



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103122013 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 29

(21) 申请号 201110369607. 3

C07H 1/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 11. 18

A61K 31/7056 (2006. 01)

(71) 申请人 上海医药工业研究院

A61P 31/04 (2006. 01)

地址 200040 上海市静安区

G01N 30/88 (2006. 01)

申请人 中国医药工业研究总院

(72) 发明人 李悦 孙秋实 吴彤

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈长会 谢燕军

(51) Int. Cl.

C07H 15/16 (2006. 01)

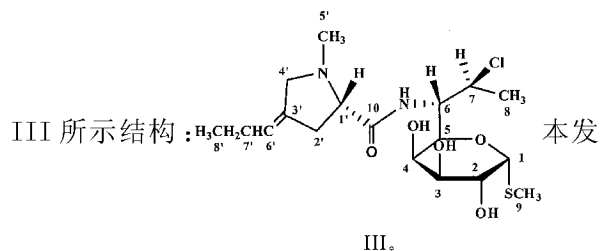
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称

去氢克林霉素、其分析制备方法和用途

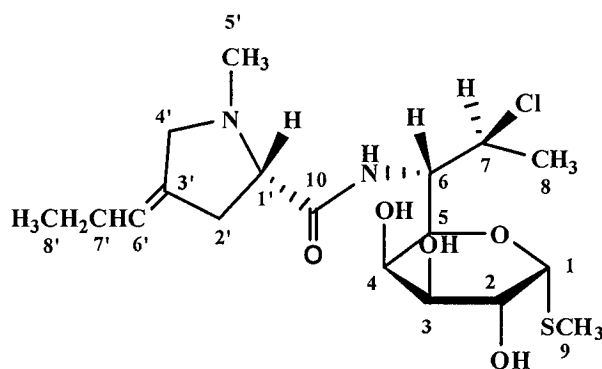
(57) 摘要

本发明提供一种去氢克林霉素, 具有如下式



明也提供所述去氢克林霉素的分析制备方法, 其特征在于对克林霉素原料进行分析, 并从中分离制备所述克林霉素异构体, 包括下列步骤: a) 用 LC-MS 法测定所述克林霉素原料, 根据被分析成分的相对保留时间和 / 或分子量确定所述原料中的去氢克林霉素; b) 根据步骤 a) 中所述的去氢克林霉素的相对保留时间和 / 或分子量确定柱层析法的条件, 使用正相硅胶柱层析法富集该相对保留时间和 / 或分子量对应的被分析成分; c) 根据步骤 a) 中所述的去氢克林霉素的相对保留时间所显示的色谱保留行为确定制备液相法的条件, 用制备液相法收集所述保留时间相对应的被分析成分。

1. 去氢克林霉素, 具有如下式 III 所示结构:



III.

2. 如权利要求 1 所述的去氢克林霉素的分析制备方法,其特征在于对克林霉素原料进行分析,并从中分离制备所述克林霉素异构体,包括下列步骤:

a) 用 LC-MS 法测定所述克林霉素原料, 根据被分析成分的相对保留时间和 / 或分子量确定所述原料中的去氢克林霉素;

b) 根据步骤 a) 中所述的去氢克林霉素的相对保留时间和 / 或分子量确定柱层析法的条件, 使用正相硅胶柱层析法富集该相对保留时间和 / 或分子量对应的被分析成分;

c) 根据步骤 a) 中所述的去氢克林霉素的相对保留时间所显示的色谱保留行为确定制备液相法的条件, 用制备液相法收集所述保留时间相对应的被分析成分。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤a)中,所述的LC-MS法测定所采用HPLC条件为:

流动相 18%乙腈、3%四氢呋喃、79%水和 0.2%甲酸；

pH 氨水调至 5.43-5.47；

柱温 25℃；

流速 1.0ml/min:

检测波长 210nm:

色谱柱 Diamonsil ODS C18, 5 μ m, 250 $\times$ 4.6mm 柱。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤b)中,所述的正相硅胶柱层析法富集采用的固定相为100~200目硅胶,流动相为乙酸乙酯和水饱和甲醇混合溶剂。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 b) 包括:

b 1) 样品：硅胶 = 1 : 50, 将样品溶于甲醇中, 干法上柱;

b2) 使用体积比为 9 : 1 的乙酸乙酯：甲醇混合溶剂洗脱并收集洗脱液。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤c)中,所述的制备液相法所采用条件包括:

流动相:18%乙腈,4.5%四氢呋喃,77.5%水,0.2%甲酸;

氨水调 pH 值为 5.45 左右：

色 谱 柱:Agilent ZORBAX SB-C18(5 μ m, 9.4 $\times$ 250mm) ; 检 测 波 长:210nm; 流 速: 1.0 $\times$ 2.25mL/min;

收集保留时间为 41.080 处的峰相对应的被分析物。

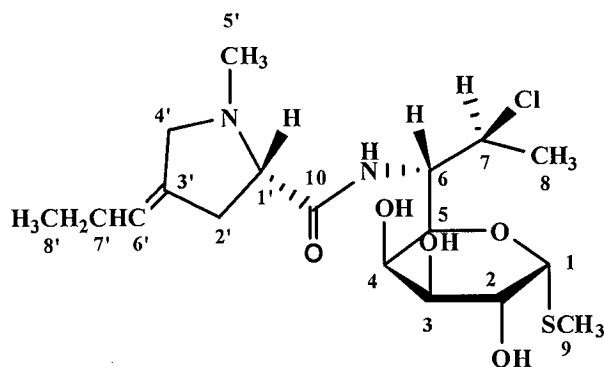
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,对所得被分析物进行纯化,条件如下:

仪器:HP1100,配有 Waters 2695 Separation Module, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector Waters;检测波长:210nm;流速:1.5mL/min;柱温:35℃;流动相:25%乙腈,3%四氢呋喃,72%水,0.2%甲酸,氨水调 pH 为 5.19 左右。

8. 如权利要求 1 所述的去氢克林霉素在制备抗革兰氏阳性菌药物中的用途。

9. 如权利要求 8 所述用途,其中所述革兰氏阳性菌选自抗枯草杆菌或金黄色葡萄球菌。

10. 根据权利要求 2-7 中任一项所述方法制备的杂质标准品,其特征在于,所述杂质具有如下结构式 III:



III。

11. 根据权利要求 10 所述的杂质标准品在分析克林霉素原料中的用途。

去氢克林霉素、其分析制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及分析化学领域,尤其涉及药物分析化学领域,特别涉及去氢克林霉素、其分析制备方法和用途。

背景技术

[0002] 盐酸克林霉素 (Clindamycin hydrochloride) 是盐酸林可霉素 7- 位羟基被氯原子取代而得的半合成衍生物。抗菌谱与林可霉素相同,抗菌活性较林可霉素强 4-8 倍,广泛地应用于治疗金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性球菌和各种厌氧菌引起的感染。

[0003] 盐酸克林霉素及其注射液在临床应用中出现较多的不良反应。药品在临床使用中产生的不良发应除了与药品本身的药理活性有关外,与药品中存在的杂质也有很大关系。

