



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99814906.3

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1155579C

[22] 申请日 1999. 12. 20 [21] 申请号 99814906. 3

[30] 优先权

[32] 1998. 12. 23 [33] US [31] 60/113,933

[86] 国际申请 PCT/US1999/030379 1999. 12. 20

[87] 国际公布 WO2000/039098 英 2000. 7. 6

[85] 进入国家阶段日期 2001. 6. 22

[71] 专利权人 马克西姆药品公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 W · -L · 叶 C · 安特查克

J · D · 麦戈尔里克 M · J · 罗斯

M · 罗纳

审查员 康 蕾

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

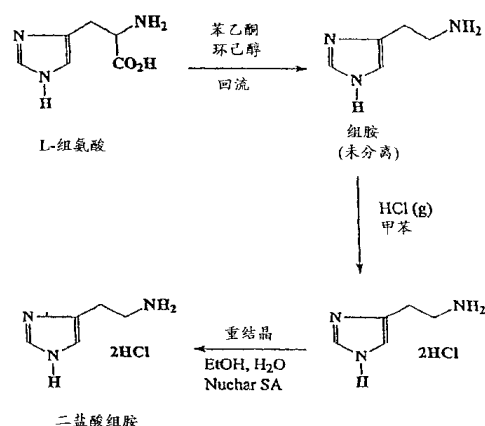
代理人 关立新 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 2 页

[54] 发明名称 二盐酸组胺的合成

[57] 摘要

本发明涉及利用两步非酶解合成法制备药物级二盐酸组胺的方法。本发明描述了通过组氨酸的非酶解脱羧反应并将该脱羧产物逐步转变成二盐酸盐形式,合成二盐酸组胺。本发明的二盐酸组胺最终产物被认为可用于制药,所述最终产物包含小于下列比例的成分:0.8% L-组氨酸 HCl 一水合物、0.1% 个别色谱杂质以及 2% 全部杂质。



1. 一种合成二盐酸组胺的方法，该方法包括：

利用富含电子的酮作为脱羧反应催化剂，将含 L-组胺酸的溶液进行脱羧反应，其中所述富含电子的酮选自苯乙酮、4'-溴苯乙酮、二
5 苯甲酮、对-硝基苯乙酮、对-甲基苯乙酮、对-甲氧基苯乙酮和 1-甲
基-4-哌啶酮；

利用二氯甲烷研磨含组胺碱的溶液，沉淀出产物；

利用有效量的氢氯酸/异丙醇处理产物，加或不加助溶剂沉淀出
一盐酸组胺盐粗品；

10 利用溶剂重结晶，纯化一盐酸组胺盐粗品；以及

利用氢氯酸/异丙醇处理一盐酸组胺盐粗品，加或不加助溶剂生
成二盐酸组胺。

2. 根据权利要求 1 的方法，包括在利用有效量的氢氯酸/异丙
醇处理产物而沉淀出一盐酸组胺盐粗品时加入助溶剂，助溶剂是二氯
15 甲烷、环己醇、甲苯和叔丁基甲醚。

3. 根据权利要求 1 的方法，包括在利用氢氯酸/异丙醇处理一
盐酸组胺盐粗品而生成二盐酸组胺时加入助溶剂，助溶剂是二氯甲
烷、环己醇、甲苯和叔丁基甲醚。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中所述二盐酸组胺盐被重结晶，
20 生成药物级二盐酸组胺。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中氢氯酸的有效量为相当于组胺
碱 0.1 至 0.9 摩尔比氢氯酸。

6. 根据权利要求 1 的方法，其中氢氯酸的有效量为相当于组胺
碱 0.6 摩尔比氢氯酸。

25 7. 根据权利要求 1 的方法，其中用于重结晶的溶剂选自：二氯
甲烷、2-丙醇、乙醇、甲醇/丙酮、水、甲醇/乙酸乙酯、水/丙酮、
甲醇/乙醇、水/甲醇、甲醇/己烷、水/甲醇/丙酮、甲醇/二氯甲烷、
2-丙醇/乙醇、甲醇/2-丙醇、丙酮/2-丙醇和丙酮/乙醇。

8. 一种合成药物级纯度形式的二盐酸组胺的方法，该方法包
30 括：

使用富含电子的酮作为脱羧反应催化剂，将含 L-组胺酸的溶液进
行脱羧反应，其中所述富含电子的酮选自苯乙酮、4'-溴苯乙酮、二

苯甲酮、对-硝基苯乙酮、对-甲基苯乙酮、对-甲氧基苯乙酮和 1-甲基-4-哌啶酮;

利用二氯甲烷研磨含组胺碱的溶液, 沉淀出产物;

5 利用有效量的氢氯酸/异丙醇处理产物, 加或不加助溶剂沉淀出一盐酸组胺盐粗品; 以及或者

利用溶剂重结晶, 纯化一盐酸组胺盐粗品; 或

利用氢氯酸/异丙醇处理一盐酸组胺盐粗品, 加或不加助溶剂生成二盐酸组胺; 以及

10 利用溶剂重结晶二盐酸组胺, 得到药物级纯度形式的二盐酸组胺。

9. 根据权利要求 8 的方法, 包括在利用有效量的氢氯酸/异丙醇处理产物而沉淀出一盐酸组胺盐粗品时加入助溶剂, 助溶剂是二氯甲烷、环己醇、甲苯和叔丁基甲醚。

15 10. 根据权利要求 8 的方法, 包括在利用氢氯酸/异丙醇处理一盐酸组胺盐粗品而生成二盐酸组胺时加入助溶剂, 助溶剂是二氯甲烷、环己醇、甲苯和叔丁基甲醚。

11. 根据权利要求 8 的方法, 其中所述二盐酸组胺包含等于或小于下列各成分: 0.8% L-组氨酸 HCl 一水合物、0.1%个别色谱杂质以及 2%全部杂质。

20 12. 根据权利要求 8 的方法, 其中氢氯酸的有效量为相当于组胺碱 0.1 至 0.9 摩尔比氢氯酸。

13. 根据权利要求 8 的方法, 其中氢氯酸的有效量为相当于组胺碱 0.6 摩尔比氢氯酸。

25 14. 根据权利要求 8 的方法, 其中用于重结晶的溶剂选自: 二氯甲烷、2-丙醇、乙醇、甲醇/丙酮、水、甲醇/乙酸乙酯、水/丙酮、甲醇/乙醇、水/甲醇、甲醇/己烷、水/甲醇/丙酮、甲醇/二氯甲烷、2-丙醇/乙醇、甲醇/2-丙醇、丙酮/2-丙醇和丙酮/乙醇。

