(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111253473 A
(43)申请公布日 2020.06.09

(21)申请号 202010159151.7

(22)申请日 2020.03.09

(71)申请人 长沙晨辰医药科技有限公司
地址 410000 湖南省长沙市雨花区环保中路188号1号厂房D603房

(72)发明人 张根

(74)专利代理机构 深圳市科吉华烽知识产权事务所(普通合伙) 44248
代理人 胡吉科

(51)Int.Cl.
C07K 7/58(2006.01)
C07K 1/14(2006.01)

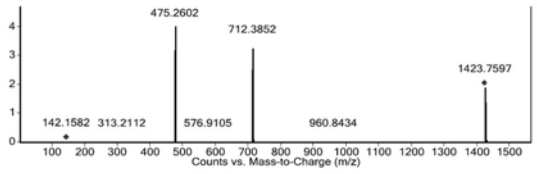
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法，其包括以下步骤：步骤S1，将杆菌肽原料药溶解到溶剂中，于50～60℃进行光照1~3h，得到含有杆菌肽杂质L的粗品；步骤S2，采用制备液相分离杆菌肽杂质L与其他成分，收集杆菌肽杂质L峰流分，把收集到的杆菌肽杂质L峰流分蒸干，便可得到杆菌肽杂质L杂质对照品。本发明的技术方案采用光催化的化学转化方法，将杆菌肽A在光照作用下转化为杆菌肽A的差向异构体即杂质L，步骤简便、高效，实现低成本的杂质粗品富集；后处理简单、成本低、污染小。



Peak List

m/z	z	Abund
474.9255	1	3183139.75
475.2602	1	4018407.75
475.5948	1	2927888
475.9289	1	1553619.75
711.8832	2	2514586.25
712.3852	2	3255900.5
712.8868	2	2328364.5
1422.7554	1	1506990.88
1423.7597	1	1890913.5
1424.7623	1	1364434

CN 111253473 A

1.一种基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于,其包括以下步骤:

步骤S1,将杆菌肽原料药溶解到溶剂中,于50～60℃进行光照1~3h,得到含有杆菌肽杂质L的粗品;

步骤S2,采用制备液相分离杆菌肽杂质L与其他成分,收集杆菌肽杂质L峰流分,把收集到的杆菌肽杂质L峰流分蒸干,便可得到杆菌肽杂质L杂质对照品。

2.根据权利要求1所述的基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于:步骤S1中,光照强度为4000~5000Lux。

3.根据权利要求1所述的基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于:步骤S1中,所述溶剂为甲醇或乙醇。

4.根据权利要求3所述的基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于:所述溶剂中含有助溶剂,所述助溶剂为三氟乙酸、甲酸或乙酸中的至少一种。

5.根据权利要求1~4任意一项所述的基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于:步骤S2中,以有机酸水溶液-乙腈体系作为流动相,以C18填料作为制备柱,将步骤S1得到的粗品进行洗脱分离。

6.根据权利要求5所述的基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于:所述有机酸为三氟乙酸、乙酸或甲酸。

7.根据权利要求6所述的基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于:所述有机酸的体积浓度为0.05~0.5%。

8.根据权利要求5所述的基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法,其特征在于:步骤S2中,采用旋转蒸发仪进行减压蒸干。

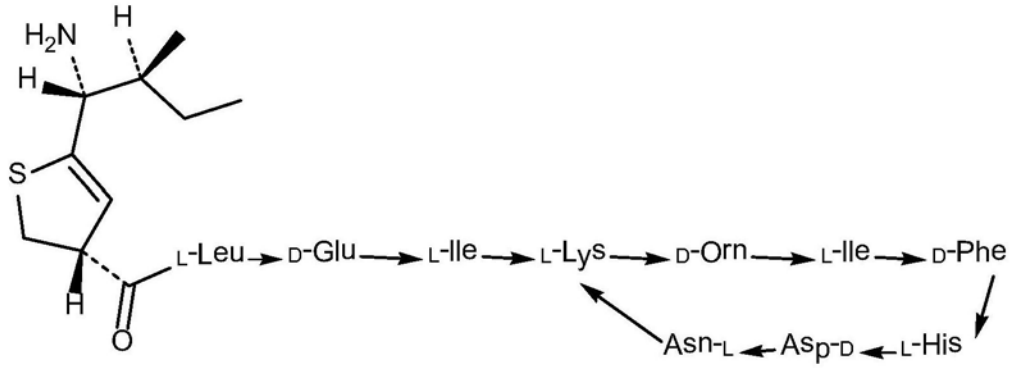
一种基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学技术领域，尤其涉及一种基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法。

