



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5986/86

(51) Int.Cl.5

C 07 H 15/203

(22) Indleveringsdag: 12 dec 1986

(41) Alm. tilgængelig: 14 jun 1987

(44) Fremlagt: 31 aug 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 13 dec 1985 DE 3543999

(71) Ansøger: *Bayer Aktiengesellschaft; D-W 5090 Leverkusen, DE

(72) Opfinder: Erich *Rauenbusch; DE

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af acarbose med et acarbose-indhold på mindst 90 vægtprocent på tørstofbasis, eller en vandig opløsning deraf

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4062950

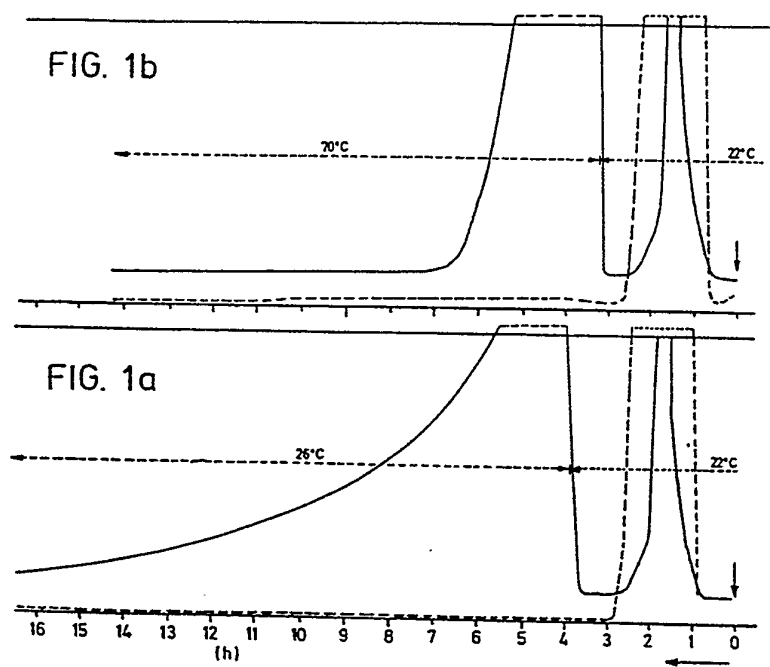
(57) Sammen drag:

5986-86

Acarbose, der ud over vand indeholder mindre end 10 vægtprocent sukkeragtige bikomponenter, kan fremstilles ved, at man påfører forrenset acarbose i vandig, 1-20 vægtprocents opløsning med en pH-værdi på fra 4 til 7 på en søjle, der som fyldmateriale indeholder svagt sure kationbyttere med carboxylgrupper på basis af dextran, agarose og cellulose, eller ud fra disse under tilsætning af polyamid afledte ionbyttere, hvorefter søjlen elueres udelukkende med afgasset, destilleret vand, og agarosen eventuelt isoleres fra eluatet på gængs måde.

Den således fremstillede acarbose kan anvendes til fremstilling af lægemidler til behandling af det menneskelige eller dyriske legeme.

5986-86



Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af acarbose med et acarbose-indhold på mindst 90 vægtprocent på tørstofbasis, eller en vandig opløsning deraf.

Acarbose er en inhibitor for saccharase-enzymkomplekset i den menneskelige tyndtarm og anvendes i medicinen til
5 behandling af Diabetes.

Acarbose er O-4,6-didesoxy-4- $\{[1S,4R,5S,6S]-$
4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]-amino}-
- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose.
10

Inhibitoren udvindes ved fermentering af Actinoplanes-arter, jfr. DE patentskrift nr. 2.209.832, DE patentskrift nr. 2.209.834 og DE patentskrift nr. 2.064.092, og skal isoleres fra fermenteringsvæsken. Hertil er der blevet
15 beskrevet rensningsmetoder, jfr. DE patentskrifterne nr. 2.347.782 og 2.719.912.

