрязненным токсичными остатками, и его деструкция, которые становятся первоочередными для их решения.

В случае таксоидов, токсичность которых часто является очень высокой и которые являются очень нестабильными, особенно важно располагать высокопроизводительными методами очистки, которые не требуют дорогостоящего твердого носителя, дорогого при обслуживании и деструктируемого, которые не требовали бы значительного количества растворителей и которые можно было бы легко автоматизировать для организации непрерывного процесса.

Эта задача решается с помощью предлагаемого способа очистки таксотера и 10-дезацетилбаккатина III, осуществляемого с использованием центрифужной распределительной хроматографии (ЦРХ) или противоточной хроматографии с большой скоростью, принцип которой описан, например, A Foucault et P. Rosset, *Analysis*, 13(3), 157-167 (1988).

Центрифужная распределительная хроматография позволяет провести распределение компонентов смеси между двумя жидкими несмешивающимися фазами с помощью последовательных уравниваний, осуществляемых естественным путем и автоматически.

Эта методика отличается очень эффективным механизмом распределения, высоким удерживанием стационарной фазы и высокой скоростью подвижной фазы, приводящими к отличным результатам разделения в течение нескольких часов.

Центрифужная распределительная хроматография требует применения двух или нескольких растворителей, образующих две частично смешивающиеся фазы. Хотя существует неограниченное число растворителей, отвечающих этой характеристике, для промышленного использования особенно важно применять промышленные не хлорированные и нетоксичные растворители. Среди растворителей, которые могут быть использованы в промышленном масштабе с минимальным риском, можно назвать спирты, такие как метанол, простые эфиры, такие как метил-трет-бутиловый эфир, сложные эфиры, такие как этилацетат, кетоны, такие как метилизобутилкетон, и алифатические углеводороды, такие как гептан или изоктан.

Для осуществления эффективной очистки необходимо выбрать смесь растворителей, быстрое и полное разделение которой приводит к двум фазам, для которых коэффициент распределения лежит между 0,1 и 10,0, предпочтительно между 0,5 и 5, более конкретно близок к 1.

Продукт, для которого коэффициент распределения (K), например, равен 10, является в 10 раз более растворимым в верхней фазе, чем в нижней. Следовательно, он будет очень быстро

элюирован, если верхняя фаза является подвижной, и наоборот, элюирование будет очень продолжительным и с низкой разрешающей способностью, если нижняя фаза является подвижной. С другой стороны, если K близок к 1, то растворимость будет практически идентичной в обеих фазах и могут быть использованы как один, так и другой варианты элюирования, при желании объединенные для достижения максимального разрешения.

В случае 10-дезацетилбаккатина III особенно подходят смеси алифатического углеводорода, сложного эфира, спирта и воды, например, смесь гептан-этилацетат-метанол-вода (1-2-1-2) по объему) и более конкретно подходят смеси алифатических кетонов и воды, например, смесь метилизобутил-кетон-ацетон-воды (2-3-2 по объему).

Кроме того, необходимо, чтобы удерживание стационарной фазы, которая составляет часть общего объема аппарата, занятого уравновешенной стационарной фазой при фиксированном расходе подвижной фазы, было наиболее высоким и по крайней мере составляло 50 процентов.

Кроме того, для повышения производительности, особенно интересно работать с высоким расходом, который ограничивается максимальным давлением, создаваемым ротором.

В случае таксотера предпочитают использовать смесь алифатического углеводорода, сложного эфира, спирта и воды, например, систему гептан-этилацетат-метанол-вода (2-4-3-2 по объему), которая имеет удерживание 80 процентов и коэффициент распределения около 0,5, дающий таким образом более узкий пик, и которая быстро элюируется, обеспечивая таким образом очень четкое повышение производительности.

Центрифужная распределительная хроматография может быть использована на любом оборудовании, имеющемся в продаже и пригодном для этой цели, например, на таком, которое разработано Йоширо Ито (*CRC Crit Rev Anal Chem*, 17, 65 (1986)) или выпускается в продажу фирмой САНКИ Инженеринг Димитед в Киото (Япония).

Настоящее изобретение также относится к таксотеру и 10-дезацетилбаккату III, очищенному при использовании способа согласно изобретению.

Следующие примеры показывают, как настоящее изобретение может быть осуществлено на практике.

Пример 1. Очистка таксотера

Таксотер (или 3-трет-бутоксикарбониламино-3-фенил-2-окси-2R,3S/-пропионат 4-ацетокси-2 α -бензоилокси-5 β , 20-эпокси-1 α , 7 β , 10 β -триокси-9-оксо-11-таксен-13 α -ила) получают при обработке цинком в присутствии уксусной кислоты 3-трет-бутоксикарбониламино-3-фенил-2-окси-2R, 3S/-пропионата 4-ацетокси-2 α -бензоилокси-5 β , 20-эпокси-1 β -окси-7 β , 10 β -бис-/2,2,2-трихлорэтоксикарбонилокси-/9-оксо-11-таксен-13 α -ила в условиях, описанных в Европейском патенте EP 0336841.

Растворяют 10 г 3-трет-бутоксикарбониламино-3-фенил-2-окси-2R,3S/-пропионата 4-ацетокси-2 α -бензоилокси-5 β , 20-эпокси-1 β -окси-7 β , 10 β -бис-/2,2,2-трихлорэтоксикарбонилокси-/9-ок-

со-11-таксен-13 α -ила в 150 кубических сантиметрах метил-трет-бутилового эфира, потом прибавляют 10 г цинка. После выпаривания досуха получают серый порошок, который помешают в реактор.

