

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818725.8

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/215

A61K 31/365 C07C 61/16

C07C 67/02 C07C 69/013

C07C 69/757 C07D309/30

C12N 1/15 C12N 15/53

C12N 15/80 C12P 7/42

C12P 7/62 C12P 17/06

[11] 公开号 CN 1433305A

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[22] 申请日 2000.11.28 [21] 申请号 00818725.8

[30] 优先权

[32] 1999.11.30 [33] US [31] 60/168,056

[86] 国际申请 PCT/US00/32391 2000.11.28

[87] 国际公布 WO01/39768 英 2001.6.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.30

[71] 申请人 拜奥盖尔药厂有限公司

地址 匈牙利德布勒森

[72] 发明人 V·科里 L·迪克 I·福加斯

C·斯扎搏 E·A·纳格伊内

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝 姜建成

权利要求书 4 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 从发酵肉汤中回收抑素化合物的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种新的用于从发酵肉汤中回收化合物的方法，包含的步骤为：通过萃取形成富含化合物的溶液，从该富含溶液中获得所述化合物的盐，纯化该化合物的盐并将其转换盐型至该化合物的金属盐。

ISSN 1008-4274

1. 一种从发酵肉汤中分离选自帕伐他丁、密实菌素和洛伐他丁的化合物的钠盐的方法，包括以下步骤：
- a) 形成所述化合物的富含溶液；
 - 5 b) 从所述富含溶液中得到该化合物的盐；
 - c) 纯化该化合物的盐；
 - d) 通过以下方法转换该化合物的盐型成为该化合物的钠盐：
 - i) 将该化合物从其盐中解离出来，
 - ii) 将该化合物与氢氧化钠水溶液相接触，由此形成该化合物
10 钠盐的水溶液，和
 - iii) 通过将该化合物的钠盐水溶液与水不溶性离子交换树脂接触，除去过剩的钠离子；和
 - e) 从该化合物钠盐的水溶液中分离出该化合物的钠盐。
2. 权利要求 1 的方法，其中，所述富含溶液是富含的水溶液，其
15 通过以下步骤形成：
- a) 将酸性发酵肉汤与有机萃取溶剂相接触，并由此形成该化合物的有机萃取液；
 - b) 通过与碱性水溶液接触来反萃取该有机萃取液，由此形成含水
20 萃取液，和
 - c) 浓缩所述含水萃取液，由此形成富含该化合物的水溶液。
3. 权利要求 1 的方法，其中，所述富含溶液是富含的有机溶液，其通过以下步骤形成：
- a) 将酸性发酵肉汤与有机萃取溶剂相接触，并由此形成所述化合物的有机萃取液；
 - 25 b) 通过与碱性水溶液接触来反萃取该有机萃取液，由此形成所述化合物的含水萃取液，和
 - c) 通过与有机重萃取溶剂相接触而从含水萃取液中重萃取所述化合物，由此形成富含该化合物的有机溶液。
4. 权利要求 2 的方法，其中，含水萃取液通过真空蒸馏进行浓缩。
- 30 5. 权利要求 2 的方法，其中，将酸性发酵肉汤与有机萃取溶剂相接触是在 pH 值为大约 pH 1 到大约 pH 6 之间进行的。
6. 权利要求 2 的方法，其中，用碱性水性溶液反萃取是在 pH 值

为大约 pH 7.0 和大约 pH 13.7 之间进行的。

7. 权利要求 2 的方法, 其中, 有机萃取溶剂选自甲酸 C₂-C₄ 烷基酯、C₂-C₄ 烷基羧酸的 C₁-C₄ 烷基酯、二氯甲烷、二氯乙烷、氯仿、四氯化碳和丁基甲基酮。

5 8. 权利要求 7 的方法, 其中的有机萃取溶剂是乙酸酯。

9. 权利要求 3 的方法, 其中, 将酸性发酵肉汤与有机萃取溶剂相接触是在 pH 为大约 pH 1 和大约 pH 6 之间进行的。

10. 权利要求 3 的方法, 其中, 用碱性水溶液进行反萃取是在 pH 为大约 pH 7.0 和大约 pH 13.7 之间进行的。

10 11. 权利要求 3 的方法, 其中, 用有机溶剂重萃取所述化合物是在 pH 为大约 pH 1 和大约 pH 6 之间进行的。

12. 权利要求 3 的方法, 其中的有机萃取溶剂和有机重萃取溶剂各自独立地选自甲酸 C₂-C₄ 烷基酯、C₂-C₄ 烷基羧酸的 C₁-C₄ 烷基酯、二氯甲烷、二氯乙烷、氯仿、四氯化碳、丁基甲基酮。

15 13. 权利要求 12 的方法, 其中的有机萃取溶剂和有机重萃取溶剂是乙酸酯。

14. 权利要求 13 的方法, 其中的有机萃取溶剂和有机重萃取溶剂是乙酸异丁酯。

20 15. 权利要求 1 的方法, 其中, 获得所述化合物的盐是在温度为大约 -10°C 到大约 +60°C 之间进行的。

16. 权利要求 1 的方法, 其中, 获得该化合物的盐包括通过向所述富含溶液中加入金属盐、氨、胺或铵盐来沉淀所述化合物的盐。

17. 权利要求 16 的方法, 其中, 通过加入铵盐使所述化合物的盐沉淀。

25 18. 权利要求 17 的方法, 其中, 铵盐选自 NH₄Cl、NH₄Br、NH₄I、(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、(NH₄)₃PO₄、(NH₄)₂S₂O₄、NH₄OAc 和 NH₄SCN。

19. 权利要求 18 的方法, 其中的铵盐是 NH₄Cl。

20. 权利要求 16 的方法, 其中, 通过加入氨气来沉淀所述化合物的盐。

30 21. 权利要求 16 的方法, 其中, 通过加入氨气和铵盐来沉淀所述化合物的盐。

22. 权利要求 16 的方法, 其中, 通过加入金属盐来沉淀所述化合

物的盐。

23. 权利要求 22 的方法，其中的金属盐选自锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、铜盐、铁盐、镍盐、锰盐、锡盐、锌盐和铝盐。

24. 权利要求 23 的方法，其中的金属盐选自含有 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 金属离子的盐。

25. 权利要求 16 的方法，其中，通过加入胺盐沉淀所述化合物的盐。

26. 权利要求 25 的方法，其中的胺盐具有的胺成分选自 C_1 - C_3 伯、仲和叔烷基胺。

27. 权利要求 1 的方法，其中，纯化所述化合物盐的步骤包括该化合物盐的重结晶步骤。

28. 权利要求 27 的方法，其中，所述化合物盐的重结晶包括下列步骤：

15 a) 将该化合物的盐溶解于水中，由此形成该化合物盐的水溶液；
b) 用逆溶剂稀释该化合物盐的水溶液；和
c) 加入含与该化合物盐相同的金属、铵、或者胺鎓(aminium)离子的盐。