Ved disse rensningsmetoder bindes acarbosen til stærkt sure kationbyttere og elueres med saltopløsninger eller overvejende med fortyndet syre. Efter neutralisation med
20 anionbyttere fås der en acarbose med et acarbose-indhold på 78-88 vægtprocent på tørstofbasis (HPLC-metode). Som urenheder i disse præparater er der indeholdt endnu ca. 10-15%, beregnet på sukker, af tilfarvelige bikomponenter, 1-4% aske og nogle farvende bestanddele. Til den humanmedicinske
25 anvendelse kræves der endnu højere renhedsgrader, som imidlertid med kendskab til den ovennævnte kendte teknik ikke på enkel måde kan opnås ved erstatning af den stærkt sure kationbytter med en svagt sur kationbytter, da disse ionbyttere ikke i tilstrækkelig grad binder den særdeles svagt
30 basiske acarbose, hvorfor den viser sig urenset i eluatet.

Det har nu overraskende vist sig, at man kan rense den ifølge teknikkens stadi forrensede acarbose på ganske bestemte, svagt sure, hydrofile kationbyttere i snævert begrænsede pH-områder i ét trin til fjernelse af resterende
35 salte, farvestoffer og de sukkerholdige, basiske bikomponenter. Indholdet af acarbose stiger derefter til mindst 90

vægtprocent på tørstofbasis, fortrinsvis til 95-98 vægtprocent og mere, sulfataskeindholdet synker til 0-0,5%, og indholdet af de sukkeragtige bikomponenter formindskes til mindre end 10 vægtprocent, fortrinsvis 2-5 vægtprocent og

5 mindre.

Til fremstilling af den her omhandlede acarbose ved hjælp af denne specielle form for chromatografi anvendes der en opløsning af en forrenset acarbose med et acarboseindhold på 78-88 vægtprocent på tørstofbasis, hvilken acarbose

10 f.eks. fås ved hjælp af den fremgangsmåde, der er beskrevet i DE patentskrift nr. 2.719.912. Denne opløsning påføres i en koncentration på 1-20 vægtprocent og ved en pH-værdi på 3,5-6,5, fortrinsvis 4,0-5,5, på en søjle. Som fyldmateriale egner sig svagt sure kationbyttere med carboxylgrupper på

15 basis af dextran, agarose og cellulose, eller ud fra disse komponenter under tilsætning af polyacrylamider afledte ionbyttere, f.eks. de handelsgængse typer CM-Sephadex[®], CM-Sephadex[®], CM-Cellulose[®] og CM-Cellufine[®]. Ejendommeligt nok er de i handelen gængse, svagt sure carboxylgruppeholdige

20 ionbyttere på basis af polystyren, polyacrylsyre eller polymethacrylsyre ikke anvendelige til denne rensning.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er af den i det foregående nærmere angivne art, er således ejendommelig ved, at man påfører forrenset acarbose med et acarboseind-

25 hold på 78-88 vægtprocent på tørstofbasis i vandig, 1-20 vægtprocents opløsning med en pH-værdi på fra 3,5 til 6,5 på en søjle, der som fyldmateriale indeholder svagt sure kationbyttere med carboxylgrupper på basis af dextran, agarose og cellulose, eller ud fra disse under tilsætning af

30 polyacrylamid afledte ionbyttere, hvorhos rumfanget af den påførte, forrensede acarbose-opløsning højst er lig med søjlens fyltrumfang, hvorpå søjlen udelukkende elueres med afgasset, destilleret vand, hvorefter acarbose om ønsket isoleres fra eluatet på gængs måde.

35 Den vandige opløsning af den forrensede acarbose, der påføres på søjlen, er begrænset med hensyn til dens

rumfang. Der kan som nævnt højst påføres et rumfang, der svarer til søjlens fyldrumfang, og fortrinsvis holder man sig under 60% af søjlerumfanget. Til rensning af en præparativ mængde acarbose anvendes der således ikke alt for lave koncentrationer. Opadtil er koncentrationen begrænset derved, at de til rensningen bedst egnede ionbyttere har tendens til skrumpling. Der anvendes fortrinsvis koncentrationer fra 7 til 20%.

Efter påføringen elueres søjlen udelukkende med afgasset, destilleret vand. Herved elueres først salte, neutrale sukkerarter og farvende ledsagestoffer, og dernæst forsinket acarbose i et forholdsvis bredt maksimum. De sukkeragtige, basiske bikomponenter forbliver på søjlen og fjernes først ved dennes regenerering. Acarbosen foreligger herefter i en ren vandig opløsning ved en pH-værdi på fra 6 til 7 og kan koncentrerer på gængs måde og tørres i højrenset form.