背景技术

[0002] 杆菌肽是由地衣形芽孢杆菌(Bacillus licheni formus)发酵而得，对多数革兰氏阳性菌有强大的抗菌作用，抗菌与青霉素相似，对青霉素耐药的金葡菌也有效，主要用于治疗由耐药金葡菌引起的各种感染，如败血症、肺炎、心内膜炎等。欧洲药典EP9.6 收录了A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q的17种有关物质，其中规定杂质L的限度为2.0％，而杂质L为杆菌肽A的D-别异亮氨酸差向异构体，其化学结构如下所示，其对药品的安全性和有效性有重要的影响。

[0003] 

[0004] 近年各国药监部门逐步加强了对药品申请特别是仿制药申请的监管工作，尤其对仿制药的质量提出了更高的要求，要求制药企业对影响药品的安全性和有效性的各类杂质进行深入细致的研究，在研究过程中获得一定量的杂质对照品才能对其开展各项药学研究，因此杂质对照品的制备是一项非常重要的工作。

[0005] 现有文献中介绍到，Jon D.Epperson and Li-June Ming采用传统的反相HPLC方法直接从杆菌肽中分离出杆菌肽杂质L(文献中名称：bacitracin A_2)，该方法采用发酵样品直接进行分离制备，样品中杆菌肽杂质L含量较低，整体制备效率非常低，成本非常高，不适宜作为杂质对照品的制备方法。

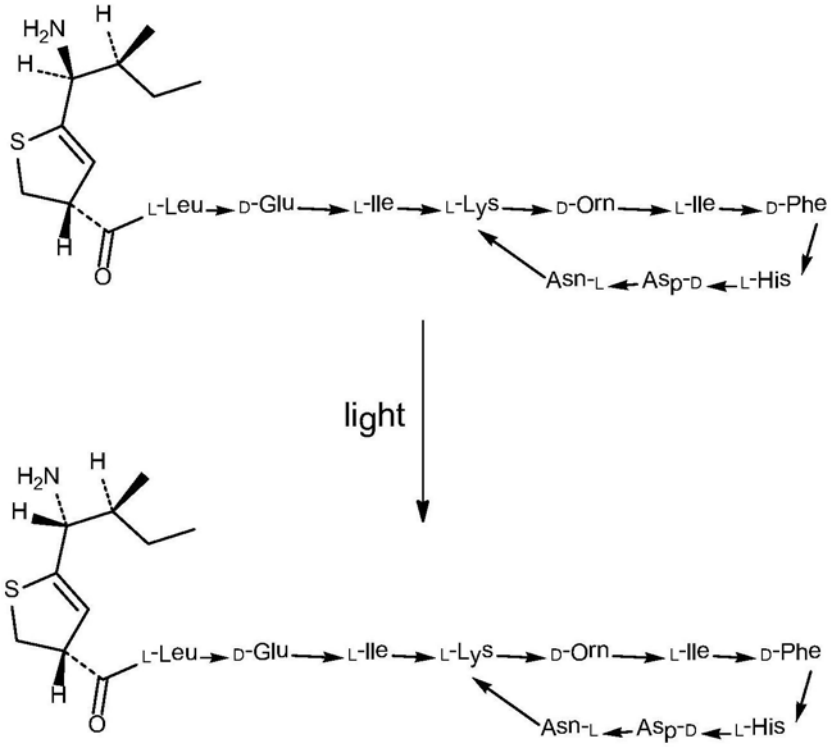
发明内容

[0006] 针对以上技术问题，本发明公开了一种基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法，实现高效、低成本分离制备得到符合药典要求的高纯度杆菌肽杂质L对照品。