29. 权利要求 28 的方法，其中的逆溶剂选自乙酸乙酯、乙酸异丁酯、异丁醇、丙酮、乙腈和乙醇。

30. 权利要求 28 的方法，其中，含与化合物盐相同的金属、铵、或者胺鎓离子的盐是铵盐。

31. 权利要求 30 的方法，其中的铵盐选自 NH_4Cl 、 NH_4Br 、 NH_4I 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 NH_4OAc 和 NH_4SCN 。

25 32. 权利要求 31 的方法，其中的铵盐是 NH_4Cl 。

33. 权利要求 1 的方法，其中，从所述化合物的盐中解离出所述化合物的操作包括以下步骤：

a) 将所述化合物的盐溶于含水溶剂中，
b) 向含水溶剂中加入质子酸，和
30 c) 将化合物从含水溶剂萃取至有机溶剂中，以形成所述化合物的有机溶液，

另外，其中通过用氢氧化钠水溶液反萃取所述化合物的有机溶

液，而使该化合物与氢氧化钠水溶液相接触。

34. 权利要求 33 的方法，其中萃取化合物是在 pH 为大约 pH 1 到大约 pH 6 之间进行的。

35. 权利要求 33 的方法，其中，有机溶剂选自甲酸 C₂-C₄ 烷基酯、C₂-C₄ 烷羧酸的 C₁-C₄ 烷基酯、二氯甲烷、二氯乙烷、氯仿、四氯化碳和丁基甲基酮。

36. 权利要求 35 的方法，其中，有机溶剂是乙酸异丁酯。

37. 权利要求 33 的方法，其中，将化合物的有机溶液反萃取至氢氧化钠水溶液中的操作是在 pH 为大约 pH 6.5 到大约 pH 13.7 之间进行。

38. 权利要求 1 的方法，其中，分离化合物钠盐的操作包括以下步骤：

a) 浓缩化合物钠盐的水溶液，和

b) 用有机溶剂或者有机溶剂混合物稀释该化合物钠盐的水溶液。

39. 权利要求 1 的方法，其中，分离化合物钠盐的操作包括冷冻干燥该化合物钠盐的水溶液的步骤。

40. 权利要求 38 的方法，其中，通过真空蒸馏来浓缩所述化合物钠盐的水溶液。

41. 权利要求 38 的方法，其中浓缩所述化合物钠盐的水溶液通过毫微过滤进行。

42. 权利要求 38 的方法，其中，所述化合物钠盐的水溶液用丙酮稀释。

43. 权利要求 38 的方法，其中，所述化合物钠盐的水溶液用选自丙酮/乙腈混合物、乙醇/乙腈混合物和乙醇/乙酸乙酯混合物的有机溶剂混合物稀释。

44. 权利要求 38 的方法，其中，分离化合物钠盐是在大约 -10°C 到大约 +60°C 的温度之间进行的。

45. 基本上不含帕伐他丁内酯的帕伐他丁钠。

46. 权利要求 45 的帕伐他丁钠，其中，总杂质含量约为 0.5 重量%或者更少。

47. 权利要求 46 的帕伐他丁钠，其中，总杂质含量约为 0.2 重量%或者更少。

从发酵肉汤中回收抑素化合物的方法

相关申请

- 5 本申请根据 35 U.S.C§119(e)要求 1990 年 11 月 30 日申请的 No. 60/168, 056 美国临时专利申请中的优先权。

发明领域

- 10 本发明涉及一种分离所需化学产物的方法，该化学产物得自在含水发酵肉汤中实施的反应。本发明进一步涉及从发酵肉汤中分离帕伐他丁，密实菌素 (compactin) 和洛伐他丁，尤其是分离由密实菌素发酵而成的帕伐他丁。

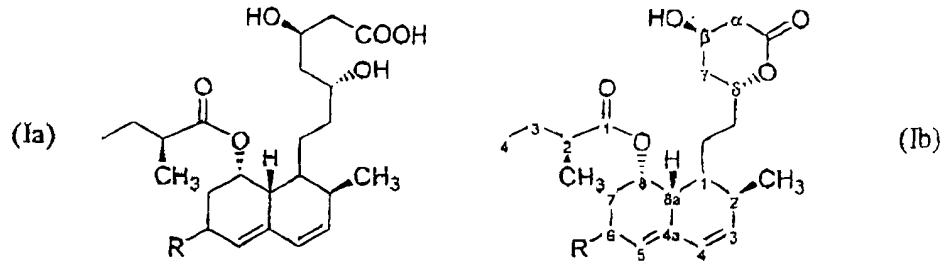
发明背景

- 15 心血管疾病的并发症诸如心肌梗塞、中风和外周血管疾病在美国占死亡原因的一半。血流中高水平的低密度脂蛋白 (LDL) 与冠状损伤的形成有关，冠状损伤将阻碍血液流动，且能使血栓破裂和导致血栓形成，Goodman 和 Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (治疗学之药理学基础) 879 (第 9 版, 1996)。降低血浆中 LDL 水平证明能降低心血管疾病病人和虽无心血管疾病但患有高胆固醇的病人临床发病的风险。斯堪的纳维亚辛伐他丁生存研究小组 (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group), 1994; 脂类研究临床项目 (Lipid Research Clinics Program), 1984a, 1984b。

- 20 抑素 (statin) 药物是目前用于降低易患心血管疾病的病人血管中 LDL 水平的最有疗效的药物。此类药物特别包括密实菌素、洛伐他丁、辛伐他丁、帕伐他丁和氟伐他丁。抑素药物的作用机理已有较详细的说明。它们通过竞争性地阻止 3-羟基-3-甲基-戊二酰基-辅酶 A 还原酶 ("HMG-CoA 还原酶") 而破坏了胆固醇和其它固醇在肝脏中的合成。HMG-CoA 还原酶催化 HMG-CoA 到甲羟戊酸的转化反应，该反应为生物合成胆固醇的速率决定步骤。因此，阻止该反应将导致胆固醇在肝脏中形成速度的减慢。

- 30 帕伐他丁是化合物 $[1S-[1\alpha(\beta', \delta')2\alpha, 6\alpha, 8\beta(R'), 8a\alpha]]-1, 2, 6, 7, 8, 8a$ -六氢- $\beta, \delta, 6$ -三羟基-2-甲基-8-(2-甲基-1-氧代丁氧基)-1-萘-庚酸 (CAS 登记号 No. 81093-370) 的常用医药名称。帕伐他