[0004] 任何影响药物纯度的物质均称为杂质,一般而言,杂质是指在生产和储存过程中引进或产生的药物以外的其他化学物质。药品质量标准中的杂质是指在按照经国家有关药品监督管理部门依法审查批准的规定工艺和规定原辅料生产的药品中,由其生产工艺和原辅料带入的杂质,或经稳定性实验确证的在存储过程中产生的降解产物。药品质量标准中的杂质不包括变更生产工艺或变更原辅料而产生的新的杂质,也不包括渗入或污染的外来物质。药品生产企业变更生产工艺或原辅料,并由此带进新的杂质对原质量标准的修订,均应依法向有关药品监督管理部门申报批准。

[0005] 药物的杂质一般与特定的药物有关,源于以下几个方面:

[0006] 1. 源自于药品生产过程中普遍使用的溶酶、催化剂等;

[0007] 2. 反应不完全而存在的反应原料,反应初始复合物、合成中间产品、副产品等与合成过程相关的物质;

[0008] 3. 贮存过程中的氧化、分解、水解产物;

[0009] 4. 手性化合物中的光学异构体;

[0010] 5. 药物的多种晶型;

[0011] 6. 动植物药物提取物中除有效成分生物碱挥发油、有机酸等小分子外,还存在分子量较大的蛋白质、鞣质、淀粉、树脂等杂质;

[0012] 7. 放射药品中的衰减物质;

[0013] 8. 生物工程制品中异常表达的蛋白质;

[0014] 9. 重金属及无机盐。

[0015] 药物杂质按化学类别和特性可分为:有机杂质、无机杂质、有机挥发性杂质。按来源可分为:有关物质(包括化学反应的前体、中间体、副产物和降解产物等)、其他杂质和外来杂质等。按结构关系,杂质又可分为:其他甾体、其他生物碱、几何异构体、光学异构体和聚合物等。按毒性,又可分为毒性杂质和普通杂质等。普通杂质即为在存在量下无显著不良生物作用的杂质,而毒性杂质为具有强烈不良生物作用的杂质。

[0016] 杂质检测是药品质量控制的一个重要环节,药品质量当中的含量测定是指原料药和制剂中主要成分的含量,有关物质是指原料药和制剂当中的有机杂质。通过有关物质检

查,弄清有关物质的来源、性质、检测方法及其限量,可以优化合成路线、实验条件等因素,进而避免其产生有关物质或其降到最低限度,从多方面保证和提高药品质量,减少药物的不良反应。

[0017] 药物杂质检查分析方法应灵敏、专属。随着科学技术的进步,分离、分析手段的不断提高,药物杂质的检测方法得到了不断的改进。检测药物杂质的方法很多,能较好的进行分离,鉴定药物的杂质,如高效液相色谱、气相色谱、紫外、红外光谱、薄层色谱分析、毛细管区带电泳、薄层毛细管电泳等,这些分析方法广泛应用于药品含量测定和杂质检测。近年来,质谱技术在药物杂质分析方面应用日益广泛,气相色谱联用技术、液相色谱联用技术已经成为药物杂质分析的重要手段。

[0018] 开发原料药和新制剂过程中的杂质研究,应严格按照国家有关新药申报的要求进行研究,也可以参照 ICH 的文本 Q3A(原料药中的杂质)和 Q3B(新制剂中的杂质)进行研究,并对杂质的安全性和降解产物进行安全性评价。其具体要求有如下几点:

[0019] 1. 对合成、纯化和储存中实际存在的杂质和潜在的杂质,应采用有效的分离分析方法进行检测;

[0020] 2. 对于表观含量在 0.1% 及其以上的杂质以及表观含量在 0.1% 以下的具有强烈生物作用的杂质或毒性杂质予以定性或确证其结构;

[0021] 3. 对在稳定性试验中出现的降解产物,也应按上述要求进行研究;

[0022] 4. 新药质量标准中的杂质检查项目应包括经研究和稳定性考察检出的,并在批量生产中出现的杂质和降解产物,并包括相应的限度;

[0023] 5. 除降解产物和毒性杂质外,在原料药中已经控制的杂质,在制剂中一般不再控制;

[0024] 6. 原料药和制剂中的无机杂质,应根据其生产工艺、起始原料情况确定检查项目,但对于毒性无机杂质,应在质量标准中规定其检查项。

[0025] 在仿制药的研制和生产中,如发现杂质的种类与原始开发药品不同或与已有法定杂质不同,必须增加新的杂质项检查项目,应该严格按照上述方法进行研究,申报新的药品质量标准或对原质量标准进行修订,并报有关药品监督管理部门审批。

[0026] 共存的异构体和抗生素多组分一般不作为杂质检查项目,作为共存物质,必要时在质量标准中规定其比例,以保证生产用的原料药与申报注册时的一致性。但当共存时的物质为毒性杂质时,该物质就不再认为是共存物质。单一对映体药物,其可能共存的其他对映体应作为杂质检查。消旋药物,当已有其单一对映体药物的法定质量标准时,应在该消旋体的质量标准中设旋光度检查项目。

[0027] 有机挥发性杂质,应根据生产工艺中所用有机溶剂及其残留情况,确定检查项目。可参考中国药典关于有机挥发性杂质的要求,或参考 ICH 文本 Q3C(残留溶剂指导原则)。对残留的毒性溶剂,应规定其检查项目。

[0028] 为了保证用药安全,原料药/制剂中的每一个杂质都必须进行安全性评估也就是说必须建立保证安全性的杂质限度,ICH 准则要求:药物中杂质的限度为 0.1% (对毒性药物限度更低),高于此水平的所有未知杂质应鉴别出来,而更重要的是,所有高于 0.1% 的杂质应研究其毒性。ICH 在 2007 年 2 月 7 日修订的“原料药中的杂质”指导原则,根据原料药的每日最大剂量将原料药分为两类,并分别制定了杂质的报告阈值、鉴定阈值与合

理限度。其中的报告阈值是指所有高于此阈值的杂质及含量均应记入每批产品的检验报告中,并反应在申报资料中。而鉴定阈值是指所有高于此阈值的杂质均应对其结构进行确证。合理限度是指只要质量标准中制定的杂质限度不高于此限度,就不需要提供该限度的制定依据,均认为该限度是合理的。

[0029] 对于新制剂,ICH 在 2003 年 2 月 5 日修订的“新制剂中的杂质”指导原则中也做了明确规定,该指导原则同样根据不同的用药剂量制订了杂质的报告阈值、鉴定阈值和合理限度。

[0030] 欧盟药品主管部门要求生产企业:(1) 应在稳定性研究中设立未知杂质(0.1%)的限度;(2) 应对限度大于或等于 0.1%的未知杂质进行结构确定和安全性验证。对于某些抗生素类药物要求更高,例如发酵产品红霉素,该品种已经 EP 收载,并规定杂质的可忽略限度为 0.06%,且任何杂质不得超过 3.0%。欧盟药品主管部门要求,任何大于可忽略限度 0.06%的未知峰给予结构确定并提出适当的杂质限度建议,当杂质达到该限度即对其进行安全性评价。FDA 也尤其关注药物生产中药物的纯度和剂量的安全性,要求药品生产者对杂质进行全面的分析,并尽可能的提供较多的结构信息。通常,超过 0.1%的杂质需鉴定出来并且用选择性好的方法进行定量分析,而且对 0.01%~0.1%的杂质也表示浓厚的兴趣。