Acarbosen opførsel på søjlen er afhængig af flere faktorer, af hvilke overraskende nok pH-værdien af ækvilibreringen af søjlefyldningen og temperaturen under chromatograferingen er afgørende for den praktiske gennemførelse.

Med pH-værdien for søjlefyldningen ændres kapaciteten og acarbosens elueringsforhold. Ved neutrale pH-værdier forsinkes acarbosen for lidt i forhold til saltene og opdeles ikke i tilstrækkelig grad. Ved sure pH-værdier på 3,5-4 forsinkes acarbosen kraftigt og elueres kun ufuldstændigt med vand. Den praktiske gennemførelse af fremgangsmåden kræver for hver enkelt ionbytter en optimering af pH-værdien. I almindelighed kan pH-værdier mellem 4,3 og 5,0 anvendes. Ved høj belastning foretrækkes pH-værdier omkring 4,6, og ved ringe belastning og maksimalt udbytte pH-værdier omkring 4,9.

Den anden vigtige faktor er temperaturen. Jo lavere temperaturen er, desto kraftigere tilbageholdes acarbosen af ionbytteren, og desto større er søjlens kapacitet, men

0

desto langsommere elueres også acarbossen. Dette betyder, at der fås et asymmetrisk maksimum og et særdeles stort rumfang af acarbosefraktionen. Det er således gunstigt at

5 påføre stoffet ved stuetemperatur eller derunder, hvorpå man efter elueringen af saltene og farvende bestanddele opvarmer søjlen til fra 25 til 90°C, fortrinsvis til 40-70°C. Der opnås herved en hurtig eluering af acarbossen med gode udbytter.

10

Til regenerering af ionbytterne anvendes der pufferstoffer, f.eks. natriumacetat-puffer, i det til ækvilibreringen nødvendige pH-område og i en koncentration på fra 0,1 til 0,5 molær. Dernæst vaskes søjlen med rent, afgasset vand, indtil ledningsevnen er faldet til ca. 0,1 mS/cm

15 (ved stuetemperatur).

15

På tegningen, der viser adskillelserne ved to forskellige elueringstemperaturer, er der mod tiden i timer på abscissen afsat eluatets brydningsindeks respektive dets ledningsevne (punkteret). Desuden er temperaturkendetegnet angivet.

20

Indholdet af acarbose i slutproduktet bestemmes først og fremmest ved væskechromatografi (HPLC-metode) og beregnes på det vandfri stof. Metoden gennemføres på følgende måde:

25

Højtryksvæskechromatografi med
termostatstyret søjleovn:

30

Metalsøjle af ædelstål.
Længde: 25 cm
Indre diameter: 4 mm
Fyldning med: Aminofase
5 µm
(f.eks. LiChrosorb NH₂, E. Merck,
eller Hypersil APS, Shandon)

35

0	Reagenser	1. Acetonitril (f.eks. LiChrosolv, E. Merck) 2. Kaliumdihydrogenphosphat til analyse 3. Di-natriumhydrogenphosphat-dihydrat til analyse
5		
	Prøveopløsning	Ca. 200 mg stof, nøjagtigt afvejet i en målekolbe med vand til opløsning i 10,0 ml: 20 mg/ml
10		
	Sammenligningsopløsning	Indhold af en ampul standardstof, opløst i det for standarden angivne rumfang vand.
15		
	Elueringsmiddel	Acetonitril-phosphatpuffer (71 + 29, rumfang), phosphatpuffer: 600 mg kaliumdihydrogenphosphat, og 350 mg di-natriumhydrogenphosphat-dihydrat opløses i vand til 1000 ml. Opløsningen filtreres over et Millipore-filter, Type AAWP 0,8 µm.
20		
	Gennemstrømningshastighed	2,2 ml/min.
25		
	Temperatur i søjleovnen	35°C
30		
	Detektering	UV, 210 nm
	Indsprøjtet mængde	10 µl, 0,2 mg i 10 µl

0

Fuldt udslag af skriver ca. 0,25 AUFS (Absorbance Units Full Scale)

5

Beregning af acarbose-indholdet

$$G = \frac{P_p \times C \times 100\,000}{P_v \times W_p \times (100-b)}, \text{ hvor}$$

10

G = indhold af acarbose i procent, beregnet på det vandfri stof

P_p = Peakflade for acarbosen fra testopløsningen

15

P_v = Peakflade for acarbosen fra sammenligningsopløsningen (standard)

W_p = Indvejet prøve i mg

20

C = Koncentration af sammenligningsopløsningen i mg acarbose pr. ml

b = Vandindhold i prøven i procent

25

Acarbosen inhibitorvirkning bestemmes ved et saccharase-inhiberingsforsøg, og der angives saccharase-inhiberingsenheder (SIE). Forsøget er beskrevet af L. Müller, B. Junge et al. i Enzyme Inhibitors, U. Brodbeck ed., Verlag Chemie, 1980, side 109.