丁游离酸形式的分子结构描述于式(Ia)中,其中R=OH。其内酯形式描述于式(Ib)中,其中将原子标号,以表明原子的编号方式。



5 帕伐他丁、密实菌素(式 Ib, R=H)、洛伐他丁(式 Ib, R=CH₃)、辛伐他丁和氟伐他丁各自具有烷基链,该烷基链由闭合形成内酯的羧酸基团封端,并且在相对于羧酸基团的β和δ位置上带两个羟基基团。所述烷基链是 HMG-CoA 还原酶的结合部分。在δ位的羧酸基团和羟基基团倾向于内酯化,如式(Ib)所示。可内酯化的化合物如抑素可以游

10 离酸的形式、或以内酯的形式、或者两种形式的平衡混合物存在。内酯化作用导致了生产抑素药物的加工困难,这是因为游离酸和内酯形式的化合物具有不同的极性。提纯其中一种形式的方法可能会与杂质一起除去另一种形式,导致较低的产量。因此,为了以高产率进行分离,当处理可内酯化的化合物时通常必须非常小心。

15 帕伐他丁显示了优于其它抑素的重要的治疗优点。帕伐他丁选择性地抑制胆固醇在肝脏和小肠中的合成,但基本不影响其在外周细胞中的合成。Koga, T.等,生物化学生物物理学报(Biochim. Biophys. Acta), 1990, 1045, 115-120。这一选择性似乎部分归因于六氢化萘核的 C-6 位置上羟基的存在。C-6 位置在密实菌素中被氢原子占据,在洛伐他丁中则被甲基占据。较其它更具亲脂性的同类物质而言,帕伐他丁透过周边细胞的亲脂性膜的能力要弱些, Serajuddin 等,药物科学杂志(J. Pharm. Sci.), 1991, 80, 830-34, 且帕伐他丁有限的移动性被认为是导致其在肝脏和肠中更容易发生局部定位的原因。

20

根据美国专利 4, 346, 227(此处引入作为参考),帕伐他丁具报道

25 由 M. Tanaka 等在研究密实菌素的代谢时被作为密实菌素的代谢物分离而首次获得。根据'227 专利,帕伐他丁可通过使用各种微生物发酵密实菌素而得到,这些微生物是:犁头霉属(*Absidia coerulea*) IF0 4423 孢子,小克银汉霉属(*Cunninghamella echinulata*) IF0 4445,

产玫瑰色链霉菌 (*Streptomyces rosochromogenus*) NRRL 1233, *Syncephalastrum racemosum* IFO 4814 和 *Syncephalastrum racemosum* IFO 4828。发酵之后, 帕伐他丁通过以下方法从发酵肉汤中分离: 将肉汤酸化到 pH 值为 3, 然后用乙酸乙酯萃取帕伐他丁和其它非亲水性的有机物, 接着用盐水洗涤。通过加入催化量的三氟醋酸使帕伐他丁游离酸内酯化, 之后用稀碳酸氢钠中和, 在硫酸钠上干燥, 然后蒸发至干燥。残余物用制备反相高效液相色谱 ("HPLC") 进行纯化。本领域技术人员懂得, 反相 HPLC 对于大规模化合物制剂的纯化而言不是一个经济的方法。

10 美国专利 5,942,423 涉及到使用马杜拉放线菌属 (*Actinomadura*) 菌株的密实菌素到帕伐他丁的微生物羟基化。记载在实施例中的唯一分离方法是分离微量的物质用于发酵肉汤分析量 HPLC 的分析。根据更为广泛的关于从肉汤中分离帕伐他丁的讨论, 优选的分离方法是 HPLC。

15 共同转让、共同未决的 PCT 申请序列号 PCT/US00/19384 涉及了使用 *Micromonospora maculata* 菌株的密实菌素到帕伐他丁的微生物羟基化, 所述菌株能异乎寻常地抵抗密实菌素的抗菌效果。

美国专利 5,202,029 涉及了一种使用 HPLC 纯化 HMG-CoA 还原酶抑制剂的方法。在 HPLC 柱上进行杂质分离后, HMG-CoA 还原酶抑制剂以溶于洗脱剂的溶质形式从 HPLC 柱上洗脱下来。洗脱剂被部分蒸发, 之后加入水以诱导 HMG-CoA 还原酶抑制剂结晶。

25 美国专利 5,616,595 涉及通过切向过滤从发酵肉汤中回收水不溶性化合物的连续方法。所述发酵肉汤通过过滤器进行循环。由于通过过滤器水份损失, 因此肉汤经每次循环逐渐浓缩。一旦达到所需的浓度, 使用可溶解所需化合物的溶剂来浆化浓缩的肉汤。然后使所述浆液通过过滤器进行循环。所需化合物的溶液作为滤液收集起来, 再从该滤液中分离出所需的化合物, 并任选地进行进一步的纯化。据说此方法能广泛适用于各种化合物, 包括洛伐他丁、帕伐他丁和辛伐他丁。

30 分离内酯形式的洛伐他丁的方法记载于美国专利 5,712,130 中。在此方法中, 洛伐他丁用乙酸丁酯从发酵肉汤中萃取出来。然后将所得溶液进行离心, 弃去分离出来的水相。有机相则在大于 40℃ 下真空

蒸馏，此操作除了能够浓缩溶液之外，还能通过去除水份而促进内酯化作用。洛伐他丁内酯的晶体在冷却时结晶，并重结晶达到90%或者更高的纯度。本领域技术人员能理解，本方法对于分离抑素的游离羧酸或者羧酸盐形式并不适合。

- 5 目前，最经济可行的制备帕伐他丁的方法是通过密实菌素在 C-6 位置的酶的羟基化。然而，所知的从发酵肉汤中分离出抑素的方法并不适合于分离钠盐形式的帕伐他丁，不能达到药学上可接受的纯度水平，或者需要色谱分离以获到高纯度。本发明满足了本领域中对于无
- 10 需色谱纯化即能有效地从发酵肉汤中高纯度、高产率地分离出用于制备规模的帕伐他丁的有效方法的需要。

发明概述

本发明的目的是提供从含水发酵肉汤中分离抑素化合物的有效方法。本发明尤其提供了无需色谱分离的、工业制备规模的纯化帕伐他丁、密实菌素和洛伐他丁的方法。

- 15 本发明进一步的目的是为了得到高纯形式和高产量的帕伐他丁，以便获得显著的微生物转换反应的立体选择性和区域选择性，并还获得较高的产率，且更为经济。帕伐他丁是以最少量的溶剂消耗从肉汤中分离出来，以高产率提纯后转化成药学上可接受的钠盐。