[0007] 对此，本发明采用的技术方案为：

[0008] 一种基于光催化的杆菌肽杂质L的制备方法，其包括以下步骤：

[0009] 步骤S1，将杆菌肽原料药溶解到溶剂中，于50～60℃进行光照1～3h，得到含有杆菌肽杂质L的粗品；其中粗品中杆菌肽杂质L的含量大于20％。其中，上述含量为HPLC面积归一化法表征的含量，一般接近真实的质量百分含量。光催化转化路线如下所示：

[0010] 

[0011] 步骤S2，采用制备液相分离杆菌肽杂质L与其他成分，收集杆菌肽杂质L峰流分，把收集到的杆菌肽杂质L峰流分蒸干，便可得到杆菌肽杂质L杂质对照品。

[0012] 作为本发明的进一步改进，步骤S1中，光照强度为4000～5000Lux。

[0013] 作为本发明的进一步改进，步骤S1中，所述溶剂为甲醇或乙醇。

[0014] 作为本发明的进一步改进，所述溶剂中含有助溶剂，所述助溶剂为三氟乙酸、甲酸或乙酸中的至少一种。

[0015] 作为本发明的进一步改进，步骤S2中，以有机酸水溶液-乙腈体系作为流动相，以C18填料作为制备柱，将步骤S1得到的粗品进行洗脱分离，使杆菌肽杂质L与其他成分分离。

[0016] 作为本发明的进一步改进，所述有机酸为三氟乙酸、乙酸或甲酸。

[0017] 作为本发明的进一步改进，所述有机酸的体积浓度为0.05～0.5％。进一步的，所述有机酸的体积浓度为0.1％。

[0018] 作为本发明的进一步改进，步骤S2中，采用旋转蒸发仪进行减压蒸干。

[0019] 与现有技术相比，本发明的有益效果为：

[0020] 本发明的技术方案采用光催化的化学转化方法，将杆菌肽A在光照作用下转化为杆菌肽A的差向异构体(即杂质L)，得到的粗品中杂质L含量大于20％，步骤简便、高效，实现低成本的杂质粗品富集。

[0021] 另外，本发明的技术方案采用制备液相对杆菌肽酸破坏粗品进行一步地分离制备，所采用的流动相为有机酸溶液和乙腈，制备流分可以直接减压蒸干，后处理简单、低成本低、污染小。

附图说明

[0022] 图1是本发明实施例2制备得到的杆菌肽杂质L的高分辨质谱图谱。

[0023] 图2是本发明实施例2制备得到的杆菌肽杂质L的^{1}H谱图谱。

[0024] 图3是本发明实施例2制备得到的杆菌肽杂质L的^{13}C谱图谱。

具体实施方式

[0025] 下面对本发明的较优的实施例作进一步的详细说明。

[0026] 实施例1

[0027] 仪器:制备液相(Waters 2525);旋旋转蒸发仪(上海亚荣);光化学反应仪(上海聚莱实验仪器有限公司)。

[0028] 杆菌肽杂质L粗品制备:取3g杆菌肽原料药溶解于50ml乙醇中,并加入1ml三氟乙酸助溶,于50℃,光照强度5000Lux的光化学反应仪反应2小时,得杂质L含量为30%的粗品。上述含量是HPLC面积归一化法表征的含量。

[0029] 制备柱:填料为Kromasil EternityXT-10-C18,柱管为HB-DAC50。

[0030] 制备液相分离色谱条件:以0.1%体积浓度的三氟乙酸水溶液-乙腈(70:30,V/V)为流动相进行等度洗脱;流速为100mL/min;检测波长254nm;柱温为室温;手动进样,进样量2ml。