二盐酸组胺的合成

技术领域

5 本发明涉及组胺。

背景技术

组胺是一类具有重要生物学活性的化合物，所述生物学活性由药理学受体传递。长期以来，人们一直认为组胺是一种主要具有负生物学效应的分子。但是，最近人们发现组胺具有新的用途，它是有效的
10 药剂。例如，在存在单细胞的条件下，组胺已经与 α -干扰素联合用于激活 NK 细胞。参见美国专利 5,728,378。考虑到组胺治疗性能的全部优点，有必要得到大量药物级这种化合物。

组胺是作为腐烂过程得到的结果而广泛地存在于自然界中，其衍生物组胺二盐酸盐可商业销售，用作测定中的标准，以及用作某些过敏症
15 诊断药盒中的成分。这种组胺常源于天然来源，因而含有大量的杂质，不能适用于制药。在现有技术中也有合成二盐酸组胺的合成规程。

利用组氨酸的脱羧反应，可以方便地合成二盐酸组胺。采用这种合成路线，组氨酸被脱去羧基，接着再处理成二盐酸盐形式的分子。例如，Hashimoto 等人讨论了利用环己酮作为组氨酸脱羧反应的催化
20 剂制备组胺的情况(Hashimoto,M.,et al.,Chemistry Letters,893-896 (1986))。Hashimoto 等人的论文报道，利用 2-环己烯-1-酮作为催化剂，从包含组氨酸和 10 份 1% v/v 2-环己烯-1-酮在回流环己醇(26 小时)中的反应物中分离二盐酸组胺，收率为 95%。Hashimoto 方法还指导使用甲苯并向所得脱羧溶液中吹入 HCl，从而沉淀并收集
25 最终的二盐酸组胺产物。

重复 Hashimoto 的生产步骤而生成药用纯组胺的努力失败。为了进行所述步骤的操作，需要加入更多量的催化剂，最终产物中存在大量的杂质，而且这些杂质难以除去。考虑到这些结果，人们发现 Hashimoto 方法不能适应于生产大量可药用组胺。

30 将苯乙酮用作组胺脱羧反应的催化剂也已有报道。参见 DD 56 793A。我们重复 Akimasa 等人的日本专利(日本专利 No. 05,255,204 (1983))中描述的方法，使用 0.26 摩尔苯乙酮和 10 份二甘醇作为脱羧反应的溶

剂。尽管 Akimasa 等人的方法在将组氨酸转变成组胺方面非常有效，但却不能一贯地得到药物级产物。与利用 Hashimoto 方法得到的最终产物一样，利用 Akimasa 方法制得的最终产物在进行 HPLC 分析时可以观察到杂质。

5 尽管利用苯乙酮和二甘醇条件的方法看上去有希望，但是存在着与后处理有关的问题。组胺游离碱和二盐酸盐二者均易溶于水，所以很难利用任何提取技术从二甘醇溶剂中分离产物，这种分离通常通过水提取分离。另外，二盐酸组胺也易溶于二甘醇，因此通过过滤直接进行分离也是不可能的。

10 我们也重复了 Takano 等人的反应条件，所述反应条件包括戊-3-酮 (Heterocycles, 6:1167 (1977))。也可参见 GB 1008594A，该文献在合成过程中使用了 2,4-二羟基苯甲酮。实验结果表明比上文描述的苯乙酮条件没有任何改进。

15 特别是在考虑到新发现的组胺药物应用时，固定来源的药物级组胺是需要的。在对天然来源的组胺进行纯化的技术中使用的标准方法不能获得用于药物用途的足够高的等级。再者，在现有技术中使用的合成方法也不能得到足够高等级的组胺。由此有必要在该领域中改进生产药物级二盐酸组胺的方法。

发明内容

20 本发明涉及利用两步非酶解合成法制备药物级二盐酸组胺的方法。本发明的一个实施方案是合成二盐酸组胺方法，该方法包括：对含 L-组氨酸的溶液进行脱羧反应，其中含组胺的溶液是在不存在脱羧酶的条件下形成的；由含组胺的溶液生成含一盐酸组胺的溶液；以及由含一盐酸组胺的溶液生成含二盐酸组胺的溶液。

25 该实施方案的一个方面进一步包括研磨含组胺的溶液，例如含组胺的溶液可由二氯甲烷溶液研磨。在该实施方案的另一方面，含一盐酸组胺的溶液可通过在异丙醇溶液中添加有效量的氢氯酸生成。例如，相对于组胺游离碱，氢氯酸的有效量为约 0.1 至 0.9 摩尔比氢氯酸。在另一实施例，相对于组胺游离碱，氢氯酸的有效量为约 0.6
30 摩尔比酸。该实施方案的再一方面进一步包括从含二盐酸组胺的溶液中分离药物级二盐酸组胺的步骤。

这里公开的本发明另一实施方案为合成药物级二盐酸组胺的方

法，该方法包括：对含 L-组氨酸的溶液进行脱羧反应，其中含组氨酸的溶液是在不存在脱羧酶的条件下生成的；由含组氨酸的溶液形成含一盐酸组氨酸的溶液；由含一盐酸组氨酸的溶液形成含二盐酸组氨酸的溶液；以及从含二盐酸组氨酸的溶液中分离二盐酸组氨酸。

- 5 在该实施方案的一个方面，二盐酸组氨酸包含等于或小于下列比例的成分：0.8% L-组氨酸 HCl 一水合物，0.1% 个别色谱杂质以及 2% 全部杂质。

附图简述

图 1 表示现有技术中的反应方法。

- 10 图 2 表示实施例 5 和 6 中公开的本发明方法。

具体实施方式

- 本发明涉及利用两步非酶解合成法制备药物级二盐酸组氨酸的方法。本发明描述了通过组氨酸的非酶解脱羧反应并将该脱羧产物逐步转变成二盐酸盐形式，合成二盐酸组氨酸。本发明的二盐酸组氨酸最终产
- 15 物被认为可用于制药，所述最终产物包含小于下列比例的成分：0.8% L-组氨酸 HCl 一水合物、0.1% 色谱杂质（定义如下）以及 2% 全部杂质。