- 20 本方法涉及从含水发酵肉汤中将帕伐他丁萃取到有机溶剂中，将帕伐他丁反萃取到碱性水溶液中，且任选地重萃取至有机溶剂中或者浓缩水溶液，从而产生水溶液或有机溶液，其帕伐他丁的浓度相对于最初在发酵肉汤中的浓度更为富集。通过沉淀帕伐他丁的金属盐或者铵盐从富含溶液中得到帕伐他丁，然后再通过重结晶其盐而进行提纯。重结晶的盐随后进行盐型转换，形成帕伐他丁钠盐，而所有过剩
- 25 的钠离子用离子交换树脂去除。帕伐他丁钠盐然后可从溶液中通过重结晶、冷冻干燥或者其它方法分离出来。

发明详述

- 30 本发明是从含水发酵肉汤中分离帕伐他丁、密实菌素和洛伐他丁的方法。通过从发酵肉汤中分离帕伐他丁钠来对本发明进行说明。然而应理解的是，本方法能用于提纯通过微生物或者酶过程而制备的其他化合物。

密实菌素的酶促羟基化

帕伐他丁钠是通过密实菌素的酶促羟基化而合成的，如在美国专利 5,942,423 和 4,346,227 中所描述。从中分离帕伐他丁的羟基化肉汤可以是用于工业规模的密实菌素发酵用的任何含水肉汤。如果发酵结束时肉汤呈中性或者碱性，则加入酸使肉汤 pH 值为约 1 到 6，优选为 1 到 5.5，更优选为 2 到 4。可使用的酸包括盐酸、硫酸、三氟醋酸或者任何其它质子酸，优选 1M 水溶液中 pH 小于 1 的酸。酸化发酵肉汤使得任何帕伐他丁羧酸盐转化成了游离酸和/或内酯。

帕伐他丁钠的分离

本发明的方法涉及以下步骤：形成富含帕伐他丁的溶液，从富含帕伐他丁的溶液中获得其盐，纯化帕伐他丁盐，将帕伐他丁盐转化成帕伐他丁钠盐且分离出帕伐他丁钠盐。

在第一步中，通过顺序的萃取和反萃取操作，从含水发酵肉汤中获得帕伐他丁的相对较高浓度的溶液。发酵通常是在很高的稀释度下进行的。肉汤通过稀释达到较高的最大酶潜能。高稀释度的缺点是必须操作大体积的发酵介质，直至以更富集的形式得到所需产物为止。大体积对于分离方法有严格要求。色谱方法通常对于分离如此大的体积不实用，尤其当其中的溶剂是水的时候。当使用萃取方法进行分离的时候，有机萃取液的溶剂必须具有足够的极性，以同水竞争有利的产物分配，但极性也不能太大而导致主要溶解于水中。如果萃取没有效果，则需要大体积的有机溶剂来以高产率分离所需产物，然而此操作伴随着对处于发酵设备中间和周围的人员健康和安全的危险隐患。

我们发现，甲酸 C₂-C₄ 烷基酯和 C₂-C₄ 羧酸的 C₁-C₄ 烷基酯能从水性发酵肉汤中非常有效地萃取帕伐他丁。帕伐他丁内酯的分配系数通常是 1000:1 或者更高，而游离酸的分配系数通常是 10:1 或者更高。所述烷基可以是直链、支链或者环状的。优选的酯包括甲酸乙酯、甲酸正丙酯、甲酸异丙酯、甲酸正丁酯、甲酸仲丁酯、甲酸异丁酯、甲酸叔丁酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸正丙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙酸仲丁酯、乙酸异丁酯、乙酸叔丁酯、丙酸甲酯、丙酸乙酯、丙酸正丙酯、丙酸异丙酯、丙酸丁酯、丁酸甲酯、丁酸乙酯、丁酸正丙酯、丁酸异丙酯、丁酸丁酯、异丁酸甲酯、异丁酸乙酯、异丁酸丙酯和异丁酸丁酯。在这些优选的有机溶剂中，我们发现乙酸乙酯、乙酸异丁酯、乙酸丙酯和甲酸乙酯特别适宜。最优选的萃取溶剂是乙酸

异丁酯。其它的有机溶剂也可代替这些酯类。可使用卤化的卤代烃、芳香化合物、酮和酯，如二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、1,2-二氯乙烷、苯、丁基甲基酮、二乙基醚和甲基叔丁基醚。

在本发明的富集步骤中，通过有机萃取溶剂与发酵肉汤相接触而形成有机萃取液，有机溶剂优选选自以上所列。发酵肉汤的 pH 在大约 5 1 到大约 6 之间，优选 pH 值在大约 2 到大约 4 之间。

可以使用任何适用于以间歇或连续法对大体积液体进行混合的设备。由于发酵通常以间歇过程进行，因此间歇分离法为自然的选择。相应地，可以使用常规的大体积混合机和沉淀池或者适用于混合及相 10 分离的设备。本发明在此方面的优选方式中，较小部分(优选小于 50%(体积/体积))的萃取溶剂与发酵肉汤相接触，优选伴随温和的机械搅拌。在接触与相分离后，从耗尽帕伐他丁的发酵肉汤中分离出含有帕伐他丁的萃取溶剂。然后所述肉汤可一次或多次与有机萃取溶剂相 15 接触，且每次均可对得到有机萃取液进行合并。所得的帕伐他丁有机萃取液的体积可大于或得小于所述发酵肉汤的体积。

形成富含帕伐他丁的溶液的第二个操作是将帕伐他丁反萃取至碱性水溶液中。反萃取除去了一些或者全部非极性有机杂质，且如果存在有帕伐他丁内酯的话，将促进帕伐他丁内酯环再次打开。尽管不想使其以任何方式受限于特定的化学理论或者机理，但是根据非常确定的 20 化学理论，帕伐他丁在碱性含水萃取液中为羧酸盐阴离子的形式。通过使用体积少于有机萃取液的一定体积的水性碱，反萃取可用来浓缩帕伐他丁。所述碱优选为 NaOH、NH₄OH 或者 KOH，最优选为 NH₄OH 或者 NaOH，且碱性水溶液优选 pH 值在大约 7.0 到大约 13.7 之间，更优选在大约 7 到大约 13 之间，最优选在大约 7.5 到大约 11 之间。萃取 25 溶剂与碱性水溶液相接触，直到有机相中的帕伐他丁量基本被耗尽为止，如通过薄层色谱或者其它方法(包括主观判断)所确定的，其已进行了完全萃取所需的充分接触。为达到最佳回收，可采用多种反萃取。然而，当有机相是乙酸丁酯时，单一的反萃取非常有效。优选地，实施反萃取时碱性水溶液的体积少于有机萃取液体积的三分之一，更优 30 选少于四分之一，而最优选是少于有机萃取液体积的约五分之一。在本方法中用于随后从中获得帕伐他丁的浓缩水溶液的优选浓度范围为大约 2 到大约 50g/L，更优选为大约 5 到大约 15g/L。