30

Den fremstillede acarbose kan anvendes i farmaceutiske præparater, som ved siden af ikke-toksiske, indifferente farmaceutisk egnede bærestoffer indeholder det her omhandlede virksomme stof eller består af det her omhandlede virksomme stof.

35

0

Den fremstillede acarbose kan også anvendes i farmaceutiske præparater i doseringsenheder. Dette betyder, at præparaterne foreligger i form af enkelte dele, f.eks. tabletter, dragées, kapsler, piller, suppositorier og ampul-

5 ler, hvis indhold af virksomt stof svarer til en brøkdel eller et mangefold af en enkelt dosis. Doseringsenhederne kan f.eks. indeholde 1, 2, 3 eller 4 enkeltdoser eller 1/2, 1/3 eller 1/4 af en enkeltdosis. En enkeltdosis indeholder fortrinsvis den mængde virksomt stof, der indgives ved en

10 indgivelse, og som almindeligvis svarer til en hel, en halv eller en trediedel eller en fjerdedel af en dagsdosis.

Ved ikke-toksiske, indifferente, farmaceutisk egnede bærestoffer skal der forstås faste, halvfaste eller flydende fortyndingsmidler, fyldstoffer og præparathjælpemidler af

15 enhver art.

Som foretrukne farmaceutiske præparater kan der nævnes tabletter, dragées, kapsler, piller, granulater, suppositorier, opløsninger, emulsioner, suspensioner, pastaer, salver, geléer, cremer, lotions, puddere og spraymidler.

20 Tabletter, dragées, kapsler, piller og granulater kan indeholde det eller de virksomme stoffer ved siden af de gængse bærestoffer, f.eks. (a) fyld- og strækkemidler, såsom stivelsesarter, mælkesukker, rørsukker, glucose, mannitol og kieselsyre, (b) bindemidler, f.eks. carboxymethylcellulose,

25 alginater, gelatine, polyvinylpyrrolidon, (c) midler til opretholdelse af fugtigheden, f.eks. glycerol, (d) sprængmidler, f.eks. agar-agar, calciumcarbonat og natriumbicarbonat, (e) opløsningsforhalende midler, f.eks. paraffin, og (f) resorptionsfremmende midler, f.eks. kvaternære ammoniumforbin-

30 delser, (g) fugtemidler, f.eks. cetylalkohol eller glycerolmonostearat, (h) adsorptionsmidler, f.eks. kaolin og bentonit, og (i) glidemidler, f.eks. talkum, calcium- og magnesiumstearat og faste polyethylenglycoler, eller blandinger af de under (a) til (i) angivne forbindelser.

35

0

De omhandlede tabletter, dragées, kapsler, piller og granulater kan være udstyret med de gængse, eventuelt opakiseringsmiddel indeholdende overtræk og omhylninger, og de kan også være således sammensat, at de afgiver det virksomme stof udelukkende eller fortrinsvis i en bestemt del af indvoldene, eventuelt forhalet, idet der som indlejringsmasser f.eks. kan anvendes polymerstoffer og voksarter.

Det virksomme stof kan eventuelt foreligge sammen med et eller flere af de ovenfor angivne bærestoffer, også i mikroindkapselform.

Suppositorier kan ud over det virksomme stof indeholde de gængse, vandopløselige eller vanduopløselige bærestoffer, f.eks. polyethylenglycoler, fedtstoffer, f.eks. kakaofedt eller højere estere, f.eks. C₁₄-alkohol med C₁₆-fedtsyre, eller blandinger af disse stoffer.

Salver, pastaer, cremer og geler kan ved siden af det virksomme stof indeholde de gængse bærestoffer, f.eks. animalske og vegetabiliske fedtstoffer, voksarter, paraffiner, stivelse, tragant, cellulosederivater, polyethylenglycoler, silicone, bentonitarter, kiseltsyre, talkum og zinkoxid eller blandinger af disse stoffer.