- 现有技术中公知的合成二盐酸组氨酸的方法不能获得用作药物化合物所需的足够纯度。图 1 表示现有技术的脱羧反应方法。本发明方法的步骤表示在图 2 中。
- 20 现有技术中的方法被用于由 L-组氨酸起始原料生成二盐酸组氨酸，试图得到药物级合成二盐酸组氨酸。起始原料与现有技术中的催化剂 α -四氢萘酮和环己烷反应。反应完成后，冷却试样，向溶液中引入氢氯酸，将组氨酸游离碱转变成二盐酸盐形式。过滤、洗涤并干燥形成的

- 25 沉淀。结果发现由现有技术生产的产物含有不能接受的大量杂质。

- 由现有技术方法生产的粗产物的纯度为 92-94%，其中一种主要杂质为 3-5%，其余五到八种杂质 $\geq 0.1\%$ 。进行另外的纯化步骤或重结晶，并能够基本有效地去除大多数这些杂质。尽管如此，仍有两种不明杂质保持在 0.1% 以上的水平。这些杂质在二盐酸组氨酸产物之后洗脱，被称为色谱杂质或污染物。由此可见，根据这种方法制备的产
- 30 物不能适应于药物用途。

考虑到这些结果，需要设计一种新的用于合成所需纯度的二盐酸

组胺的方法。这一新方法包括将L-组氨酸(α -氨基-4(或5)-咪唑丙酸($C_6H_9N_3O_2$))脱羧,生成组胺。在脱羧反应之后,利用二氯甲烷研磨含组胺游离碱的溶液,沉淀出产物。然后过滤并洗涤产物。接着利用于异丙醇中的氢氯酸处理过滤得到的产物,沉淀出一盐酸组胺粗品。过滤并分离该产物。接着通过重结晶方法纯化粗盐,或者可以进行本发明的最终改性步骤。下一步,再利用氢氯酸/异丙醇溶液处理一盐酸盐,生成二盐酸组胺形式的分子。然后将最终形式的产物脱色并洗涤。这些公知为重结晶的步骤可以广泛地重复进行,生产药物纯度的二盐酸组胺。所有步骤在氮气气氛下进行。通过包括HPLC分析的许多分析方法分析最终产物的纯度。

为了促进脱羧反应,本发明有意使用大量催化剂或自由基引发剂。适当的催化剂是这样的催化剂:当前体化合物处于中性溶剂中并加热数小时得到纯度可接受的最终产物时,所述催化剂能够有效地促进组氨酸的脱羧反应。由于能够减少最终产物中的大量杂质,所以优选富电子的酮类化合物。例如适宜的一组催化剂包括:过氧化苯甲酰、2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)、2-环己烯-1-酮、苯乙酮、4'-溴苯乙酮、二苯甲酮、对-硝基苯乙酮、对-甲基苯乙酮、对-甲氧基苯乙酮、对-甲基苯乙酮/1-甲基-4-哌啶酮和对-甲基苯乙酮/AcOH。

脱羧反应的条件促进了起始原料的脱羧作用,同时减少了不需要的污染物的形成。反应条件包括在存在惰性气体(如氮气)下进行几个方法步骤。反应条件进一步包括在大约145至170℃温度下进行脱羧步骤。反应优选地在大约150至165℃温度下进行,或者优选大约160至165℃的温度。

大量溶剂可适用于本发明。其中进行某些反应步骤的溶剂可能会影响需要催化组氨酸脱羧反应的反应时间。可适用于本发明的溶剂包括:环己醇、n-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甘醇、二甘醇甲基醚、2-甲氧基乙基醚、1-丁醇、甲氧基乙醇、环己醇/NMP(比例为3:1)、二甲基甲酰胺及四氢噻吩砜。

这里公开的反应的另一个参数是通过利用氯化氢处理反应混合物生产盐形式的组胺的方法。结果发现最终产物的杂质含量受到在沉淀一盐酸盐的粗盐过程中加入的酸摩尔比的影响。通过制备于异丙醇中的已知浓度的氯化氢溶液并用其处理反应混合物,可以控制杂质形成

的程度。

可以使用有效范围摩尔比氯化氢 (HCl) / 异丙醇 (ISA) 来实现本发明方法。大约 0.01 至 2 摩尔比可用于制备盐形式的组胺, 另外也可使用大约 0.05 至 1.4 摩尔比。在另外一种选择中, 可以使用大约 0.1 至 0.9 摩尔比。在再一个选择中, 可以使用大约 0.5 摩尔比。为进行本发明所选择的比例应当能够最大限度地生成具有可接受水平杂质含量的最终产物, 从而使得所得最终产物可以用作药物组合物。

用于生成盐形式的酸性溶液的浓度没有限制。例如 HCl 在 ISA 中的浓度范围可以是大约 6 至 9 摩尔。但是, 为了分离出药用级最终产物, 所加入的酸的摩尔数是至关重要的。加入过多的酸可导致大量杂质与一盐酸盐一起沉淀, 它们在接着的生成二盐酸组胺的过程中很难被除去。生成盐与生成污染物的方法之间的关系在现有技术中没有评价过。

为了实现一盐酸盐形式分子的沉淀 (盐沉淀), 在加入于异丙醇中的 HCl 时可使用各种助溶剂。可用于本发明的助溶剂包括: 二氯甲烷、环己醇、甲苯和叔丁基甲基醚 (TBME)。

最终产物的最后纯度特别关注, 也可使用另外的纯化方法步骤。例如, 重结晶是一种为了纯化物质而重复结晶的方法。在纯化方法中可使用许多溶剂, 这些溶剂包括: 二氯甲烷、2-丙醇、甲醇、乙醇 (ETOH)、甲醇/丙酮、水、甲醇/乙酸乙酯、水/丙酮、甲醇/乙醇、水/甲醇、甲醇/己烷、水/甲醇/丙酮、甲醇/二氯甲烷、2-丙醇/乙醇、甲醇/2-丙醇、丙酮/2-丙醇、丙酮/乙醇。从毒性学的观点, 非毒性溶剂如 ETOH 优选。

我们可以观察到在合成路线中获得的各种溶液具有颜色。可在重结晶之前或之时加入活性炭, 以除去颜色。

为了有助于二盐酸组胺的纯化, 本发明可进一步考虑使用衍生化学反应。由此可以注意到, 为了促进那些杂质的分离, 在本发明生产二盐酸组胺的过程中, 必须生成各种杂质的化学衍生物。生成这类衍生物的方法包括向所感兴趣的分子中引入叔丁氧基羰基基团, 也可使用其它改性基团, 如苄氧基羰基基团 (CBZ)。