含水萃取液可通过蒸馏、优选通过真空蒸馏进行进一步浓缩，以提高溶液的浓度。在通过蒸馏进行进一步的浓缩之前，应将 pH 调整到大约 7 到大约 13.7 之间，优选在大约 7.5 到大约 11 之间，最优选在大约 8 到大约 10 之间。真空蒸馏可通过在 5-120mmHg 绝对压力下将含水萃取液由大约 30℃ 加热到大约 80℃ 进行。本方法相关领域的技术人员能力所及范围内的其它真空蒸馏条件的选取都是可行的。

作为在随后的操作中从富集水溶液中获得帕伐他丁的另一不同选择，也可从富集有机溶液中得到帕伐他丁。在含水萃取液用酸再次酸化后，通过将帕伐他丁重萃取至有机溶剂中而形成富含帕伐他丁的有机溶液，酸化用的酸优选三氟醋酸、盐酸、硫酸、乙酸或者磷酸，更优选的是硫酸或者磷酸，酸化至 pH 为大约 1.0 到大约 6.5，更优选为大约 2.0 到大约 4.0。根据条件，帕伐他丁羧酸盐阴离子可被质子化而形成极性小于羧酸盐的帕伐他丁游离酸，或者被内酯化为极性更小的形式。

帕伐他丁重萃取至重萃取溶剂中，该溶剂选自上述适用于从发酵肉汤中萃取帕伐他丁的有机溶剂。该有机溶剂可以但不必同于从发酵肉汤中萃取帕伐他丁所用的溶剂。在此重萃取中，通过重萃取至一定量的有机溶剂中而实现帕伐他丁的进一步富集，其中所述有机溶剂优选少于约 50% (体积/体积) 的含水萃取液的体积，更优选为大约 33% (体积/体积) 到大约 20% (体积/体积)，再更优选大约为 25% (体积/体积) 含水萃取液的体积。相应地，如在实施例 1 中进一步所例证，帕伐他丁可从 100L 发酵肉汤中以最初有机萃取液的 89% 的产率浓缩至 8L 高含量的有机溶液。将为本领域技术人员理解的是，通过进行多重萃取可以得到更高产率的纯化帕伐他丁，而在用于实施本发明的优选方式中只对单一的萃取进行了描述。此优选方式实现了节约溶剂和高产率之间的平衡。偏离通过重复萃取 (以上仅描述了一种) 而进一步提高产率的优选方式并不必然背离本发明的精神。在进行用“盐析”法从富集有机溶液中获得帕伐他丁的操作之前，优选将该富集有机溶液进行干燥，且任选地用活性炭进行脱色，所述干燥可以使用常规干燥剂如 $MgSO_4$ 、 Na_2SO_4 、 $CaSO_4$ 、硅石和珍珠岩等。然后通过常规方法，如通过过滤或者倾斜对经干燥和/或脱色的富集有机溶液进行分离。

在本方法的下一步骤中，可如情所致从富集水溶液或富集有机溶

液中获得帕伐他丁盐。该盐从富集溶液中通过沉淀获得。通过向富集溶液中加入金属盐、氨水、胺、氨的盐或者胺盐诱导沉淀发生。

5 可用的金属盐包括氢氧化物、醇盐、卤化物、碳酸盐、硼酸盐、磷酸盐、硫氰酸盐、醋酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫代硫酸盐及任何其它的在水中具有高溶解度的盐。金属盐的金属包括锂、钠、钾、钙、镁、铜、铁、镍、锰、锡、锌和铝。优选的盐类是以下金属阳离子的盐类： Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Al^{3+} 。最优选用以诱导帕伐他丁金属盐沉淀的盐的金属阳离子是 Na^+ 和 K^+ 。

10 通过加入氨水或者胺，帕伐他丁还可作为铵盐或者胺盐沉淀。所述胺可以是伯、仲或叔胺。不是太受阻以致于阻止胺氮和帕伐他丁羧基基团之间的离子相互作用的任何烷基胺或者芳基胺均可以使用。所述胺类包括但不限于甲基、二甲基、三甲基、乙基、二乙基、三乙基及其它 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 的伯、仲和叔胺；且进一步包括吗啉、N-甲基吗啉、异丙基环乙基胺、哌啶等。无论在氮上的取代不存在、存在或具有多重性，我们在下文将通过氨或胺的反应而形成的盐称为铵盐。其含义意在包括胺的盐和氨的盐。

15 还可以通过单独加入铵盐或者加入结合氨水、胺或其它金属盐的铵盐来诱发帕伐他丁铵盐沉淀。优选的铵盐是以下的氨盐： NH_4Cl 、 NH_4Br 、 NH_4I 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 NH_4OAc 和 NH_4SCN ，最优选的是 NH_4Cl 。

20 金属盐、铵盐和高沸点液体及固体胺可通过常规方法加入，优选是在具有优良通风的区域，以固体、纯液体或者以在水溶剂或有机溶剂中的溶液形式加入。加入气态氨需要特殊的装置，以处置腐蚀性气体。包括压力仓、调节器、阀门或者管线的这样的装置是广泛地可以获得的。氨在常压（环境压力）下引入到所述富含溶液的上部，或者当使用压力仓时，所用压力为高压。或者，氨可以泡状通过溶液，优选要伴有搅拌，以减少通入管被沉降的帕伐他丁铵盐堵塞。

25 在本发明方法的优选实施方案中，通过加入氨或者胺从所述富含溶液中得到铵盐形式的帕伐他丁。在更优选的实施方案中，通过向富含溶液通入气态氨而从中得到以帕伐他丁氨盐形式的帕伐他丁。氨产生高极性的帕伐他丁铵盐，该盐易于从逆溶剂（antisolvent）中以高产

率沉淀出来。在最优选的实施方案中，通过加入气态氨和铵盐得到以帕伐他丁氨盐形式的帕伐他丁。最优选的铵盐是 NH_4Cl ，其具有的优点是：当所述富含有机溶液还没有充分干燥的时候，其形成浓缩的氯化铵水溶液。