Puddere og spraymidler kan ud over det virksomme stof indeholde de gængse bærestoffer, f.eks. mælkesukker, talkum, kiseltsyre, aluminiumhydroxid, calciumsilicat og polyamidpulver eller blandinger af disse stoffer. Spraymidler kan desuden indeholde de gængse drivmidler, f.eks. chlorfluorcarbonhydrid.

Opløsninger og emulsioner kan ud over det virksomme stof indeholde de gængse bærestoffer, f.eks. opløsningsmidler, opløsningsformidlere og emulgatorer, f.eks. vand, ethanol, isopropanol, ethylcarbonat, ethylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglycol, 1,3-butylenglycol, dimethylformamid, olier, navnlig bomuldsfrøolie, jordnøddedeolie, majs-kimolie, olivenolie, ricinusolie og sesamolie, glycerol, glycerolformal, tetrahydrofurfurylalkohol, polyethylenglycoler og fedtsyreestere af sorbitan eller blandinger af disse stoffer.

Til parenteral anvendelse kan opløsningerne og emulsionerne også foreligge på steril og blodisotonisk form.

Suspensioner kan ud over det virksomme stof indeholde de gængse bærestoffer såsom flydende fortyndingsmidler, f.eks. vand, ethanol, propylenglycol, suspenderingsmidler, f.eks. ethoxylerede isostearylalkoholer, polyoxyethylensorbitol- og sorbitanestere, mikrokrySTALLINSK cellulose, aluminium-m-hydroxid, bentonit, agar-agar og tragant eller blandinger af disse stoffer.

De nævnte præparatformer kan også indeholde farvemidler, konserveringsstoffer samt lugt- og smagsforbedrende tilsætnin- ger, f.eks. pebermynteolie og eukalyptusolie samt sødemidler, f.eks. saccharin.

Den terapeutisk virksomme forbindelse skal i de oven- nævnte farmaceutiske præparater fortrinsvis være til stede i en koncentration fra ca. 0,1 til ca. 99,5 vægtprocent af den samlede blanding, fortrinsvis i en mængde på fra ca. 0,5 til ca. 95 vægtprocent.

De ovennævnte farmaceutiske præparater kan ud over den her omhandlede virksomme forbindelse også indeholde yderligere farmaceutisk virksomme stoffer.

Fremstillingen af de ovennævnte farmaceutiske præpara- ter sker på gængs måde efter kendte metoder, f.eks. ved blanding af det eller de virksomme stoffer med bærestoffet eller bærestofferne.

De omhandlede farmaceutiske præparater kan anvendes i humanmedicinen og veterinærmedicinen til forebyggelse, forbedring og/eller helbredelse af sygdomme.

Det virksomme stof eller dets farmaceutiske præpara- ter kan indgives lokalt, oralt, parenteralt, intraperitonealt og/eller rektalt, fortrinsvis parenteralt navnlig intravenøst.

I almindelighed har det såvel i human- som i veteri- nærmedicinen vist sig at være fordelagtigt at indgive det her omhandlede, virksomme stof i totalmængder på fra ca. 1 til

0

ca. 40, fortrinsvis fra 2 til 8 mg/kg legemsvægt pr. 24 timer, eventuelt i form af flere enkeltindgivelser til opnåelse af de ønskede resultater.

En enkelt indgivelse indeholder det her omhandlede virksomme stof, fortrinsvis i mængder på fra ca. 0,1 til ca. 4, navnlig fra 0,2 til 2 mg/kg legemsvægt. Det kan dog være nødvendigt at afvige fra de nævnte doseringer, nemlig afhængigt af arten og legemsvægten for det objekt, der skal behandles, lidelsens art og sværhedsgrad, præparatets art og indgivelsesmåden på lægemidlet samt det tidsrum eller interval, indenfor hvilket indgivelsen finder sted. Det kan således i nogle tilfælde være tilstrækkeligt at anvende mindre end den ovennævnte mængde virksomt stof, medens man i andre tilfælde må overskride den ovenfor angivne mængde virksomt stof. Fastlæggelsen af den hver gang påkrævede optimale dosering og indgivelsesmåde for det virksomme stof kan let foretages af enhver fagmand på grundlag af almindelig fagmands viden.