下列实施例讨论了进行组氨酸脱羧反应及分离组胺产物的方法, 也讨论了利用多级重结晶步骤纯化粗制二盐酸组胺产物的方法。还讨论了活性炭脱色方法。

各种方法步骤的效力以及最终产物的纯度可利用下述方法进行分析。一种或多种检测步骤可用于测定脱羧反应步骤的效力。另外，现有技术中公知的各种测定方法可用来分析最终产物的纯度。在各种反应产物中，这种检测步骤的实例可通过薄层色谱法（TLC）进行，这是一种现有技术公知的方法。例如，可利用 TLC（流动相： $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}$ ；7.5:2.0:0.5；以及水合茚三酮喷雾显示）检测反应。这种检测步骤可在脱羧反应之后任何时间进行。

下文详细讨论了本发明的特定实施例。下列实施例仅仅是为了说明的目的，并非用来限制本发明的权利要求。对于本领域技术人员来说，许多可供选择的技术或工艺能够类似地允许技术人员成功地完成本发明。

实施例

制备二盐酸组胺

下列实施例讨论了由前体化合物 L-组氨酸合成二盐酸组胺的方法。现有的组胺合成方法尽管能够得到二盐酸组胺，却受到只能生产含有杂质的最终产物的限制。下列实施例讨论了二盐酸组胺合成的各种改进方案，教导了可药用级二盐酸组胺的制备。

实施例 1

500g 二盐酸组胺粗品的制备

下文描述了 500g 二盐酸组胺样品的合成方法。

向安装有温度计、机械搅拌器、冷凝器和氮气进气口的十二升（12-L）4 颈圆底烧瓶中装入 7.5L 环己醇（溶剂）、750g L-组氨酸（底物）和 113ml 苯乙酮（催化剂）。悬浮液在氮气气氛下搅拌，在整个反应期间均保持在氮气气氛下。

回流加热悬浮液，保持在 150-165℃ 温度下至少 40 小时。取出少量样品进行过程中的测定，测量组氨酸的脱羧程度。冷却悬浮液至 80℃ 以下，加入 1875ml 甲苯。混合物进一步冷却至室温。通过 Buchner 漏斗，将混合物过滤至一新的 12-L 四颈圆底烧瓶中。

含有滤液的新烧瓶安装有温度计、机械搅拌器、氯化氢收集器和真空阱，准备用于加入气体氯化氢。在搅拌的同时，将溶液冷却至 10℃ 以下。将其保持在 20℃ 以下，加入至少 441g（2.5 摩尔）气体氯化氢。在氯化氢加料完成后，在室温下搅拌深黄色粘稠悬浮液 1 小时。

再通过 Buchner 漏斗过滤悬浮液。利用 375ml 环己醇和 375ml 甲苯漂洗滤饼，接着再利用两份 750ml 甲苯洗涤和两份 750ml 己烷漂洗。滤饼在抽吸过滤器上干燥至少 30 分钟。滤饼含有大量的环己醇，该环己醇通过研磨去除。

- 5 将湿滤饼装入安装有机械搅拌器和氮气进气管的 12-L 四颈圆底烧瓶中。加入 7.5L (体积) 乙醇 (ETOH)。在室温下搅拌悬浮液 4 小时。通过 Buchner 漏斗过滤悬浮液，滤饼利用 400ml 己烷漂洗。滤饼在 60-65℃ 真空箱中干燥过夜。该方法生产出 504g 二盐酸组胺粗品 (收率为 56.6%)，利用高效液相色谱法 (HPLC) 测得的纯度为 94.4
10 % a/a。将该产物进行重结晶，提高最终产物的纯度。

向安装有温度计、机械搅拌器、冷凝器、加料漏斗和氮气进气管的 12-L 四颈圆底烧瓶中装入 503g 上文合成的二盐酸组胺粗产物。另外，向反应烧瓶中加入 4.5L ETOH 和 200ml 水，溶解滤饼。在氮气气氛下搅拌悬浮液。

- 15 将该悬浮液加热至回流，并保持在回流下，向该悬浮液中滴加水，直至大部分固体溶解。冷却溶液至 75℃ 以下。向溶液中加入 50g NUCHAR SA (Westvaco, New York, NY) 和 50g CELITE (J.T. Baker, Hayward, CA)。将该悬浮液加热至回流并保持在该温度下 0.5 小时。冷却悬浮液至 65-75℃，然后通过 CELITE 床过滤直至洁净，干燥 12-L 四颈圆底烧瓶。利用 450ml ETOH 和 50ml 水的混合物漂洗滤饼。
20

在搅拌过夜的同时，将过滤的溶液慢慢地冷却至室温。溶液进一步冷却至 0-5℃ 保持 2 小时。在 0-5℃ 下，通过 Buchner 漏斗过滤悬浮液。利用冷却至 0-5℃ 的 200ml ETOH 洗涤滤饼三次。滤饼在 60-65℃ 真空箱中干燥。

- 25 在重结晶之后，最终产物为 299g (收率为 59.4%)，HPLC 测定纯度为 99.1% a/a。HPLC 方法在下文实施例 7 中讨论。为了提高最终产物的纯度，可进行另一轮重结晶。但是在重结晶之后，两种未知的杂质 (RRt 1.3, 1.5) 仍然存在，含量高于 0.1%。

- 典型地，第一种杂质 (RRt 1.3) 为 0.2-0.4% a/a，第二种杂质
30 (RRt 1.5) 为 0.5-0.6%。上述样品经第二次重结晶后杂质含量分别降至 0.1-0.2% 和 0.4-0.5%。当样品在许多天之后再进行分析时，杂质含量似乎增加，这表明涉及最终产物的稳定性。产物的不稳定性

可以解释为什么上述湿滤饼的 HPLC 纯度为 99.9 % a/a, 而在产物干燥后纯度仅为 99.1 %。利用二氯甲烷接着进行处理或活性碳处理不能去除杂质。

实施例 2

5 用于 L-组氨酸脱羧反应的催化剂

考虑到上述讨论的结果, 我们对合成方法进行了许多改进。这些改进的目的在于将未知杂质的水平降低至能够接受的水平。检验的一个变量涉及用于脱羧反应的催化剂的性质。我们检验了许多其它催化剂, 包括苯乙酮, 从而确定其在生成色谱杂质中的作用 (如果有的话)。