5 金属盐、氨盐、胺盐和/或者铵盐加入时的温度可通过进行小规模的反应并监控该反应的放热度这种常规的试验过程来确定。优选的是，溶液的温度不能超过 40°C 。虽然可出现高达 80°C 的温度而并不引起帕伐他丁明显分解，但是本发明中的很多有机溶剂将会在较低的温度下沸腾。当使用氨时，优选的温度范围是从大约 -10°C 到大约 40°C 。

10 一旦沉淀显示出终止的迹象，或者帕伐他丁的析出通过其它方式被确定基本上完成时，加入过程应停止。当使用了氨或者挥发性胺时，容器必须进行排气以排除过剩的烟气。所得结晶通过过滤、倾斜溶剂、蒸发溶剂或者其它类似的方法进行分离，优选方法为过滤。

在任选地对沉淀的结晶进行冲洗后，通过一次或者多次的重结晶对帕伐他丁盐进行提纯。为了提纯帕伐他丁盐，首先将该盐溶解在水中。优选使用小量的水。当得到的是胺盐而不是金属盐或者氨盐时，进行溶解通常需要多一点的水。一旦帕伐他丁盐已完全溶解，通过加入逆溶剂而使溶液的极性下降。逆溶剂是帕伐他丁盐在其中很难溶解的水溶性有机溶剂或者溶剂混合物。适宜的水溶性有机溶剂包括丙酮、乙腈、乙酸烷基酯、异丁醇和乙醇。

20 帕伐他丁盐可自发的重结晶，或者也可以通过采取进一步的步骤诸如加入共同离子、冷却或者加入晶种的方法而诱发其重结晶。通过加入共同离子来进一步诱发重结晶时，将具有与帕伐他丁盐相同的金属离子或者铵离子的盐加入到混合物中。用于诱导帕伐他丁盐重结晶的适宜的盐类是与将帕伐他丁盐从富含溶液中沉淀出来所用的盐相同的金属盐或铵盐。根据优选的方法（其中帕伐他丁以铵盐的形式获得），是加入先前用于获得帕伐他丁盐的氨或者胺的氯化物盐来使帕伐他丁盐重结晶。在最优选的实施方案中（其中得到的是帕伐他丁的氨盐），加入的盐最优选为 NH_4Cl 。

30 重结晶可在大约 -10°C 和大约 60°C 之间进行，优选在大约 0°C 和大约 50°C 之间，最优选是在大约 0°C 和大约 40°C 之间。在帕伐他丁盐基本上从溶液中重结晶出来后，将该晶体分离且可以例如 1:1 的乙酸异

丁酯和丙酮的混合物进行洗涤，之后进行干燥。干燥可在常温下进行，但优选是在低于 45℃、最好在约 40℃ 的温和高温下进行。任选地，可重复进行重结晶以获得良好效果，如实施例 7 和 8 所示。每次重复过程获得大约 92-96% 的产率。

- 5 即使在重结晶后，帕伐他丁依然含有有机杂质，该杂质在 HPLC 上的相对保留时间 (RRT) 是 0.9。在联用 UV 检测和 HPLC 色谱的基础上，估计有机杂质大约为总组成的 0.2%。有机杂质可通过以下方法除去。

所述帕伐他丁盐溶解在水中，然后优选加入最少量的或者大约 6ml g⁻¹ 和大约 0.2% (体积/体积) 的异丁醇。通过加入氢氧化钠升高 pH 值从大约 pH 8 到大约 pH 14，优选从大约 pH 10 到大约 pH 13.7，且将此混合物在大约 10℃ 到大约 50℃ 下保持 10-200 分钟，优选为在大约 20℃ 到大约 30℃ 下保持 60-100 分钟。该溶液然后用无机酸或者有机酸、优选盐酸或者硫酸再次酸化至 pH 为大约 pH 4 到大约 pH 9，更优选为大约 pH 5 到大约 pH 9，最优选为大约 pH 6 到大约 pH 7.5。在调整了 pH 后，向溶液中加入氯化铵以盐析出帕伐他丁盐。如果使用的水量大约是 6ml g⁻¹，则建议使用每克帕伐他丁盐大约 2.0-2.3g 氯化铵。优选
10 用 4 到 6 小时分批加入氯化铵。

在加入氯化铵后，帕伐他丁铵盐可以自发结晶。否则，可以通过冷却、加入晶种或者其它常用规手段诱发重结晶。尽管重结晶优选通过加入共同离子如加入氯化铵来诱发进行，重结晶也可以通过用逆溶剂稀释来诱发进行，如前述重结晶步骤中优选的做法。然而，在该操作中，必须小心谨慎而不能无意中使帕伐他丁盐沉淀。如更详细地示于实施例 1 中的，RRT = 0.9 的有机杂质的量减少至低于检测限，且帕伐他丁铵盐达到了约 99.3% 的纯度，接近药用可接受的纯度水平。在本
20 发明方法的这一阶段，可以得到有机杂质少于约 0.7% (重量/重量) 的帕伐他丁铵盐。

经过重结晶去掉有机杂质后，该帕伐他丁盐经过盐形转换成为帕伐他丁钠。在此所使用的盐形转换是指有机盐分子的阳离子同另一阳离子相交换的任何方法。在盐形转换中，通过将所述盐溶解于含水溶剂中、向该水溶液中加入任何质子酸如盐酸、硫酸、磷酸、三氟醋酸或者醋酸、然后用有机溶剂将帕伐他丁从所述水溶液中萃取出来而首先将帕伐他丁从其金属盐或者铵盐中解离出来。质子酸以中和或者酸
30

化的量加入所述水溶液中，优选将其酸化至 pH 为大约 1 到大约 6，更优选为大约 2 到大约 4。在向水溶液中加入质子酸之前或者之后，将该水溶液与不能与水混溶的有机溶剂如乙酸异丁酯或者任何其它的不能与水混溶的有机溶剂相接触。在使所述水溶液与不能与水混溶的有机溶剂相接触且用质子酸处理后，所得含有帕伐他丁的有机相将从水相分离，在任选用水进行洗涤以除去铵残质后，用含水氢氧化钠对帕伐他丁进行反萃取。优选的 NaOH 用量相对于帕伐他丁量仅为适度摩尔过量，优选为小于其 1.1 当量，更优选为小于其 1.02 当量。

在萃取到含水氯化钠中之后，清除过量的钠阳离子，以获得 1:1 当量的钠阳离子和帕伐他丁。清除是通过使用水不溶性的离子交换树脂完成的。适宜的离子交换树脂是阳离子树脂和螯合型树脂，优选是强酸与弱酸交换树脂。