[0031] 尽管杂质限度的确定对于药品研发非常重要,但国内药品研发的现实情况并不令人乐观。从近几年的新药申报情况分析,在杂质的研究和限度确定方面存在着较多的问题,主要表现为:部分药品研究单位对杂质研究的重要性了解不深;标准中对杂质的控制不够全面和准确;制订杂质限度时考虑问题不够全面,很少考虑杂质对药品安全性的不良影响;即使在杂质的含量明显超出正常工艺所允许的范围时,也不注意对现在的处方和工艺进行必要的优化,以降低杂质的限度。

[0032] 《中国药典》、《美国药典》、《欧洲药典》和《英国药典》均有克林霉素相关物质项的收载,而《英国药典》和《欧洲药典》的收载更为全面。

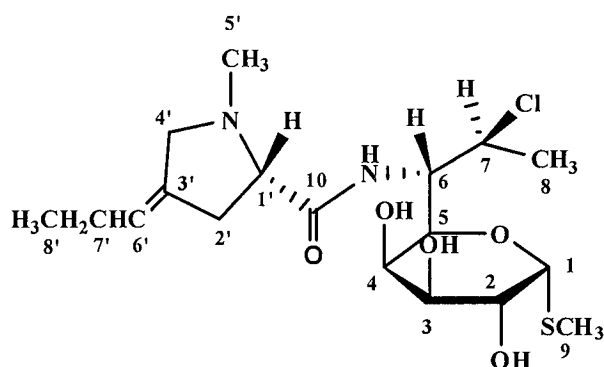
[0033] 《中国药典》中对克林霉素仅仅对杂质的总量进行了限定,对单一杂质研究不具体,而欧盟药品主管部门和 FDA 均要求对克林霉素原料药中表观含量 0.1%及其以上的杂质,进行结构鉴定和安全性验证。

发明内容

[0034] 本发明目的在于对克林霉素原料药的杂质进行研究,主要在于分离制备杂质的标准品并且鉴定原料药中的杂质结构。根据本发明的方法对原料药中的杂质进行分析、制备和结构鉴定,可以为杂质的毒理学研究和阐明不良反应发生机制提供基础,同时也可以为工艺合成实验条件的选择提供参考,有利于生产过程中药品质量的控制。

[0035] 根据本发明的第一个方面,其提供去氢克林霉素,具有如下式 III 所示结构:

[0036]



III。

[0037] 根据本发明的第二个方面,其提供本发明第一方面所述去氢克林霉素的分析制备方法,其特征在于对克林霉素原料进行分析,并从中分离制备所述克林霉素异构体,包括下列步骤:

[0038] a) 用 LC-MS 法测定所述克林霉素原料,根据被分析成分的相对保留时间和 / 或分子量确定所述原料中的去氢克林霉素;

[0039] b) 根据步骤 a) 中所述的去氢克林霉素的相对保留时间和 / 或分子量确定柱层析法的条件,使用正相硅胶柱层析法富集该相对保留时间和 / 或分子量对应的被分析成分;

[0040] c) 根据步骤 a) 中所述的去氢克林霉素的相对保留时间所显示的色谱保留行为确定制备液相法的条件,用制备液相法收集所述保留时间相对应的被分析成分。

[0041] 根据本发明的一个优选的实施方式,步骤 a) 中,所述的 LC-MS 法测定所采用 HPLC 条件为:

[0042] 流动相 18% 乙腈、3% 四氢呋喃、79% 水和 0.2% 甲酸;

[0043] pH 氨水调至 5.43-5.47;

[0044] 柱温 25°C;

[0045] 流速 1.0ml/min;

[0046] 检测波长 210nm;

[0047] 色谱柱 Diamonsil ODS C18, 5 μm, 250 × 4.6mm 柱。

[0048] 根据本发明的一个优选的实施方式,步骤 b) 中,所述的正相硅胶柱层析法富集采用的固定相为 100 ~ 200 目硅胶,流动相为乙酸乙酯和水饱和甲醇混合溶剂。

[0049] 根据本发明的一个优选的实施方式,步骤 b) 包括:

[0050] b 1) 样品: 硅胶 = 1 : 50, 将样品溶于甲醇中,干法上柱;

[0051] b2) 使用体积比为 9 : 1 的乙酸乙酯: 甲醇混合溶剂洗脱并收集洗脱液。

[0052] 根据本发明的一个优选的实施方式,步骤 c) 中,所述的制备液相法所采用条件包括:

[0053] 流动相: 18% 乙腈, 4.5% 四氢呋喃, 77.5% 水, 0.2% 甲酸;

[0054] 氨水调 pH 值为 5.45 左右;

[0055] 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 (5 μm, 9.4 × 250mm); 检测波长: 210nm; 流速: 1.0 × 2.25mL/min;

[0056] 收集保留时间为 41.080 处的峰相对应的被分析物。

[0057] 根据本发明的一个优选的实施方式,对所得被分析物进行纯化,条件如下: 仪器:

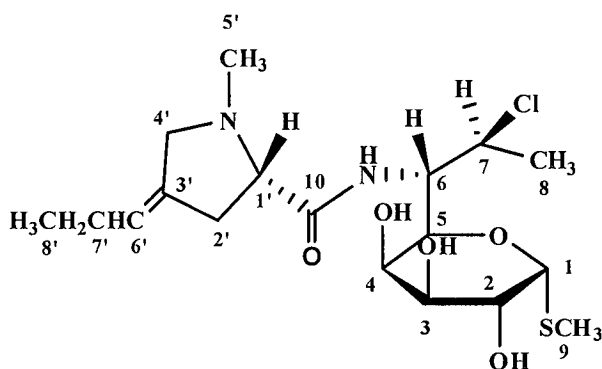
HP 1100,配有 Waters 2695 Separation Module,Waters 2487Dual λ Absorbance Detector Waters ;检测波长 :210nm ;流速 :1.5mL/min ;柱温 :35℃ ;流动相 :25%乙腈,3%四氢呋喃,72%水,0.2%甲酸,氨水调 pH 为 5.19 左右。

[0058] 根据本发明的第三个方面,其提供本发明第一方面所述去氢克林霉素在制备抗革兰氏阳性菌药物中的用途。

[0059] 根据本发明的一个优选的实施方式,所述革兰氏阳性菌选自抗枯草杆菌或金黄色葡萄球菌。

[0060] 根据本发明的第四方面,其提供根据本发明第二方面所述方法制备的杂质标准品,其特征在于,所述杂质具有如下结构式 III :

[0061]



III。

[0062] 根据本发明的第五方面,其提供本发明第四方面所述杂质标准品在分析克林霉素原料中的用途。

附图说明

[0063] 结合本申请所提供的附图,将更容易理解本申请的其它特征、目的和优点。这些附图仅用于示范,不对本发明构成任何限制。

[0064] 图 1 为盐酸克林霉素原料药的 LC-MS 谱图 (左图为 UV 图,右图为 TIC 图) ;