10 表 1 表示用于该研究中的催化剂。催化剂的用量为 0.3 摩尔。

表 1 脱羧反应催化剂的测定

催 化 剂	反应时间 (小时)	HPLC 纯度 (% a/a)	
		杂 质 #1	杂 质 #2
苯乙酮 (对照)	21	4.5	4.0
4' - 溴苯乙酮	21	7.0	3.4
二苯甲酮	21	14.5	2.9
对-硝基苯乙酮	17	分解	分解
对-甲基苯乙酮	16	1.65	0.71
对-甲氧基苯乙酮	16	1.9	2.9
对-甲基苯乙酮/1- 甲基-4-哌啶酮	7.5	3.0	2.4
对-甲基苯乙酮/AcOH	7.5	9.6	3.5

15 表 1 的结果表明, 在减少最终产物中的杂质含量方面, 对-甲基苯乙酮优于苯乙酮。相反地, 当对-甲基苯乙酮与碱 (1-甲基-4-哌啶酮) 结合使用时, 所产生的杂质水平没有提高, 而当与酸 (乙酸) 结合使用时, 最终产物中的杂质水平显著提高。另外, 对于生成污染物, 对-甲氧基苯乙酮较苯乙酮提供了优点, 但在分离一盐酸盐时,

20 没有比对-甲基苯乙酮产生显著的增强。数据表明带有缺电子的酮的催化剂在最终产物中所产生的杂质方面显示出增加, 而富电子的酮在

产生杂质方面下降。基于这些结果，利用对一甲基苯乙酮替代苯乙酮作为本发明脱羧反应中的催化剂。

实施例 3

生产组胺盐形式的方法

5 涉及到生成可接受的纯二盐酸组胺，所要探讨的另一参数包括在粗盐沉淀过程加入的酸的摩尔比。本发明惊奇地发现，最终产物中污染物量的降低与用于生成盐形式分子所需的酸的量有关。在现有方法步骤中，2.5 摩尔比的氯化氢 (HCl) 气体被加入到含脱羧组氨酸 (组胺游离碱) 中，生成粗制二盐酸盐。本发明检验了通过加入溶解在异丙醇 (IPA) 中的酸，向组胺游离碱中加入大量摩尔比氢氯酸的作用。

不同量的 HCl 溶解在 IPA 中，测试其对生成杂质的作用。根据上文描述完成合成方法，只是使用 0.3 摩尔对一甲基苯乙酮以及供加入 HCl 用的助溶剂甲苯。利用下文实施例 7 所述的 HPLC 方法测定杂质的存在。酸浓度范围的结果列于下列表 2。

表 2 HCl 摩尔及其对生成杂质的影响

HCl/IPA 摩尔	HPLC 纯度 (% a/a)		
	杂 质 #1	杂 质 #2	浓缩产物
2 (对照)	2.5	2.35	22.0
1.4	2.0	2.1	6.5
0.9	0.55	1.15	2.1
0.5	0.06	0.83	0.45

20 表 2 的结果表明，加入到含组胺游离碱的溶液中的酸的量如何显著地改变最终产物中存在的两种杂质的含量。所观察到的下降似乎可归因于具有与组胺游离碱相比少量的碱性特征的杂质。因此，组胺游离碱较之杂质首先经历质子化作用。

25 为了限制产物中的杂质的含量，使用 0.5 摩尔比 HCl 可以获得最佳的结果。在这些条件下，经过氯含量的滴定而确定，分离的粗产物为一盐酸盐，由此，为了合成可接受高纯度的一盐酸组胺形式，可应用涉及有意生成一盐酸盐的中间纯化步骤。然而，在使用该方法时，为

了生成二盐酸盐分子形式，有必要在后一合成步骤中加入另外摩尔的 HCl。

为了测试酸浓度小量变化对产物纯度和收率的影响，还进行了另外的实验。这些实验的结果如表 3 所示。这些结果取自由 100ml 反应混合物与 0.3 摩尔对一甲基苯乙酮和 CH₂Cl₂（作为助溶剂）生成的产物。CH₂Cl₂ 的选择详细讨论在实施例 4 中。

表 3 酸摩尔少量改变及其对产物生成的影响

粗 盐				最终产物		
HCl (摩尔)	收率 (%)	HPLC 纯度 (% a/a)		收率 (%)	HPLC 纯度 (% a/a)	
		杂质	杂质		杂质	杂质
		#1	#2		#1	#2
0.57	43.3	0.05	0.14	57.7	0.03	0.07
0.67	50.6	0.06	0.17	61	0.05	0.10
0.76	53.5	0.09	0.20	59	0.05	0.1

为了测定酸量的相对少量变化对粗盐杂质含量的影响，等价视窗很窄。表 3 的数据支持了先前观测结果，即加入的酸量减少导致最终产物中的杂质下降，也导致收率的下降。在以后的实验中，使用了相对于起始原料 0.6 摩尔比 HCl。正如测定试验所确定，对于大量使用更大量起始原料的产物，需要的酸量为每摩尔游离碱 0.85 摩尔比 HCl。这种计算的 HCl 量表示相对于 L-组氨酸起始原料大约 0.6 摩尔比。

实施例 4
在生成盐过程中使用的助溶剂

改进二盐酸组胺合成的下一个测试变量涉及该方法加酸步骤中所使用的助溶剂。先前将甲苯用作助溶剂。为了探索助溶剂对最终产物可能产生的作用，在沉淀步骤中使用了各种不同溶剂。如上所述，利用实施例 7 中描述的 HPLC 方法测定所得样品的纯度。结果示于表 4。

表 4 二氯甲烷及其它助溶剂对最终产物纯度的影响

助溶剂	收率 (%)	HPLC 纯度 (% a/a)	
		杂质 #1	杂质 #2
甲苯 (对照)	49.5	0.13	0.31
CH ₂ Cl ₂	45.9	0.10	0.15
TBME	51.9	0.33	0.51
无	43.5	0.12	0.18

得到表 4 结果的反应条件是使用 0.3 摩尔对一甲基苯乙酮、0.6 摩尔 HCl/IPA 和 5 体积用于沉淀的助溶剂。表 4 的结果表明, 对于形成杂质, 比其它助溶剂相比, 二氯甲烷能够提供较优的结果。