20 Eksempel 1

En chromatografisøjle med en diameter på 2,6 cm og en længde på 40 cm (Pharmacia K 26/40[®]) fyldes med CM-Sephadex[®] C 25. CM-Sephadex[®] C 25 er forinden ækvilibreret i 0,2 molær natriumacetat-puffer med en pH-værdi på 4,7. Efter fyldningen vaskes søjlen med destilleret, afgasset vand, indtil ledningsevnen er faldet til 0,1 mS/cm. Lavhøjden i søjlen andrager på dette tidspunkt 34 cm. Som forsøgsstof anvendes der 9,2 g af en forrenset acarbose, som foruden vand yderligere indeholder salte og andre urenheder. Acarbosen opløses i ca. 40 ml destilleret vand, pH-værdien indstilles på 4,7 ved tilsætning af noget saltsyre, og opløsningen fyldes op til 50 ml. Inhibitorindholdet andrager 446 550 SIE svarende til 5,75 g vandfri, ren acarbose. Stoffet påføres med en gennemstrømningshastighed på 100 ml/time (18,8 cm/time) på søjlen og eftervaskes med destilleret vand med en temperatur på 26°C og elueres. Forløbet af adskillelsen fremgår af fig. 1a på tegningen.

0

Hovedfraktionen forenes og giver et udbytte på 5,87 g med 399.300 SIE, dvs. 89% af den anvendte inhibitor. Den specifikke aktivitet andrager 72 SIE/mg i tørstoffet. HPLC-Metoden giver et indhold på 93% vægt-% på tørstofbasis.

5

Regenereringen af søjlen udføres med 800 ml 0,2 molær natriumacetatpuffer med en pH-værdi på 4,7, og den udvaskes derpå med 600 ml destilleret, afgasset vand.

Eksempel 2-5

10

Svarende til eksempel 1 gennemføres alle eksemplerne ifølge tabel I, idet dog temperaturen af søjlekappen varieres under elueringen. Der gås frem på den måde, at termostaten til søjleopvarmningen tilkobles 3 timer efter begyndelsen af påføringen, således at opvarmningen, alt efter den indstillede temperatur, har nået den ønskede værdi i løbet af 3-12 minutter. Rumfanget af hovedfraktionen er angivet i tabel I og for eksempel 5's vedkommende med en elueringstemperatur på 70°C i fig. 1b på tegningen.

15

20

25

30

35

0

Tabel I

Acarbose-chromatografi på CM-Sephadex[®] C 25
 Afhængighed af elueringsrumfang af temperaturen

5

Eksempel	Temperatur ved elueringen °C	Rumfang af hovedfrakti- onen ml	Udbytte		Indhold ifølge HPLC %
			g	%	
10					
1	26	1 163	5,87	89	95
2	40	840	6,25	100	92
3	50	570	6,04	91	90
4	60	460	5,92	86	92
15	5	380	6,62	99	94

Eksempel 6

En chromatografisøjle (Pharmacia K 26/70) fyldes som i eksempel 1 med CM-Sephadex[®] C 25, der dog er ækvilibreret ved en pH-værdi på 4,3 og vasket. Fyldehøjden andrager 47 cm. Som teststof anvendes der igen som i eksempel 1 en forrenset acarbose, idet der påføres 579 000 SIE i 200 ml vand. Gennemstrømningen andrager 117 ml/time (22 cm/time). Elueringen udføres med vand. Som i eksempel 1 elueres der først saltholdige fraktioner og dernæst acarbosen. Afstanden mellem afslutningen af de saltholdige fraktioner og begyndelsen af stigningen i acarbose andrager 162 ml. Elueringen af acarbosen accelereres ved opvarmning af søjlen til 45°C. Rumfanget af acarbosefraktionen andrager 1048 ml, og udbyttet andrager 577 000 SIE, dvs. 100% af den påførte mængde.

0

Eksempel 7

Som i eksempel 6 fyldes en chromatografisøjle med CM-Sephadex[®] C 25, der imidlertid er ækvilibreret til en pH-værdi på 4,9 og vasket. 200 ml af testopløsningen med 579 000 SIE påføres, og stofferne elueres med vand. Mellem de saltholdige fraktioner og begyndelsen af acarbosefraktionen er der kun endnu en afstand på 23 ml. Rumfanget af hovedfraktionen andrager 707 ml, og der opvarmes på ny til 45°C. Udbyttet andrager 577 000 SIE, dvs. 100% af den påførte mængde.