[0065] 图 2 为三批原料药的总离子流图 ;

[0066] 图 3 为盐酸克林霉素粗品的 TIC 谱图 ;

[0067] 图 4 为一次制备所得杂质 3 的 LC 谱图 ;

[0068] 图 5 为一次制备所得杂质 3 的 LC-MS 谱图 ;

[0069] 图 6 为杂质 3 进一步纯化的 LC 谱图 ;

[0070] 图 7 为纯化后的杂质 3 纯度检测的 LC 谱图 (A :S090701 批粗品 ;B :杂质 3) ;

[0071] 图 8 为对金黄色葡萄球菌的抑菌效果 (标号 1-4 分别为盐酸克林霉素、杂质 1、杂质 2、杂质 3) ;

[0072] 图 9 为对枯草芽孢杆菌的抑菌效果 (标号 1-4 分别为盐酸克林霉素、杂质 1、杂质 2、杂质 3) ;

[0073] 图 10 为对白色念珠菌的抑菌效果 (标号 1-4 分别为盐酸克林霉素、杂质 1、杂质 2、杂质 3)。

具体实施方式

[0074] 为了更好地理解本发明的技术方案,下面结合本发明的具体实施方式对本发明的技术方案作进一步说明,但其不限制本发明。

[0075] 本实施方式使用的克林霉素原料药均采用浙江天台药业有限公司提供的各比原料药。

[0076] 实施例 1

[0077] LC-MS 测定克林霉素原料药及粗品

[0078] 液质联用仪:HPLC Waters 2486, MS Waters micromass ZQ 4000。色谱柱:Diamonsil C18(5 μ 250 $\times$ 4.6mm);流动相为乙腈-四氢呋喃-水-甲酸(18%:3%:79%:0.2%),氨水调 pH 值为 5.45;柱温为室温;检测波长 210nm;流速 1.0mL/min,经分流进质谱。质谱条件为电喷雾电离源正离子 (ESI+) 检测方式;源温 80 $^{\circ}$ C;锥孔电压 35v。

[0079] 原料药的 LC-MS 检测

[0080] 取批号为 090303 $\times$ 7 的原料药用流动相溶解成浓度为 2mg/mL 的溶液,进样量为 20 μ L。LC-MS 检测结果如图 1 所示。

[0081] 液质检测出盐酸克林霉素原料药中除克林霉素外的六个有关物质,按保留时间大小分别为有关物质 1(3.95min),有关物质 2(4.20min),有关物质 3(12.39min),有关物质 4(21.89min),有关物质 5(23.25min),克林霉素(28.24min,主成分),有关物质 6(32.62min)。

[0082] 表 1、盐酸克林霉素原料药的 LC-MS 分析

[0083]

名称	相对保留 时间	[M+H] ⁺	组分分 子量	含量 (%) (UV 图归一 法)
有关物质 1	0.14	407	406	0.12
有关物质 2	0.15	407	406	0.02
有关物质 3	0.44	411	410	1.36
有关物质 4	0.78	425	424	0.92
有关物质 5	0.82	425	424	0.22
克林霉素	1.00	425	424	97.09
有关物质 6	1.16	423	422	0.27

[0084]

[0085] 为了考察不同批次原料药中有关物质的情况,分别取 081002 $\times$ 5 批、060901 $\times$ 5 批和 060902 $\times$ 5 批原料药,用流动相溶解成浓度为 2mg/mL 的溶液,进样量为 20 μ L。进行 LC-MS 检测,结果如图 2 所示。

[0086] 表 2、三批原料药的 LC-MS 分析结果

[0087]

组分名称	相对保留时间	[M+H] ⁺	含量 (%)		
			081002×5	060901×5	060902×5
有关物质 1+2	0.16	407	2.08	3.36	3.30
有关物质 3	0.45	411	3.84	4.07	3.94
有关物质 4	0.80	425	3.09	4.09	3.98
有关物质 5	0.84	425	0.33	0.41	0.37
克林霉素	1.00	425	90.38	87.83	88.18
有关物质 6	1.16	423	0.28	0.24	0.23

[0088] 由表 2 可知, 三批原料药中检测到的有关物质与 090303×7 批原料药相同, 各有关物质 TIC 图积分的含量与 090303×7 批原料药 TIC 图积分的含量相近。

[0089] 根据 ICH 规定, 需要对含量大于千分之一的杂质进行结构描述。液质检测到原料药中除了有关物质 2 外其他五个有关物质的含量均超过千分之一, 需要对这五个有关物质进行结构鉴定。参考英国药典^[24], 有三个有关物质的结构已知, 通过对比分子量确定: 有关物质 1 为林可霉素, 有关物质 3 为克林霉素 B。命名有关物质 4 为杂质 1, 有关物质 5 为杂质 2, 有关物质 6 为杂质 3。本发明重点研究杂质 3, 即去氢克林霉素。

[0090] 粗品的 LC-MS 检测

[0091] 由于原料药中除主成分外的其他各有关物质含量很少, 不容易对目标杂质进行富集, 因此对目标杂质进行研究时采用的样品为盐酸克林霉素粗品 (批号: S090701)。同原料药的检测方法, 对粗品进行 LC-MS 检测的结果如图 3 所示。

[0092] 表 3 盐酸克林霉素粗品的 LC-MS 分析

[0093]

组分名称	相对保留时间	[M+H] ⁺	组分分子量	含量 (%)
有关物质 1	0.14	407	406	0.29
有关物质 2	0.15	407	406	0.98
有关物质 7	0.22	389, 395	388, 394	0.50
有关物质 3	0.44	411	410	1.04
有关物质 8	0.69	452	451	2.69
杂质 1	0.78	425	424	7.27
杂质 2	0.83	425	424	1.26
克林霉素	1.00	425	424	85.80
杂质 3	1.15	423	422	0.19

[0094] 粗品中除了原料药里检测出的六个有关物质外, 另外还有有关物质 7 和有关物质 8, 研究中要注意这两个有关物质是否会对目标杂质的富集造成影响。其中两个目标杂质的

含量稍有提高:杂质 1 含量增至 7.27%,杂质 2 含量增至 1.26%。杂质 3 的含量仍然较低。

[0095] 正相硅胶柱层析富集目标杂质 - 式 III 所示的去氢克林霉素

[0096] 为了对目标杂质 - 去氢克林霉素进行初步富集,根据克林霉素的结构特点,选用正相硅胶柱层析进行研究。

[0097] 硅胶层析法的分离原理是根据物质在硅胶上的吸附力不同而得到分离,一般情况下极性较大的物质易被硅胶吸附,极性较弱的物质不易被硅胶吸附,整个层析过程即是吸附、解吸、再吸附、再解吸过程。

[0098] 用不同比例的乙酸乙酯和甲醇作为洗脱液选择能达到最佳分离富集的效果的比例。

[0099] 层析柱:5×100cm;

[0100] 预处理:由于盐酸克林霉素结构中含有多个羟基,性质比较活泼。因此硅胶在使用之前应先使其活性点失活,具体做法为:称取 100g100 ~ 200 目粗硅胶,工业级甲醇浸泡过夜,布氏漏斗将甲醇抽干后置于 70℃水浴使硅胶中的残余甲醇挥干,后装柱。