在强酸型阳离子交换树脂中，可用的是那些具有磺酸 ($\text{SO}_3^- \text{H}^+$) 基团的。这些包括商业制成品 Amberlite[®] IR-118、IR-120、252H；Amberlyst[®] 15、36；Amberjet[®] 1200 (H) (Rohm and Haas)；Dowex[®] 50WX 系列、Dowex[®] HCR-W2、Dowex[®] 650C、Dowex[®] Marathon C、Dowex[®] DR-2030 和 Dowex[®] HCR-S 离子交换树脂 (Dow 化学公司)；Diaion[®] SK 102 至 116 树脂系列 (三菱化学公司) 和 Lewatit SP 120 (拜耳)。优选的强酸性阳离子交换树脂是 Amberlite[®] 120、Dowex[®] 50WX 和 Diaion[®] SK 系列。

弱酸型阳离子交换树脂包括那些具有侧链羧酸基团的。弱酸型阳离子交换树脂包括的商业制成品为：Amberlite[®] CG-50、IRP-64、IRC 50 和 C67；Dowex[®] CCR 系列；Lewatit CNP 系列和 Diaion[®] WK 系列；其中最优选 Amberlite[®] IRC50、Lewatit[®] CNP 80 和 Diaion[®] WK 10。次优选螯合型交换树脂。一些可得的商品变种包括 Duolite[®] C-718 和 C-67 (Rohm & Haas)。

含有帕伐他丁钠盐和过量钠阳离子的溶液可与离子交换树脂相接触，所用方法是任何本领域所熟知的方法，包括使溶液通过树脂柱或树脂床，或者搅拌在烧瓶内的足够量的树脂和溶液。接触的方式不重要。在去除了过剩钠离子之后，虽然 pH 值会随稀释作用而变化，但帕伐他丁钠盐溶液的 pH 值应该在大约 6.5 到大约 10 的范围内，优选在大约 7.4 到大约 7.8 的范围内。帕伐他丁钠盐溶液从较高的 pH 值降低

帕伐他丁的纯化

通过加入硫酸而酸化发酵肉汤(100L)到 pH 大约 2.5 至大约 5.0。酸化的发酵肉汤用乙酸异丁酯(3 × 50L)萃取。乙酸异丁酯萃取产率使用 HPLC 肉汤内标对照法分析测得是 95%。HPLC 条件(反相)为:柱:C18, 5 粒径 5 μ m, 长度 150mm, 直径 4.6mm; 流动相: 45%甲醇/水, 0.1% Et3N, 0.1%冰醋酸; 流动速率 1.3ml min⁻¹; 柱温 25°C; 注射体积 10 μ l; 内标对羟基苯甲酸乙酯; 检测: UV λ =238nm。

然后, 复合乙酸异丁酯相通过加入浓氢氧化铵, 用水(35L)在大约 pH 7.5 到大约 pH 11.0 时萃取。然后所得帕伐他丁水溶液通过加入 5M 10 硫酸被再次酸化至 pH 为大约 2.0 到大约 4.0, 并用乙酸异丁酯(8L)进行反萃取。所得帕伐他丁在乙酸异丁酯中的溶液用珍珠岩(Perlite)和 Na₂SO₄ 进行部分干燥。倾析所述帕伐他丁溶液, 然后从干燥剂中过滤, 并用活性炭脱色(1.7g)。然后对溶液进行过滤, 除去炭, 并转移至配有气体入口的烧瓶中。

15 在 15-25°C 下伴随快速搅动, 将氨气导入溶液上部空间。在进一步的沉淀显示出终止的迹象时, 关闭氨气, 向混合物中加入氯化铵以易于过滤。沉淀的帕伐他丁羧酸铵盐结晶由过滤收集得到, 先后用乙酸异丁酯和丙酮洗涤, 得到大约 94%纯度的帕伐他丁铵盐, 该纯度由联用 λ =238nm UV 检测的 HPLC 测定。

20 帕伐他丁铵盐通过从饱和的氯化铵溶液中重结晶而进一步纯化, 操作如下。含有 162g 活性物质的帕伐他丁盐溶解于水(960ml)中, 且在大约 35-40°C 用丙酮(96ml)和乙酸异丁酯稀释(96ml)。然后将溶液冷却至大约 30-32°C, 加入固体 NH₄Cl 以诱发帕伐他丁铵结晶, 加至结晶无明显增加为止。在加入氯化铵之后, 将溶液冷却至大约 0-26°C。 25 帕伐他丁铵晶体经过滤收集后, 如前所述, 用乙酸异丁酯和丙酮洗涤, 然后在大约 40°C 下干燥。所得帕伐他丁铵盐晶体(155.5g)的纯度大约为 98%, 其由利用前述条件的 HPLC 测定。

通过如下的另一结晶作用使帕伐他丁铵盐进一步纯化。帕伐他丁铵盐(155.5g 活性物质)溶于水(900ml)中。加入异丁醇(2ml)之后, 通 30 过加入浓氢氧化钠溶液使 pH 值升高到大约 pH 10 到大约 pH 13.7 之间, 然后将溶液在常温下搅拌 75 分钟。加入硫酸使溶液中和至大约 pH 7, 然后加入固体 NH₄Cl 以诱导帕伐他丁铵结晶。晶体(150g)通过过滤

到较低的 pH 值并随后平稳在较低的 pH 值水平，这一现象是过量的 Na⁺ 离子基本除尽的征兆。当清除完成后，帕伐他丁钠盐溶液可从树脂上以常规方式脱离出来。它可从树脂柱或者树脂床以洗脱剂收集，也可用过滤、倾斜等方法分离出来。

- 5 帕伐他丁钠可从帕伐他丁钠溶液中通过结晶作用分离出来。有效的结晶首先需要部分去除水份，这可通过真空蒸馏或者毫微过滤 (nano-filtration) 进行。优选的是，帕伐他丁钠盐的水溶液在结晶前从 20 重量/体积%浓缩至 50 重量/体积%。如有需要，在浓缩后，帕伐他丁钠盐水溶液可用 H⁺ 形式的离子交换树脂调节到 pH 为大约 7 到大
10 约 10 之间。

向帕伐他丁钠溶液中加入水溶性有机溶剂或者有机溶剂混合物将有助于所述结晶作用。尤其可提到的是丙酮和丙酮/乙腈、乙醇/乙腈和乙醇/乙酸乙酯混合物。最优选用于结晶帕伐他丁钠的溶剂体系是 1/3/12 水/丙酮/乙腈混合物，其是通过浓缩帕伐他丁钠溶液至大约 30
15 重量/体积%然后加入合适体积的 1/4 丙酮/乙腈混合物而形成的。其它最优选的结晶溶剂混合物是水-丙酮 (1:15)。