10

Eksempel 8

En chromatografisøjle (Pharmacia K 26/40) fyldes med CM-Sepharose[®] Cl 6B fast flow, ækvilibreres til en pH-værdi på 4,5 med 0,2 molær natriumacetatopløsning og udvaskes med vand. 40,5 ml af en opløsning af forrenset acarbose med en hæmningsvirkning på 247 300 SIE påføres. Gennemstrømningshastigheden andrager 100 ml/time (18,8 cm/time). Elueringen finder sted med afgasset, destilleret vand, idet søjlen ved begyndelsen af acarbose-elueringen opvarmes til 45°C. Afstanden mellem salt- og acarbosefraktionen andrager 38 ml, og rumfanget af hovedfraktionen udgør 600 ml. Udbyttet af acarbose andrager 247 000 SIE, dvs. 100% af den anvendte mængde. Indhold ifølge HPLC-metoden er 98 vægt-% på tørstofbasis.

20

Eksempel 9

En chromatografisøjle ifølge eksempel 8 fyldes med carboxymethylcellulose CM 52[®] (Whatman), ækvilibreres med 0,2 molær natriumacetatopløsning til en pH-værdi på 4,5 og udvaskes med vand. Fyldningshøjden andrager 36 cm. 62 ml af en opløsning af forrenset acarbose med en hæmningsvirkning på 394 000 SIE påføres og elueres som i eksempel 8. Acarbosefraktionen følger umiddelbart efter saltfraktionen. Rumfanget af acarbosefraktionen andrager 850 ml, og udbyttet er 322 000 SIE, dvs. 82% af den anvendte mængde. Indholdet ifølge HPLC-metoden udgør 90 vægtprocent på tørstofbasis.

35

0

Eksempel 10

En chromatografisøjle ifølge eksempel 8 fyldes med Matrex-Cellufine CM[®] (Amicon), ækvilibreres med 0,2 molær natriumacetatopløsning til en pH-værdi på 4,5 og udvaskes med vand. 5
Fyldningshøjden udgør 37 cm. 62 ml af en opløsning af forrenset acarbose med en hæmningsvirkning på 394 000 SIE påføres og elueres som beskrevet i eksempel 8. Acarbosefraktionen følger efter saltfraktionen i en afstand på 23 ml. Rumfanget af acarbosefraktionen andrager 960 ml, og udbyttet 10
udgør 350 000 SIE, dvs. 89% af den påførte mængde. Indholdet ifølge HPLC-metoden udgør 98 vægtprocent på tørstofbasis.

15

20

25

30

35

P A T E N T K R A V.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af acarbose med et acarbose-indhold på mindst 90 vægtprocent på tørstofbasis, eller en vandig opløsning deraf, k e n d e t e g n e t
5 ved, at man påfører forrenset acarbose med et acarbose-indhold på 78-88 vægtprocent på tørstofbasis i vandig, 1-20 vægtprocents opløsning med en pH-værdi på fra 3,5 til 6,5 på en søjle, der som fyldmateriale indeholder svagt sure kationbyttere med carboxylgrupper på basis af dextran, agarose og cellulose, eller ud fra disse under tilsætning af
10 polyacrylamid afledte ionbyttere, hvorhos rumfanget af den påførte, forrensede acarbose-opløsning højst er lig med søjlens fyldrumfang, hvorpå søjlen udelukkende elueres med afgasset, destilleret vand, hvorefter acarbosen om ønsket
15 isoleres fra eluatet på gængs måde.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der påføres et rumfang af den forrensede acarbose-opløsning, der svarer til søjlens fyldrumfang.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
20 ved, at rumfanget af den forrensede acarboseopløsning udgør under 60% af søjlens fyldrumfang.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pH-værdien i den forrensede acarboseopløsning andrager 3,5-6,0, fortrinsvis 4,0-5,5.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1-4, k e n d e t e g n e t
25 ved, at man påfører den forrensede acarboseopløsning ved temperaturer op til stuetemperatur, fortrinsvis i området fra 4 til 25°C, hvorpå man efter eluering af saltene og farvende bestanddele opvarmer søjlen til 25-90°C, fortrinsvis
30 40-70°C.