[0101] 上样:称取 1g 盐酸克林霉素粗品(批号:S090701),甲醇溶解,滴加入装有 1g 硅胶的坩埚中,置于 60℃水浴上拌样,干法上柱。

[0102] 正相柱层析条件为:样品:硅胶=1:50,洗脱顺序如下:(乙酸乙酯:甲醇 9:1)1800mL,(乙酸乙酯:甲醇 6:1)1680mL,(乙酸乙酯:甲醇 5:1)600mL,(乙酸乙酯:甲醇 4:1)600mL,(乙酸乙酯:甲醇 3:1)600mL,(乙酸乙酯:甲醇 2:1)600mL,(乙酸乙酯:甲醇 1:1)600mL,甲醇 600mL。其中能富集杂质 3 的为乙酸乙酯:甲醇 9:1 部位,能富集杂质 2 的为乙酸乙酯:甲醇 6:1 部位,能富集杂质 1 的为(乙酸乙酯:甲醇 5:1)~甲醇的洗脱部位。

[0103] HPLC 法分离制备目标杂质 - 式 III 所示的去氢克林霉素

[0104] 经过正相柱层析将三个目标杂质进行初步富集后,利用制备液相法将目标杂质进一步分离纯化,得到纯度较高的目标杂质以便进行结构鉴定。

[0105] 杂质 3 的分离制备

[0106] 杂质 3 在液相色谱图中位于主要成分克林霉素峰之后。由于克林霉素在色谱柱中吸附能力较强,即使在液相图中显示杂质 3 与主要成分基线分离,第一次制备所得的杂质 3 中仍然混有部分主要成分,但相比粗品的主要成分含量下降很多,因此需要进一步纯化将残留的主要成分去除,从而得到纯度较高的杂质 3 纯品。

[0107] 仪器:Waters 510 型半制备液相,Waters 484 检测器。色谱柱用 AgilentZORBAX SB-C18(5 μm,9.4×250mm),检测波长为 210nm,流速为 1.0×2.25mL/min。

[0108] 流动相:18%乙腈,4.5%四氢呋喃,77.5%水,0.2%甲酸,氨水调 pH 值为 5.45 左右。如图 4 所示,杂质 3 与主峰基线分离,38.088min 为主峰,41.080min 为杂质 3。

[0109] 经过一次制备,得到的杂质 3 和主峰的混合组分,LC-MS 检测结果如图 5 所示。与粗品的 LC 对比,保留时间为 27.25min 处为克林霉素,保留时间为 29.95min 处为杂质 3。各组分含量分别为:克林霉素:57.29%;杂质 3:42.71%。

[0110] 杂质 3 的纯化

[0111] 由于主要成分克林霉素在色谱柱中的吸附能力较强,且杂质 3 与主峰保留时间相差较小,一次制备所得的杂质 3 中仍然含有较多的主要成分,因此需要对一次制备的杂质 3

进行纯化,以便将主要成分完全去除。

[0112] 仪器:HP1100,配有 Waters 2695 Separation Module, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector Waters;检测波长:210nm,流速:1.5mL/min,柱温:35℃。

[0113] 纯化条件如下:仪器:HP1100,配有 Waters 2695 Separation Module, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector Waters;检测波长:210nm;流速:1.5mL/min;柱温:35℃;流动相:25%乙腈,3%四氢呋喃,72%水,0.2%甲酸,氨水调 pH 为 5.19 左右。结果如图 6 所示。

[0114] 杂质 3 的纯度检测

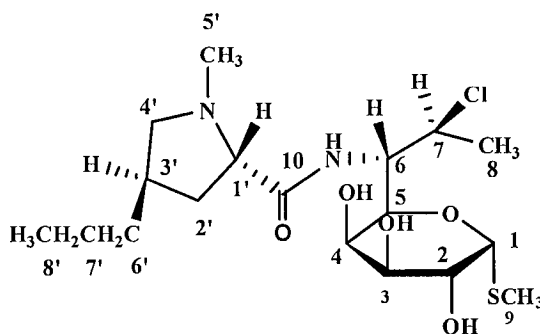
[0115] 纯化后得到杂质 3,置于 50℃水浴中减压旋蒸除去流动相后,LC-MS 检测结果如图 7 所示。经过与粗品的对照及质谱鉴定,保留时间为 28.17min 的峰确认为杂质 3,含量达到 95.97%。

[0116] 实施例 2

[0117] 目标杂质 - 式 III 所示的去氢克林霉素的结构鉴定

[0118] 将得到的去氢克林霉素的纯品分别用高分辨质谱确定元素组成,再用核磁共振氢谱、碳谱及二维谱 DEPT、HMBC、HMQC、COSY 和 NOESY 谱确定去氢克林霉素的结构。所用仪器为 Micromass Q-TOF 质谱仪及美国 Varian 核磁共振波谱仪 (400MHz)。以下结构式为克林霉素的结构,表 4 为克林霉素核磁共振波谱的数据。

[0119]



[0120] 克林霉素

[0121] 表 4、克林霉素的 ^1H -NMR 谱、 ^{13}C -NMR 谱、HMQC 谱、COSY 谱、NOESY 谱归属

[0122]

[0123]

位置	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)/ DEPT	HMQC	^1H - ^1H COSY	NOESY
1	5.33 (1H,d, $J=6.0\text{Hz}$)	90.6/CH	+	H-2	H-2, H-9
2	4.05 (1H,q, $J=6.0,10.4\text{Hz}$)	70.5/CH	+	H-1, H-3	H-1
3	3.60(1H,dd, $J=2.4,10.4\text{Hz}$)	73.1/CH	+	H-2, H-4	H-2, H-4, H-5
4	3.83(1H, brs)	70.8/CH	+	H-2, H-3, H-5	H-3, H-5
5	4.25 (1H,d, $J=9.6\text{Hz}$)	71.1/CH	+	H-4, H-6	H-3, H-4
6	4.40 (1H,d, $J=9.6\text{Hz}$)	60.8/CH	+	H-5, H-7	H-8
7	4.50 (1H, m)	55.9/CH	+	H-6, H-8	H-8
8	1.36 (3H,d, $J=6.8\text{Hz}$)	24.6/CH ₃	+	H-7	H-6, H-7
9	2.11 (3H, s)	15.9/CH ₃	+	/	H-1
10	/	171.9/C	/	/	/
1'	4.32 (1H,t, $J=8.4\text{Hz}$)	71.7/CH	+	H-2'	H-2', H-5'
2'	2.32~2.22 (2H, m)	38.4/CH ₂	+	H-1'	H-1'
3'	2.32~2.22 (1H, m)	39.2/CH	+	/	H-4'(δ 大), H-6', H-7'
4'	2.86~2.84(1H, m) 3.83~3.81 (1H, m)	64.1/CH ₂	+	H-4' (δ 大); H-4' (δ 小)	H-4' (δ 大); H-4' (δ 小), H-3'
5'	2.90 (3H, s)	43.7/CH ₃	+	/	H-1'
6'	1.43~1.39 (2H, m)	36.4/CH ₂	+	H-7'	H-3', H-7'
7'	1.30~1.22 (2H, m)	23.1/CH ₂	+	H-6', H-8'	H-8', H-6'
8'	0.82(3H,t, $J=6.8\text{Hz}$)	15.5/CH ₃	+	H-7'	H-7'