[0031] 样品溶液的配制:将制备得到的杆菌肽杂质L粗品,浓缩至10ml,过0.45um有机滤膜,即可。

[0032] 杆菌肽杂质L流分的收集:以制备液相分离色谱条件平衡系统8分钟后,手动进样品进行洗脱分离,在杆菌肽杂质L刚出峰时开始收集流分,至峰尾部结束,常温保存杆菌肽杂质L流分。仪器重复若干次,合并所杆菌肽杂质L流分。

[0033] 杆菌肽杂质L的流分后处理:把所有分离制备得到的流分于30℃用旋转蒸发仪减压蒸干,得到纯度97.2%的杆菌肽杂质L共705mg。该纯度是HPLC面积归一化法表征的纯度,一般接近真实的质量百分含量。

[0034] 对得到的杆菌肽杂质L进行分析,结果如下:

[0035] (1)LC-MS测试:

[0036] 仪器:Agilegnt 1260HPLC-6530Q-TOF

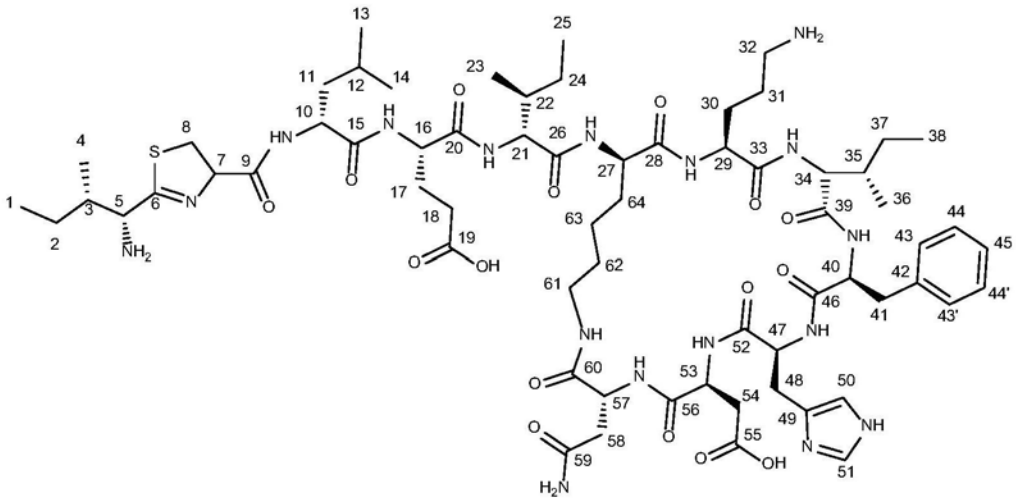
[0037] 测试方法:离子源:双AJS ESI离子源;正ESI模式;干燥气温度:350℃;干燥气体流速:12.0L/min;电喷雾电压:4.5kv。

[0038] 测试结果:观察到的m/z1422.7554、m/z712.3582和m/z475.2602分别为制备得到的杆菌肽杂质L的$[M+H]^{+}$离子、$[M+2H]^{2+}$离子和$[M+3H]^{3+}$离子。计算其分子式为$C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$,与杆菌肽A分子式一样,计算理论值与实际测量值相对偏差为 0.56ppm。

[0039] (2)NMR测试:

[0040] 仪器:瑞士Bruker AVANCE III HD 600超导脉冲傅里叶变换核磁共振谱仪。

[0041] 测试方法:将样品溶于重水,测试^{1}H谱和^{13}C-NMR谱,得到的杆菌肽差向异构体化学结构式如下式所示,NMR数据归属如表1所示。

[0042] 

[0043] 表1杆菌肽杂质L的^{13}C与^{1}H化学位移数据归属

[0044]