实施例 5

制备一盐酸组胺粗品

下文描述的方法给出了一盐酸组胺的制备。向安装有温度计、机械搅拌器、冷凝器和氮气清洗系统的二升 (2-L) 3-颈圆底烧瓶 (反应器) 中装入 1L 环己醇、100 克 L-组氨酸和 25.9ml 对一甲基苯乙酮。环己醇的熔点为 6.47℃, 为了产生能够装入反应器的液体, 可能需要加热。悬浮液为白色, 温度为 20-25℃, 体积为 1050ml。在存在氮气的气氛下搅拌悬浮液并在整个反应中均维持搅拌状态。

回流 (160-165℃) 加热悬浮液, 在回流下保持 30 小时。取出少量样品测定起始原料脱羧百分数。悬浮液必须含有 ≤1% a/a L-组氨酸。在不完全反应的情形下, 在回流下再继续加热悬浮液 3-5 小时, 然后再取样品。清亮均质溶液的生成表明起始原料耗尽、脱羧反应完成。

反应一旦完成, 将悬浮液冷却至 20-25℃。然后向反应器中装入 300ml 二氯甲烷, 将该混合物在冷却至室温。通过 Buchner 漏斗, 将混合物过滤至另一 2-L 3-颈圆底烧瓶中。然后利用 100ml 二氯甲烷洗涤第一反应器两次, 该二氯甲烷再用来漂洗过滤器。此过滤步骤可除去任何残留的 L-组氨酸。

将含有滤液的第二反应器安装温度计、机械搅拌器、加料漏斗和

氮气清洗系统。在洗涤步骤之后并在反应器中重新建立氮气气氛之后，将滤液加热至 30-35℃。取出等试样溶液，测定组胺游离碱的含量。测定结果用于计算用于生成一盐酸盐所需的酸量。所需的酸量为每摩尔组胺游离碱 0.85 摩尔比 HCl。

5 在剧烈搅拌的同时，滴加 50.5ml 7.65M HCl 异丙醇（HCl/ISA）溶液，滴加速度以溶液温度不超过 40℃为准。已知该方法步骤具有放热特性，HCl/ISA 溶液的加料应在 1 小时内完成。得到的浅褐色悬浮液允许在 1 小时内冷却至 20-25℃，至少搅拌 2 小时。通过向 100ml 冷却至 5-10℃的异丙醇中通入 27.9g HCl 气体，制备 7.65M HCl 的异
10 丙醇溶液。

 在氮气气流下，通过Buchner漏斗过滤冷却的悬浮液，滤饼用 100ml 1:1 二氯甲烷/环己醇溶液漂洗三次。然后利用 100ml 二氯甲烷洗涤滤饼三次。由于一盐酸盐易溶于水，实验室的湿度可能对产物的收率具有影响。因此，通过在氮气气流下进行操作，将过滤步骤中滤饼暴露
15 在水分中的可能性降低至最小。

 然后将湿滤饼装入到安装有温度计、机械搅拌器和用于二氯甲烷研磨的氮气清洗系统的 1L 3-颈圆底烧瓶中。将固体悬浮在 500ml 二氯甲烷中，在氮气气氛下搅拌 1 小时。正如下文描述的接续步骤中所述，二氯甲烷研磨有助于残留环己烷的分离，能够使得产物更有效地干燥，
20 干燥。

 在氮气气流下过滤悬浮液，利用 75ml 二氯甲烷洗涤固体物料。滤饼在 55-60℃真空箱中干燥 16 小时。

 下述表 5 表示该实施例描述的方法的结果。该方法进行三次，将每次产物的收率进行比较。

25

表 5 一盐酸组胺的粗收率

	实验 1	实验 2**	实验 3**
干燥固体的重量*	50.28	52.29	50.28
粗收率（%）	52.9	55.0	52.9

* 固体的重量及对应的百分数收率已校正过溶剂的含量。

** 在实验 2 和 3 中，滤饼干燥 8 小时，而不是 16 小时。

实施例 6

通过 L-组氨酸的脱羧反应制备二盐酸组胺

5 实施例 6 说明由实施例 5 的方法制得的一盐酸盐前体合成二盐酸组胺的步骤。

将安装有机机械搅拌棒、加料漏斗、冷凝器、氮气清洗系统和温度计的 1 升 (1L) 三颈圆底烧瓶放置在加热套中。向反应器中加入 40g 组氨一盐酸盐、32ml H_2O (蒸馏) 和 280ml 1×含 99.5% EtOH 和 0.5
10 % 甲苯的 EtOH 溶液。由于一盐酸组胺极易吸湿，所以在整个反应过程中保持氮气气氛。

该方法的下一步骤包括加入 HCl/ISA 溶液，以使一盐酸组胺转变成二盐酸盐。向反应器中加入 41.5ml 6.85M HCl/ISA 溶液 (1.05 摩尔)。正如上文讨论，加入酸溶液是放热的，因此可在 15 分钟时间内
15 加入酸。在加酸的起始阶段，生成清亮溶液，但在加入大约 75% 酸后，该溶液迅速变成深灰色悬浮液。

在酸加料完成后，将所得灰白色悬浮液在油浴中回流 (78-80°C) 加热。悬浮液中的固体物质渐渐地溶解，生成琥珀色溶液。固体物质一旦全部溶解，将反应器从油浴中移出。然后向反应器中装入 NUCHAR
20 SA 木炭 (2g) 和 CELITE (2g)，回流加热该悬浮液 25 分钟。由于产物在大约 60°C 时会沉淀，所以保持温度很重要。将热的黑色悬浮液通过 CELITE 床过滤到安装有机机械搅拌器和温度计的新的 1L 三颈圆底烧瓶中。CELITE 床被用作隔板，以预防木炭流过过滤单元。该新的反应器已经在油浴中预热过，且反应器的加料也均在油浴中进行。

25 在 60-65°C 温度下，利用 40ml EtOH 1×溶液漂洗含反应混合物的第一反应器两次。过滤该溶液并加热到上述得到的滤液中。加入漂洗溶液可在滤液中产生一些沉淀。然后在 60-65°C 下，通过搅拌器搅拌全部体积的溶液 30 分钟。