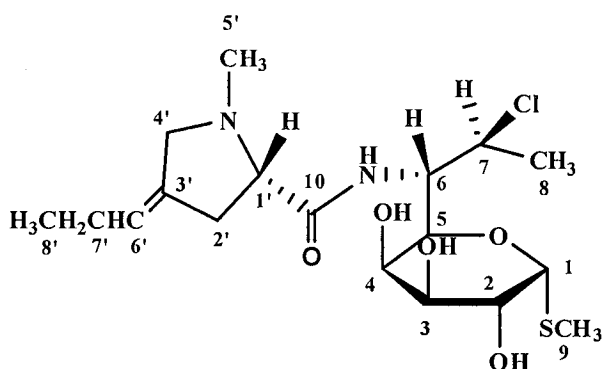
[0124] 克林霉素结构中共有四个手性中心,其构型分别为 6S,7S,1' S,3' R。

[0125] 杂质 3 的结构鉴定

[0126] 仪器: Micromass Q-TOF 质谱仪;美国 Varian 核磁共振波谱仪 (400MHz);

[0127] 高分辨质谱检测杂质 3 的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 质荷比为 445.1537,元素组成确定为 $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$,该杂质分子量比克林霉素少 2,为克林霉素的去氢物。结合核磁共振全套谱鉴定杂质 3 的结构如下式 III 所示。

[0128]



III

[0129] 表 7、杂质 3 的 ^1H -NMR 谱、 ^{13}C -NMR 谱、HMQC 谱、HMBC 谱、COSY 谱、NOESY 谱归属
[0130]

位 置	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)/ DEPT	HMQC	^1H - ^1H COSY	^1H - ^{13}C HMBC	NOESY
1	5.40 (1H,d, $J=6.0\text{Hz}$)	90.8/CH	+	H-2	C-2,C-3, C-5,C-9	H-2, H-9
2	4.13(1H,dd, $J=6.0$, 10.2 Hz)	70.6/CH	+	H-1,H-3	C-3,C-5	H-1
3	4.66 (1H,d, $J=10.8$ Hz)	73.3/CH	+	H-2	/	H-2, H-4, H-5
4	3.87 (1H,brs)	71.1/CH	+	/	C-2,C-3	H-5
5	5.32(1H,d, $J=10.4$ Hz)	72.0/CH	+	H-6	C-1,C-4, C-6,C-7	H-4, H-6
6	4.45(1H,d, $J=10.4$ Hz)	55.3/CH	+	H-5,H-7	C-5,C-7	H-5, H-7, H-8
7	4.67~4.59 (1H,m)	61.0/CH	+	H-6,H-8	C-5	H-6, H-8
8	1.45(3H,d, $J=6.8\text{Hz}$)	24.6/ CH_3	+	H-7	C-6,C-7	H-6, H-7
9	2.19(3H,s)	15.5/ CH_3	+	/	C-1	H-1
10	/	174.0/C	/	/	/	/
1'	3.51(1H,t, $J=8.0\text{Hz}$)	71.5/CH	+	H-2'	/	H-5'
2'	3.02~2.96(1H,m) ~2.57(1H,m)	35.8/ CH_2	+	H-1', H-2' H-2'	/	H-2'(δ 小); H-2'(δ 大)
3'	/	135.1/C	/	/	/	/
4'	3.77~3.74 (1H,m) 3.26~3.23 (1H,m)	62.9/ CH_2	+	H-4'(δ 小); H-4'(δ 大);	C-1',C-2'; /	H-4'(δ 小); H-4'(δ 大), H-5'

[0131]

5'	2.49 (3H,s)	42.8/CH ₃	+	/	C-1',C-4'	H-1', H-4' (δ 小)
6'	5.48 (1H,brs)	128.2/CH	+	/	/	H-7'
7'	2.00~1.95 (2H,m)	24.8/CH ₂	+	H-8'	C-3',C-6', C-8'	H-8'
8'	0.94(3H,t,J=7.2Hz)	15.7/CH ₃	+	H-7'	C-6',C-7'	H-7'

[0132] 氢谱四个 CH₃ 归属如下： δ_{H} 0.94 (3H, t, J = 7.2Hz) 归属为 H-8', δ_{H} 1.45 (3H, d, J = 6.8Hz) 归属为 H-8, δ_{H} 2.19 (3H, s) 归属为 H-9, δ_{H} 2.49 (3H, s) 归属为 H-5', 对应 HMQC 得到 δ_{C} 15.7 归属为 C-8', δ_{C} 24.6 归属为 C-8, δ_{C} 15.5 归属为 C-9, δ_{C} 42.8 归属为 C-5'。

[0133] 碳谱出现 18 个碳的信号, 分别对应杂质 3 的 18 个碳。其中化学位移为 174.0ppm, DEPT 谱中不出峰, 应为季碳, 由母核结构式可将 δ_{C} 174.0 归属为 C-10。¹HNMR 中未发现类似克林霉素中 3' 位氢原子的信号, 且在低场 δ_{H} 5.48ppm 处增加了一个烯氢质子, 推测结构中存在一个双键。碳谱 δ_{C} 135.1 和 δ_{C} 128.2 进一步表明双键的存在。HMBC 谱表明 H-7' 与 C-3', C-6', C-8' 远程相关, 说明杂质 3 在 3' 碳原子和 6' 碳原子处有双键。

[0134] HMBC 谱中 H-8 与 C-6, C-7 远程相关, 对应 δ_{C} 55.3 和 δ_{C} 61.0, COSY 谱显示 H-8 与 H-7 相关, 可知 δ_{H} 4.67 ~ 4.59 归属为 H-7, 由 HMQC 推断 δ_{C} 61.0 为 C-7, δ_{C} 55.3 为 C-6, δ_{H} 4.45 为 H-6。因为 δ_{H} 4.32 与 δ_{H} 4.42 耦合, 因此 δ_{H} 4.32 归属为 H-5, δ_{C} 72.0 归属为 C-5。

[0135] DEPT 谱可以确证 δ_{C} 35.8 和 δ_{C} 62.9 为亚甲基碳, HMQC 显示分别对应两个氢。因为 C-4' 与 N 相连, C-4' 位上的两个氢化学不等价, COSY 谱中表现出相互的耦合裂分。C-2' 上的两个 H 由于化学键翻转受限制, 化学位移值也不相同。化学位移值表明 δ_{C} 62.9 归属为 C-4', δ_{C} 35.8 归属为 C-2'。C-2' 对应氢位于 δ_{H} 3.02 ~ 2.96ppm 和 δ_{H} ~ 2.57ppm, C-4' 对应氢位于 δ_{H} 3.77 ~ 3.74ppm 和 δ_{H} 3.26 ~ 3.23ppm。