No.	δ_H	δ_C	No.	δ_H	δ_C
1	0.87(3H,t,J＝7.4Hz)	10.7	33	N/A	174.6
2	1.28(1H,overlap),1.42(1H,overlap)	25.2	34	4.03(1H,d,J＝7.9Hz)	58.4
3	1.97(1H,m)	36.8	35	1.73(1H,overlap)	35.7
4	0.90(3H,d,J＝7.0Hz)	12.7	36	0.49(3H,d,J＝6.8Hz)	14.4
5	4.24(1H,d,J＝4.3Hz)	57.0	37	0.89(1H,overlap),1.79(1H,m)	24.4
6	N/A	173.2	38	0.66(3H,t,J＝7.4Hz)	10.2
7	5.13(1H,t,J＝9.2Hz)	77.2	39	N/A	173.2
8	3.52(1H,dd,J＝11.3,8.7Hz),3.71(1H,m)	36.2	40	4.54(1H,overlap)	55.0
9	N/A	172.8	41	2.78(1H,m),3.07(1H,overlap)	37.1
10	4.36(1H,overlap)	52.6	42	N/A	136.2
11	1.52(1H,overlap),1.62(1H,overlap)	40.0	43/43′	7.13(2H,d,J＝7.3Hz)	129.0
12	1.52(1H,overlap)	24.4	44/44′	7.24(2H,t,J＝7.4Hz)	128.8
13	0.80(3H,d,J＝5.9Hz)	20.9	45	7.18(1H,t,J＝7.3Hz)	127.2
14	0.84(3H,d,J＝6.1Hz)	22.0	46	N/A	172.5
15	N/A	174.4	47	4.71(1H,overlap)	52.1
16	4.25(1H,overlap)	53.5	48	2.88(1H,overlap),3.14(1H,overlap)	27.1

17	1.90(1H,m),2.05(1H,m)	26.2	49	N/A	128.1
18	2.35(2H,t,J＝7.3Hz)	30.5	50	6.98(1H,s)	117.3
19	N/A	177.4	51	8.54(1H,d,J＝1.2Hz)	133.6
20	N/A	173.2	52	N/A	171.0
21	4.01(1H,d,J＝7.3Hz)	58.4	53	4.57(1H,overlap)	50.9
22	1.62(1H,overlap)	35.8	54	2.65(1H,overlap),2.72(1H,t,J＝5.4Hz)	36.2
23	0.74(3H,d,J＝6.8Hz)	14.7	55	N/A	175.3
24	1.03(1H,m),1.28(1H,overlap)	24.4	56	N/A	172.0
25	0.72(3H,t,J＝7.5Hz)	10.0	57	4.57(1H,overlap)	50.9
26	N/A	173.2	58	2.65(1H,overlap),2.75(1H,m)	37.1
27	4.20(1H,m)	53.9	59	N/A	172.5
28	N/A	173.6	60	N/A	172.5
29	4.36(1H,overlap)	52.7	61	3.10(1H,overlap),3.14(1H,overlap)	38.7
30	1.70(1H,overlap),1.79(1H,m)	28.5	62	1.42(2H,overlap)	27.2
31	1.59(2H,overlap)	23.3	63	1.20(1H,m),1.28(1H,overlap)	21.9
32	2.91(2H,overlap)	38.9	64	1.64(1H,overlap),1.73(1H,overlap)	30.5

[0045] 实施例2

[0046] 仪器:制备液相(Waters 2525);旋旋转蒸发仪(上海亚荣);光化学反应仪(上海聚莱实验仪器有限公司)。

[0047] 杆菌肽杂质L粗品制备:取3g杆菌肽原料药溶解于30ml甲醇中,并加入1ml三氟乙酸,于50℃,光照强度4500Lux的光化学反应仪反应3小时,得杂质L含量为35%的粗品。上述含量是HPLC面积归一化法表征的含量。

[0048] 制备柱:填料为Kromasil EternityXT-10-C18,柱管为HB-DAC50。

[0049] 制备液相分离色谱条件:以0.1%体积浓度的三氟乙酸水溶液-乙腈(70:30,V/V)为流动相进行等度洗脱;流速为100mL/min;检测波长254nm;柱温为室温;手动进样,进样量6ml。