Перемешивают, потом прибавляют в течение 5 минут смесь 6 кубических сантиметров уксусной кислоты и 50 кубических сантиметров ацетонитрила. Нагревают на водяной бане при 45 градусах Цельсия в течение 1 часа. После охлаждения на ледяной бане вводят 850 куб. см метил-трет-бутилового эфира при сильном перемешивании, потом отфильтровывают соли цинка и избыток цинка на фильтре из спеченного стекла № 4.

Фильтрат концентрируют досуха. Таким образом получают 12 г продукта в виде пены, которую немедленно обрабатывают 20 см³ этилацетата, 15 см³ метанола, 10 см³ гептана и 10 см³ воды.

Центрифужную распределительную хроматографию осуществляют в приборе SANKI LL 1-07. Подачу в центрифугу осуществляют с помощью двух поршневых насосов, снабженных вентилями-задвижками, ограничивающими давление на уровне 55 бар. Один насос обеспечивает транспортировку одной или друго из двух фаз, с помощью выбранного вентиля, другой насос предусмотрен для ввода пробы.

После заполнения прибора стационарной фазой при медленном вращении (200 об/мин) и большом расходе (110 см³/мин) быстро осуществляют ввод пробы.

Вводят обе фазы, начиная с водной фазы, и элюируют с расходом 60 см³/мин водной фазой системы гексан-этилацетат-метанол-вода (2-4-3-2 по объему). Собирают 1,9 л стационарной фазы, т.е. удерживание составляет 71%, потом собирают фракции по 15 см³. Фракции 72-110 объединяют и концентрируют до объема № 140 см³. Отфильтровывают образовавшийся осадок. Таким образом получают с выходом 80,5% 5,2 г тригидрата таксотера с титром 99,7% при внутреннем стандарте.

Пример 2. Очистка таксотера

Работают по методике примера 1, но исходя из 82 г 3-трет-бутоксикарбониламино-3-фенил-2-окси-/2R, 3S)-пропионата 4-ацетокси-2 α -бензоилокси-5 β , 20-эпокси-1 β -окси-7 β , 10 β -бис-/2,2,2-трихлорэтоксикарбонилокси-/9-оксо-11-таксен-13 α -ила, 82 г цинка и 150 см³ смеси 49,2 см³ уксусной кислоты и 328 см³ ацетонитрила, получают 115 г сырого продукта, содержащего, по теории, 49,69 г таксотера или 53 г тригидратированного таксотера.

Сырой продукт обрабатывают 450 см³ метил-трет-бутилового эфира, потом промывают 3 раза 450 см в целом воды, содержащей 15 г хлорида натрия. Объединенные водные фазы экстрагируют 2 раза 200 см метил-трет-бутилового эфира. Три эфирных экстракта объединяют и концентрируют досуха. Таким образом получают 72 г про-

дукта в виде пены, которую поглощают 120 см³ метанола.

К полученному светло-желтому раствору прибавляют последовательно 160 см³ этилацетата, 80 см³ воды и 80 см³ гептана.

Таким образом получают 2 жидкие прозрачные фазы общим объемом 460 см³ и верхний слой которых составляет только примерно 1/4 часть от общего объема вместо 35% при отсутствии таксотера.

Прибор для центрифужной распределительной хроматографии заполняют органической фазой с расходом 110 см³/мин при скорости вращения 200 об/мин. При заполнении прибора увеличивают скорость вращения до 800 об/мин. Вводят водную фазу, потом после ввода органической фазы промывают с помощью 200 см органической фазы, потом элюируют, при расходе 60 см³/мин, водной фазой.

Собирают 2,5 л стационарной фазы в избытке, т.е. удерживание составляет 67,7%.

После пропускания 200 см³ подвижной водной фазы собирают 360 фракций по 12-13 см³. Фракции 25-110 концентрируют до объема 200 см³, и получают с выходом 87,7% 46,5 г осадка тригидратированного таксотера, чистота которого составляет 99,1%.

Пример 3. Очистка 10-дезацетилбаккатина III

Проводят центрифужную распределительную хроматографию на хроматографе SANKI HPCPC серия 1000 с общим объемом 245 см³.

Ротор, вращающийся со скоростью 100 об/мин, заполняют наливом сверху насосами, подающими одновременно органическую фазу с расходом 6 см³/мин и водную фазу с расходом 3 см³/мин смеси метилизобутилкетон-ацетон-вода (2-3-2 по объему).

Затем повышают скорость вращения до 1200 об/мин, потом инжектируют 1,5 г 10-дезацетилбаккатина III в виде неочищенных кристаллов, содержащих 83,3% 10-дезацетилбаккатина III и 3,4% 10-дезацетил-19-оксибаккатина III.

Затем элюируют падением водной фазы с расходом 3 см³ мин и собирают фракции по 6 см³ каждые 2 минуты.

10-Деацетил-19-оксибаккатин III находится в фракциях 39-52.

Начиная с 61-й фракции, обращают направление элюции, используя для этого органическую фазу в качестве подвижной фазы, восходящей вверх с расходом 5 см³/мин, и собирают фракции по 10 см³ каждые 2 минуты.

Фракции 70-84, которые содержат 10-дезацетилбаккатин III, концентрируют при пониженном давлении. После перекристаллизации из 15 см³ ацетонитрила получают 1,5 г 10-дезацетилбаккатина III, сольватированного ацетонитрилом (1 моль/моль) в виде белых кристаллов, чистота которых, определенная ВЭЖХ с внутренним стандартом составляет 98%.

Скорректированный выход составляет 91,2%.

Тираж 50 екз
Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