[0136] COSY 中 H-1 与 H-2 相关, 因此 δ_{H} 4.13 处归属为 H-2, 对应 HMQC 中 δ_{C} 70.6 为 C-2。COSY 中 H-2 与 H-3 相关, 因此 δ_{H} 4.13 处归属为 H-3, 对应 HMQC 中 δ_{C} 70.6 为 C-3。COSY 中 δ_{H} 3.87 与 H-2 相关, 因此 δ_{H} 3.87 归属为 H-4, COSY 中 δ_{H} 3.51 与 H-2' 和 H-5' 相关, 因此 δ_{H} 3.506 归属为 H-1'。

[0137] 因此, 去氢克林霉素具有与克林霉素相同的母核结构, 为克林霉素的去氢物。

[0138] 克林霉素结构中有四个手性碳, 分别为 C-6, C-7, C-1' 和 C-3', 构型分别为 6S, 7S, 1'S, 3'R。杂质 3 分子量比克林霉素小 2, 由 NMR 数据推断为克林霉素在 H-3' 和 H-6' 处发生消除反应所得。由于 C-3' 为 sp² 杂化的不饱和碳原子, C-2', C-3' 和 C-4' 为一平面结构, C-2' 和 C-4' 上相连的两个 C-H 化学键翻转受到限制, 导致 C-2' 和 C-4' 上的两个 H 化学位移值不同。杂质 3 未有药典及文献收载。

[0139] 实施例 3

[0140] 盐酸克林霉素及本发明杂质 3 的抑菌实验

[0141] 用于测定抗菌药物体外抑制细菌生长效力的试验称为抑菌试验。本实验考察了盐酸克林霉素原料药中表观含量超过 0.1% 的去氢克林霉素的抑菌活性, 将制备得到的去氢

克林霉素的纯品同盐酸克林霉素原料药进行抑菌活性对照。

[0142] 供试溶液的配制

[0143] 盐酸克林霉素 (090303×7 批, 浙江天台药业有限公司): 1.091mg, 1mL 水溶解;

[0144] 杂质 3: 1.139mg, 0.4mL 水溶解。

[0145] 实验菌株

[0146] 金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性菌)、枯草芽孢杆菌 (细菌)、白色念珠菌 (真菌); 由上海医药工业研究院生物部提供。

[0147] 培养基的配制

[0148] 白色念珠菌培养基 (%)

[0149]	葡萄糖	0.1	酵母膏	0.25
--------	-----	-----	-----	------

[0150]	KCl	0.18	NaAc	0.82
--------	-----	------	------	------

[0151]	琼脂	1.5	pH	7.0
--------	----	-----	----	-----

[0152] 121℃灭菌 30min

[0153] 金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌 (%)

[0154]	蛋白胨	0.6	牛肉膏	0.15
--------	-----	-----	-----	------

[0155]	酵母膏	0.6	葡萄糖	0.1
--------	-----	-----	-----	-----

[0156]	琼脂	1.5	pH	6.5
--------	----	-----	----	-----

[0157] 121℃灭菌 30min

[0158] 滤纸片的制备

[0159] 选择吸水性强的优质滤纸, 用打孔器打成直径为 6mm 的圆形滤纸片, 经干热灭菌后备用。

[0160] 实验方法

[0161] 琼脂扩散纸片法^[30]: 吸取 0.1mL 菌液, 均匀涂布与 M-H 琼脂表面皿上。分别将 10 μL 的盐酸克林霉素及去氢克林霉素的溶液均匀加到灭菌的纸片上, 待干燥后用无菌镊子分别夹取纸片等距离放置于含菌的表面皿上。将表面皿盖上, 平置于 37℃温箱中培养 24h 后取出。观察抑菌效果。

[0162] 实验结果

[0163] 盐酸克林霉素及去氢克林霉素对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均有抑菌效果。对金黄色葡萄球菌的抑菌效果如图 8 所示, 杂质 3 抑菌圈大小与盐酸克林霉素相似。对于枯草芽孢杆菌的抑菌效果如图 9 所示, 四者的抑菌圈均较大, 说明盐酸克林霉素及去氢克林霉素对枯草芽孢杆菌有好的抑制作用。图 10 显示盐酸克林霉素及去氢克林霉素的滤纸片周围没有出现抑菌圈, 说明均对白色念珠球菌没有抗菌活性。