悬浮液 (二盐酸组胺) 在 1 小时内慢慢地冷却至 25°C，在 20-25
30 °C 下搅拌 2 小时，然后再在 2 个多小时内冷却至 0-5°C。在氮气气流下过滤悬浮液，利用 40ml 冷 EtOH 1×洗涤滤饼三次。然后称重滤饼，在 55-60°C 真空箱中干燥 16 小时。将组氨一盐酸盐转变成二盐酸盐的

三个不同实验的结果示于表 6。

表 6 二盐酸组胺的收率

	实验 4	实验 5	实验 6
湿滤饼重量 (g)	48.8	45.6	46.4
干燥固体重量 (g)	34.9	33.3	33.6
收率 (%) *	70	66.7	67.4

5

* 百分数收率数据基于校正过溶剂含量的一盐酸组胺。

实施例 7

检定、鉴别和测定二盐酸组胺纯度的 HPLC 方法

10 该实施例讨论了使用 HPLC 定量和鉴别二盐酸组胺以及定量最终产物中相关物质和降解物。该方法使用了具有梯度参数和 UV 检测能力的完全 HPLC 系统。对于色谱纯度的测定，我们使用了带有计算机化数据采集的系统。所使用的其它设备包括：一根 Waters Symmetry C-18, 5 μ m, 4.6 $\times$ 350mm 柱；一架分辨率为 0.01mg 或 0.01g 的分析天平；测定体积的玻璃器皿；以及柱加热器。使用的试剂和标准物包括：UPS 二盐酸组胺参考标准或等同物；甲醇，HPLC 级；乙腈，HPLC 级；1-庚烷磺酸，钠盐，Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) HPLC 级或等同物；磷酸二氢钠一水合物，ACS 试剂级；D-, L-一盐酸组氨酸，一水合物，(Sigma, St. Louis, MO)；1 N 氢氧化钠溶液；1 N 盐酸溶液；纯净水；以及苯甲醇，ACS 试剂级或等同物。

20

制备两种流动相缓冲剂。流动相 A (MPA) 包含 0.02M 磷酸二氢钠和 0.005M 庚烷磺酸，pH 调节至 3.0。流动相 B (MPB) 包含乙腈 (ACN) / 甲醇 (MeOH): 20/15 (v/v)。

25

制备用于检定和色谱纯度测定的标准物和样品。检定标准物包括在三种浓度 (0.88mg/ml、0.80mg/ml 和 0.72mg/ml) 下制备二盐酸组胺标准溶液。在 0.008mg/ml 下制备 DL-一盐酸组氨酸、一水合物标准物。类似地，制备双份检定样品，该样品包含 0.8mg/ml 合成得到的

二盐酸组胺，同时在 0.0006mg/ml 二盐酸组胺下制备定量极限 (LOQ) 溶液。对于定量极限，用于组胺的方法的灵敏度已经被确定为 0.07% ，而对于检测极限则为 0.03% 。光电二极管阵列峰值纯度研究已经阐明了组胺的特征。

- 5 在制备各种标准物和样品之后，平衡 HPLC 系统。一旦平衡之后，在初始条件（即在 1.5 ml/min 时，MPB 为 10% ）下检测废料管线中的流速。流速为 $1.5\text{ ml/min} \pm 0.15\text{ ml/min}$ 。在平衡系统之后，于开始检定前向柱中注入水（空白）。

- 10 这些制备一旦完成，注入 $0.7\text{mg/ml} \pm 0.1\text{mg/ml}$ 二盐酸组胺分辨溶液。计算 1mg/ml 苯甲醇溶液峰值与组胺峰值之间的分辨值“R”。进一步地，该过程重复五（5）次，计算标准偏差。

对于检定，绘制标准曲线。每注入 4 至 6 次样品，检测标准物，得到下列参数：谱尾系数不 >2.0 ；分辨值 >1.5 ；组胺峰值响应的相对标准偏差不 $>2.0\%$ ；以及标准曲线的校正系数不小于 0.995 。

- 15 为了校准色谱纯度，单独注射分辨溶液，计算苯甲醇与组胺峰值之间的分辨值“R”，再计算组胺峰值的谱尾系数。由于分辨值和谱系数满足要求，所以可连续注入 LOQ 样品。

- 20 计算三次组胺峰值响应的相对标准偏差。一般地，谱尾系数不 >2.0 ，分辨值大于 1.5 ，以及组胺峰值响应的相对标准偏差不大于 10% 。

由于上述参数满足要求，所以测试最终的二盐酸组胺。HPLC 的工作参数列于表 7。梯度参数列于表 8。

表 7 工作参数

流速:	1.5ml/min
注射体积:	20 μ l
检测:	212nm
柱:	Waters Symmetry C-18, 5 μ m, 4.6mm × 250mm
柱温:	50℃
检定浓度:	0.8mg/ml 二盐酸组胺
洗脱时间:	大约 30 分钟
流动相 A:	缓冲剂溶液
流动相 B:	ACN/MeOH 20/15 (v/v)

5

表 8 梯度参数

时间 (min)	流动相 B (%)	流速 (ml/min)
0	10	1.5
20	30	1.5
21	10	1.5
30	10	1.5

保留时间：组氨酸 = 大约 3 分钟
 组胺 = 大约 12 分钟

10

所使用的分析系统提供了测定上文实施例制得的二盐酸组胺样品的纯度所需的方法。

实施例 8

二盐酸组胺产物的 HPLC 分析

15

将实施例 6 得到的二盐酸组胺产物进行实施例 7 描述的 HPLC 分析，测定样品的纯度并确立最终产物是否满足本发明描述的方法的纯度标准。对于作为药物试剂的应用，二盐酸组胺必须具有最少的色谱

杂质。所发现的个别杂质高于 0.1 % a/a 一般需要毒性学鉴定。利用实施例 5 和 6 的方法，生成三批二盐酸组胺。它们的纯度描述在表 9 中。

5

表 9 HPLC 分析结果

实验	杂质描述	标准/实测
实验 1	L-组氨酸 HCl 一水合物	<0.8 % w/w; 未测
	个别色谱杂质	<0.1 % w/w
	杂质 #1	<0.05 % w/w
	杂质 #2	0.13 % w/w
	总的色谱杂质	<2.0 % w/w; 0.2 % w/w
实验 2	L-组氨酸 HCl 一水合物	<0.8 % w/w; 未测
	个别色谱杂质	<0.1 % w/w
	杂质 #1	<0.05 % w/w
	杂质 #2	0.10 % w/w
	总的色谱杂质	<2.0 % w/w; 0.2 % w/w
实验 3	L-组氨酸 HCl 一水合物	<0.8 % w/w; 未测
	个别色谱杂质	<0.1 % w/w
	杂质 #1	<0.05 % w/w
	杂质 #2	0.06 % w/w
	总的色谱杂质	<2.0 % w/w; 0.1 % w/w