[0050] 样品溶液的配制:将制备得到的杆菌肽杂质L粗品过0.45um有机滤膜,即可。

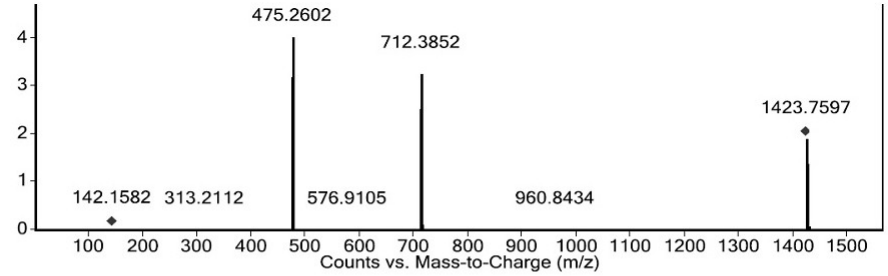
[0051] 杆菌肽杂质L流分的收集:以制备液相分离色谱条件平衡系统8分钟后,手动进样品进行洗脱分离,在杆菌肽杂质L刚出峰时开始收集流分,至峰尾部结束,常温保存杆菌肽

杂质L流分。仪器重复若干次，合并所杆菌肽杂质L流分。

[0052] 杆菌肽杂质L的流分后处理：把所有分离制备得到的流分于30℃用旋转蒸发仪减压蒸干，得到纯度97.1％的杆菌肽杂质L共765mg。该纯度是HPLC面积归一化法表征的纯度，一般接近真实的质量百分含量。

[0053] 将得到的杆菌肽杂质L进行分析，其高分辨质谱图谱如图1所示，^{1}H谱图谱如图 2所示，^{13}C谱图谱如图3所示，可见，本实施例得到的杆菌肽杂质L与杆菌肽A分子式一样，符合药典的要求，计算理论值与实际测量值偏差很小。

[0054] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。



Peak List

m/z	z	Abund
474.9255	1	3183139.75
475.2602	1	4018407.75
475.5948	1	2927888
475.9289	1	1553619.75
711.8832	2	2514586.25
712.3852	2	3255900.5
712.8868	2	2328364.5
1422.7554	1	1506990.88
1423.7597	1	1890913.5
1424.7623	1	1364434