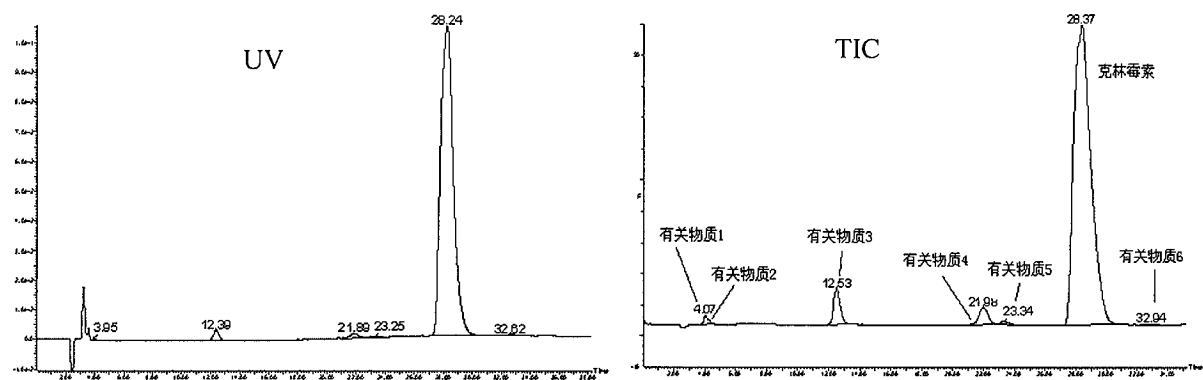


图 1

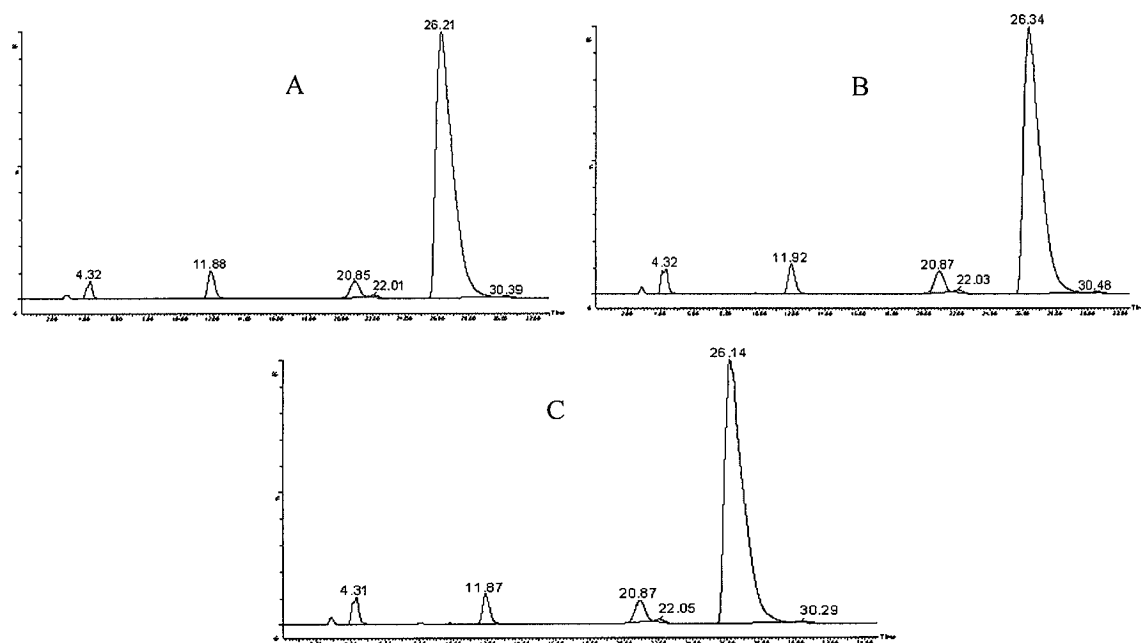


图 2

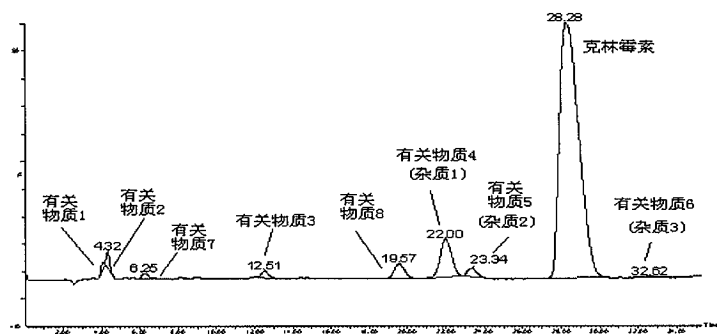


图 3



图 4

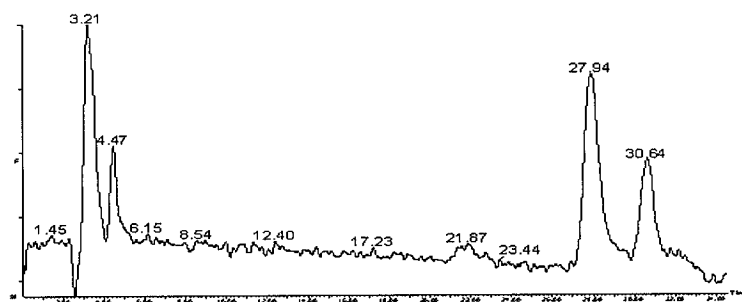


图 5

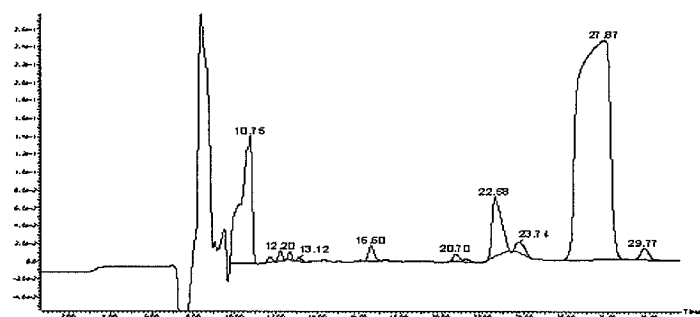


图 6

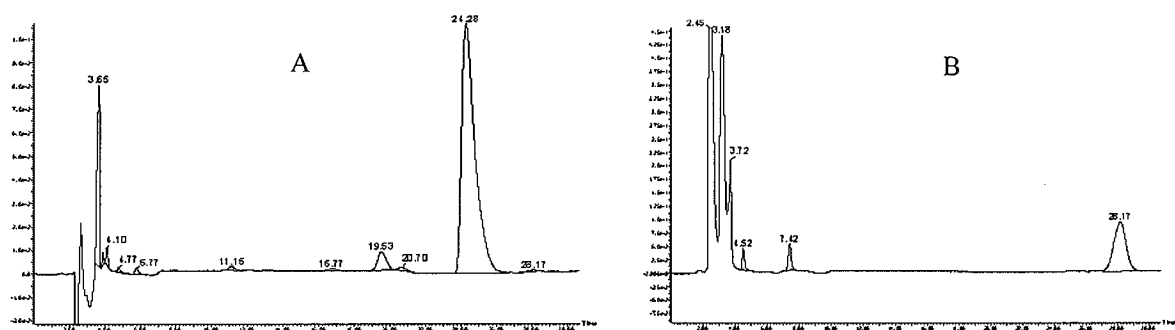


图 7



图 8

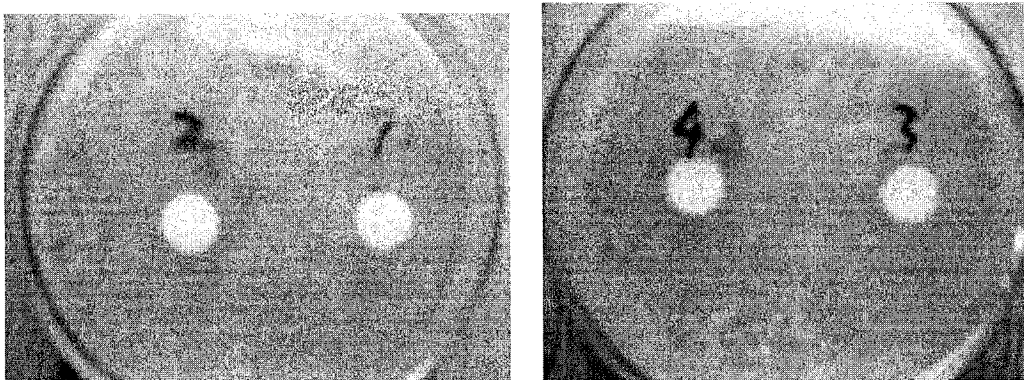


图 9

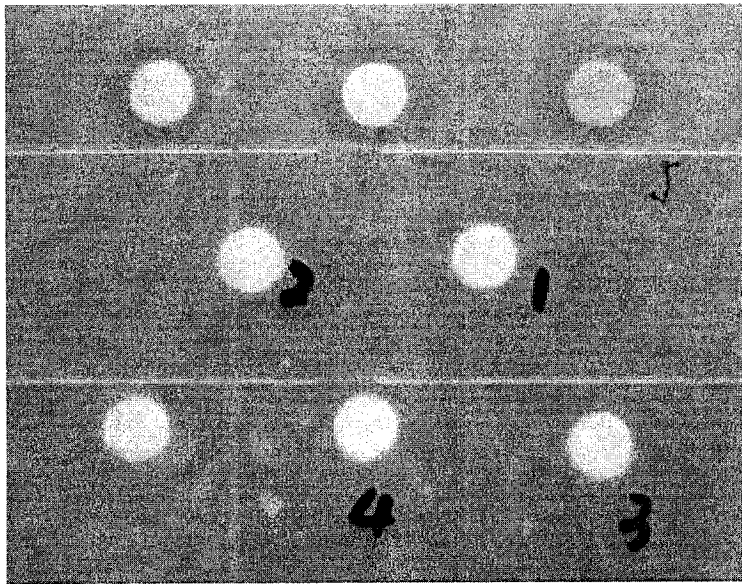


图 10