表 9 描述的结果表明，最终二盐酸组胺产物满足本发明公开的可接受标准。首先，杂质#1 的含量低于检定的定量极限。其次，杂质#2 实测值略高于 0.1 % 限值，由此进行毒性学试验。杂质的标准水平确定为<0.2 % w/w。这些结果表明本发明公开的合成方法提供了合成可药用二盐酸组胺形式的手段。

结论

本发明描述了一种生产药物级二盐酸组胺的新的非酶解方法。这里描述的方法的一个显著优点在于其能够得到纯度水平高于现有其它方法所能得到的二盐酸组胺。

最后，前述实施例并不是限制本发明权利要求书所要求保护的范
5 围。特别地，基于上文公开，各种等同或取代均是普通技术人员所能
够认识到的，它们都是本发明公开的范围。

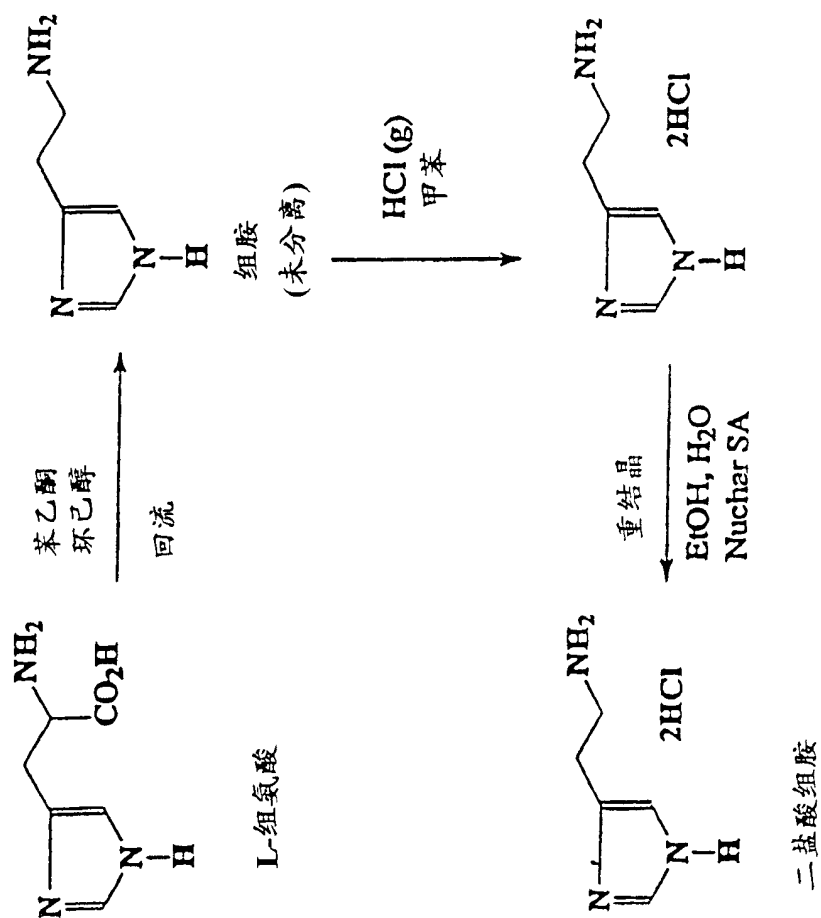


图 1

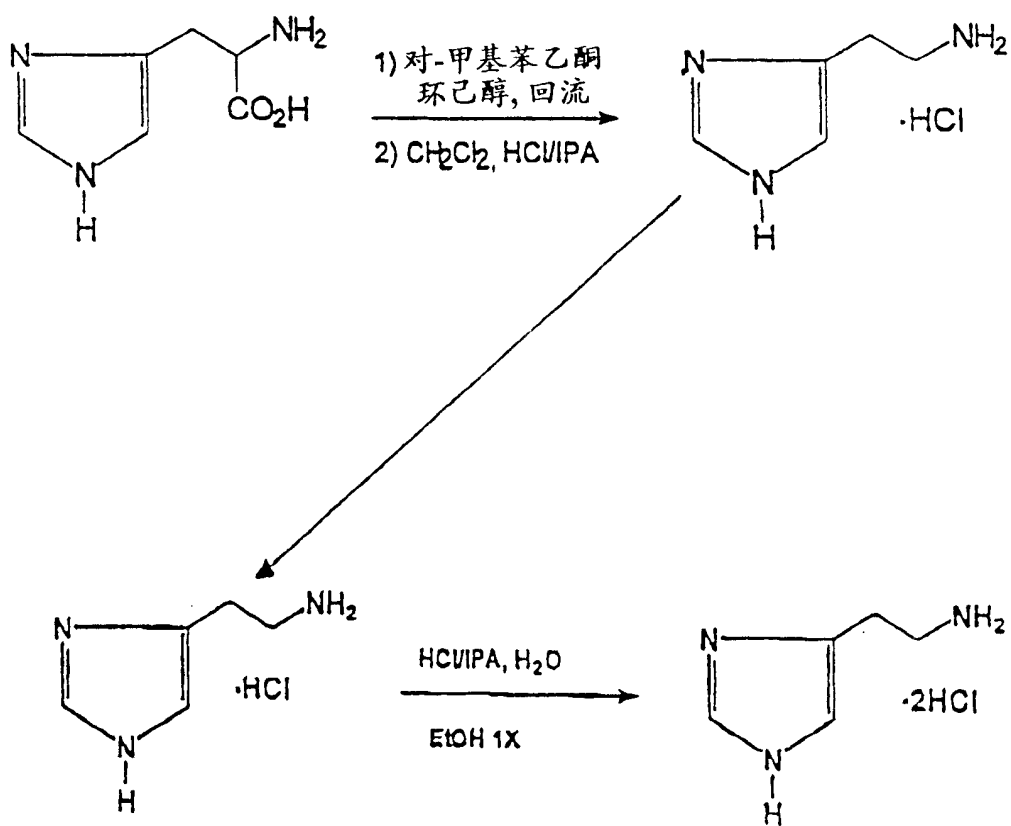


图 2