图1

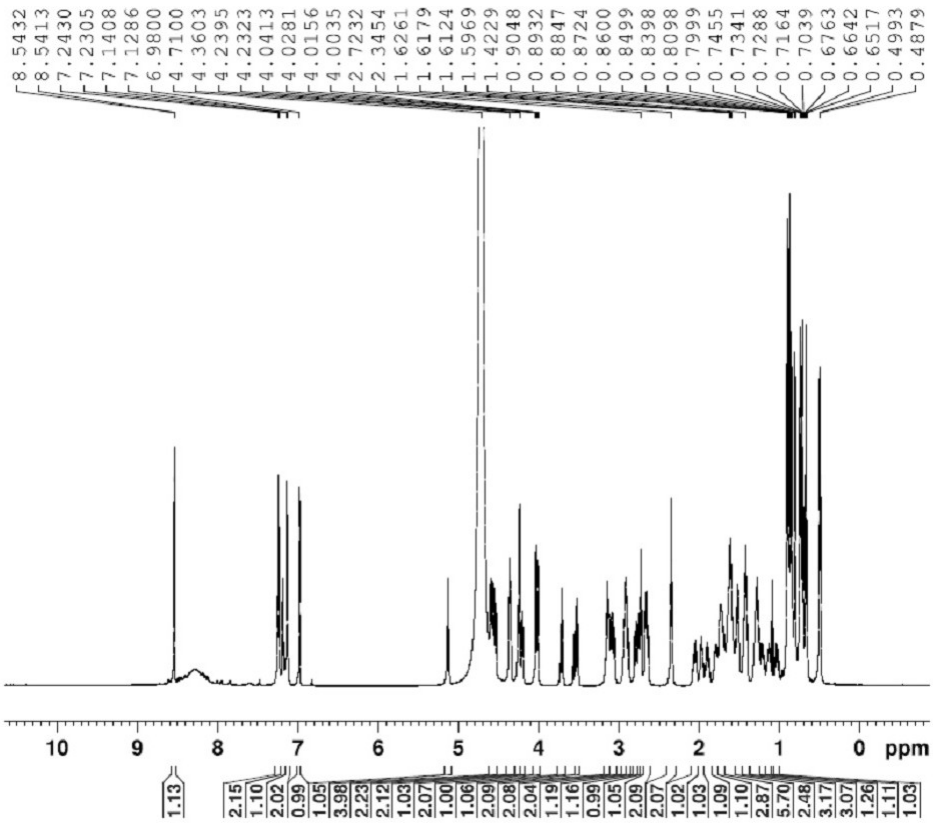


图2

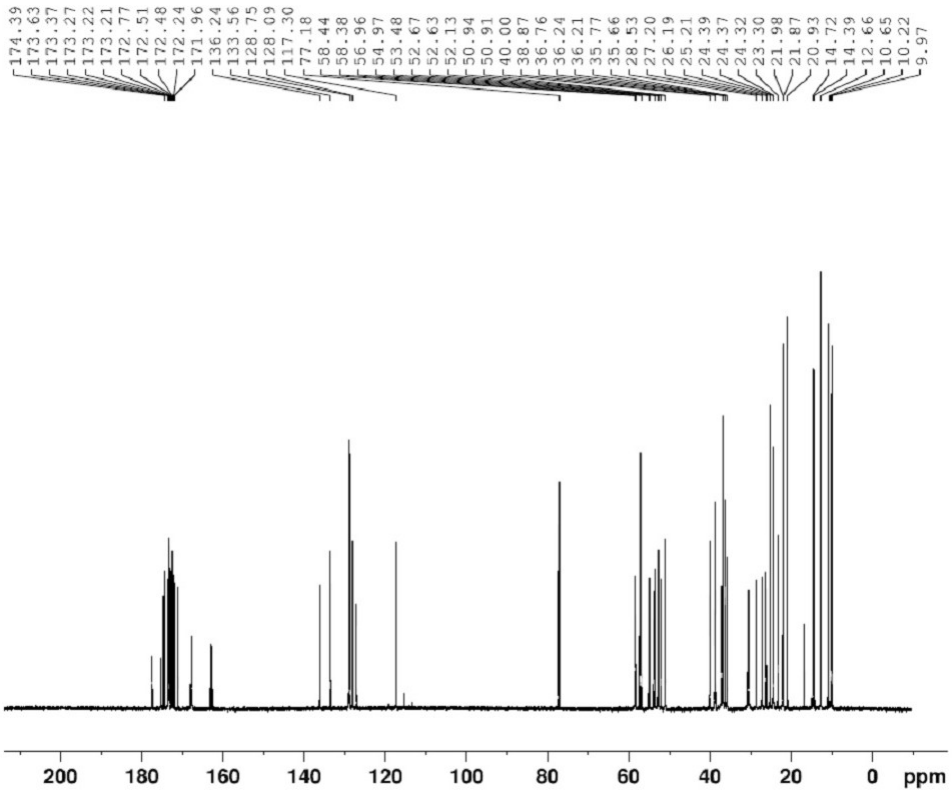

174.39
173.63
173.37
173.27
173.22
173.21
172.77
172.51
172.48
172.24
171.96
136.24
133.56
128.75
128.09
117.30
77.18
58.44
58.38
56.96
54.97
53.48
52.67
52.63
52.13
50.94
50.91
40.00
38.87
36.76
36.24
36.21
35.77
35.66
28.53
27.20
26.19
25.21
24.39
24.37
24.32
23.30
21.98
21.87
20.93
14.72
14.39
12.66
10.65
10.22
9.97
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm

图3