帕伐他丁钠也可通过帕伐他丁钠水溶液的冷冻干燥而获得。

无论是通过结晶或者其它提高产品纯度的方法，实施本发明方法而分离出来的帕伐他丁钠基本上不含帕伐他丁内酯。正如以下实施例
20 中所证明的，分离出来的帕伐他丁钠所含总杂质量可少于 0.5% (重量/重量)。另外，按照本发明的优选实施方案，分离出的帕伐他丁钠的总杂质量为 0.2% (重量/重量) 或者更小，其中的两例在实施例 1 和实施例 15 中有所例证。总杂质中所含的主要杂质包括表帕伐他丁 (epipravastatin) 钠、3'-OH 密实菌素钠、6-羟基异密实菌素钠和帕
25 伐他丁内酯。

以下实施例在其某些具体实施方案中描述了本发明的实施过程。然而这些实施例不能看作是对本发明精神的限制。考虑到说明书和实
30 施例，其它实施方案对于本领域技术人员来说是显然的。这就意味着说明书，包括实施例，仅视为是示范性的，而本发明的范围和精神则在权利要求书中表明。

实施例

实施例 1

收集，然后用丙酮洗涤。帕伐他丁铵的纯度据测为约 99.3%，其通过使用前述条件下的 HPLC 检测测定。

帕伐他丁铵然后经盐形转换成钠盐，方法如下。帕伐他丁铵盐晶体溶解于水(1800ml)中。加入乙酸异丁酯(10.5L)。然后通过加入硫酸，将溶液酸化至 pH 在大约 2 到 4 之间，硫酸使帕伐他丁人回复到游离酸的形式。含帕伐他丁的乙酸异丁酯相用水(5 × 300ml)洗涤。随后帕伐他丁转化成为其钠盐，并通过在水(900-2700ml)上旋动乙酸异丁酯溶液，并同时间歇性地加入 8m NaOH 直至 pH 值达到大约 7.4 至大约 13 之间，而使其反萃取至另一水相中。

10 然后用离子交换树脂处理帕伐他丁钠盐溶液，去除过剩的钠阳离子。在分离之后，水相在常温下相对 H⁺形式的 Amberlite[®] IRC50 交换树脂搅拌 30 分钟。持续搅拌直至 pH 达到大约 7.4 到 7.8 之间。

15 然后过滤溶液以除去树脂，且将溶液在真空下部分浓缩至重量为 508g。接着溶液用乙腈(480ml)进行稀释，所用溶剂为 1.4:1 的乙腈:水溶剂混合剂。然后在活性炭(5g)上搅拌所述溶液，以进行脱色。当滤去活性炭之后，帕伐他丁钠通过产率为 90%的重结晶以晶体形式获得，重结晶是在进一步加入丙酮和乙腈以形成 1/3/12 的水/丙酮/乙腈的混合物(5.9L)并冷却至大约-10 至大约 0℃之后发生的。所得帕伐他丁钠盐从初始发酵的活性物质开始的总产率为 65%，纯度约为 99.3%，
20 这些数据通过前述条件下的 HPLC 测得。

实施例 2

按照实施例 1 的程序，但是省略从水/丙酮/乙腈的混合物重结晶过程，通过对浓缩的帕伐他丁钠的水溶液进行冷冻干燥，得到约 99% 纯度的帕伐他丁钠，其产率约为 72%。将本实施例的最终纯度与实施例
25 1 相比较，证明帕伐他丁钠的重结晶较之冷冻干燥产生更纯一些的产品。

实施例 3-6

同实施例 1 中的操作，帕伐他丁钠从发酵肉汤中分离出来的纯度和产率示于表 1 中，在转换盐形的操作中使用相应的溶剂。

30

表 1

实施例号	有机溶剂	产率 (%)	纯度 (%)
3	CH ₂ Cl ₂	63	96.6
4	乙酸乙酯	58	99.5
5	甲酸乙酯	51	99.6
6	丁基甲基酮	61	99.5

实施例 7

同实施例 1 的操作，但是通过重复一次帕伐他丁铵盐的结晶过程来进一步纯化帕伐他丁铵盐，得到的帕伐他丁钠纯度约为 99.6%，产率为 58.4%。

实施例 8

同实施例 1 的操作，但是通过重复两次帕伐他丁铵盐的结晶过程来进一步纯化帕伐他丁铵盐，得到的帕伐他丁钠纯度约为 99.8%，产率为 53%。

实施例 9

同实施例 1 的操作，加入硫酸使发酵肉汤 (100L) 被酸化至大约 pH 2.5 到大约 pH 5.0。酸化的发酵肉汤用乙酸异丁酯 (3 × 50L) 萃取。之后，结合的乙酸异丁酯相用水 (35L，已加入浓氢氧化铵使其碱化至大约 pH 7.5 到大约 pH 11.0) 进行萃取。

与实施例 1 中再次酸化含水萃取液且用乙酸异丁酯萃取以获得进一步富含 (帕伐他丁) 的有机溶液的做法不同，在此将含水萃取液在真空下浓缩至 140g/L。所得的浓缩溶液 pH 大约为 4.0 到大约 8。过量的氨通过蒸发除去。

氯化铵晶体 (405g) 缓慢地分批加入到浓缩溶液中，加入时间为四个小时，帕伐他丁铵盐即在常温下结晶出来。所得晶体然后通过过滤分离且用饱和氯化铵溶液洗涤。晶体在 40℃ 下加入水中 (1L)。其溶解后温度降到 30℃，然后氯化铵 (330g) 分批加入到溶液中，加入时间为两小时。之后将溶液在常温下搅拌 15 小时，帕伐他丁铵盐晶体通过过滤回收，并先后用乙酸异丁酯和丙酮进行洗涤，然后干燥。所得晶体随后通过转置钠盐的重结晶进一步提纯，再用实施例 1 所述方法分离。所得帕伐他丁钠的纯度约为 99.6%，产率为 64.7%。

实施例 10

同实施例 1 的操作，但是帕伐他丁钠盐从水/丙酮的 1/15 混合物中结晶出来，其从初始发酵的活性物质的总产率是 64%，纯度为 99.6%，如 HPLC 所测。

5

实施例 11

按照实施例 9 前两个段中的方法，得到浓缩含水萃取液 (140 g. L⁻¹)。浓缩含水萃取液被分成三等份。所得的浓缩溶液中然后加入 1M HCL 酸化至 pH 约 4.0 到 pH 约 8.0。按照实施例 9 第三段的方法，但是需要用表 2 中的盐代替氯化铵，从每一份中帕伐他丁盐沉淀出来且转

10 化成钠盐。

表 2

盐	纯度 (%)	产率 (%)
KCl	99.3	42
NaCl	99.4	38
LiCl	99.1	34