



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101346384 B

(45) 授权公告日 2012.07.04

(21) 申请号 200680049462.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2006.11.22

*C07D 489/02* (2006.01)

(30) 优先权数据

审查员 宫方斌

60/739,087 2005.11.22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.06.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/045316 2006.11.22

(87) PCT申请的公布数据

W02007/062184 EN 2007.05.31

(73) 专利权人 控制化学品公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 朱尔斯·A·谢弗

弗拉迪斯拉夫·V·捷利亚特尼科夫

汪浩

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

代理人 刘晓东 赵中璋

权利要求书 2 页 说明书 26 页

(54) 发明名称

用于降低羟考酮和其它组分中杂质迈克尔受体水平的方法

(57) 摘要

本发明涉及从某些组分中除去迈克尔受体的方法,其中在足以除去迈克尔受体和所得硫醇-迈克尔加成物的条件下利用含巯基化合物处理所述组分。本发明的某些实施方案能够定量和/或除去迈克尔受体和/或迈克尔受体前体。

1. 一种从组分中除去至少一种迈克尔受体的方法,所述组分是药品,所述迈克尔受体是  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和亲电体,所述方法包括:

在足以除去至少一种迈克尔受体和 / 或硫醇 - 迈克尔加成物的至少部分的条件下利用含巯基化合物处理所述组分,所述硫醇 - 迈克尔加成物可通过含巯基化合物与至少一种迈克尔受体的加成反应形成。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述组分选自下述组分之一或其任意组合:羟考酮、氢可酮、羟吗啡酮、氢吗啡酮、纳洛酮、纳曲酮和其可接受的盐。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述组分是羟考酮或其可接受的盐。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述迈克尔受体是 14- 羟可待因酮或其盐。

5. 权利要求 2 的方法,其中所述组分是纳曲酮或其可接受的盐。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述迈克尔受体是 7,8- 脱氢纳曲酮或其盐。

7. 权利要求 1 的方法,包括生成产物,其中任何单一迈克尔受体的量都不超过 25ppm。

8. 权利要求 1 的方法,包括生成产物,其中任何单一迈克尔受体的量都不超过 10ppm。

9. 权利要求 1 的方法,包括生成产物,其中任何单一迈克尔受体的量都不超过 5ppm。

10. 权利要求 1 的方法,包括生成含有羟考酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的 14- 羟可待因酮或其盐的量小于 25ppm。

11. 权利要求 1 的方法,包括生成含有羟考酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的 14- 羟可待因酮或其盐的量小于 10ppm。

12. 权利要求 1 的方法,包括生成含有羟考酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的 14- 羟可待因酮或其盐的量小于 5ppm。

13. 权利要求 1 的方法,包括生成含有羟考酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的 14- 羟可待因酮或其盐的量小于 1ppm。

14. 一种从组分中除去至少一种迈克尔受体水合物的方法,所述组分是药品,所述迈克尔受体水合物是  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和亲电体与水的加成产物,所述方法包括:

在通过将至少一种迈克尔受体水合物转化成迈克尔受体而足以除去所述至少一种迈克尔受体水合物的条件下,利用酸性催化剂处理所述组分;然后在足以从所述组分中除去未反应的含巯基化合物、所述至少一种最初存在于所述组分中的迈克尔受体、和由所述至少一种迈克尔水合物形成的迈克尔受体的条件下,利用适当的可溶性含巯基化合物处理所述组分;其中所述含巯基化合物根据其形成可溶性硫醇 - 迈克尔加成物的能力进行选择,所述可溶性硫醇 - 迈克尔加成物可以从所述组分中除去并且在需要时可以被定量以便确定所述组分中迈克尔受体水合物的含量和迈克尔受体的含量。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述迈克尔受体水合物是 8- 羟基羟考酮或其盐,并且所述组分是羟考酮或其可接受的盐。

16. 权利要求 14 的方法,其中所述迈克尔受体水合物是 8- 羟基纳曲酮或其盐,并且所述组分是纳曲酮或其可接受的盐。

17. 权利要求 14 的方法,包括生成含有羟考酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的 8- 羟基羟考酮或其盐的量小于 100ppm。

18. 权利要求 14 的方法,包括生成含有羟考酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的 8- 羟基羟考酮或其盐的量小于 10ppm。

19. 权利要求 14 的方法, 包括生成含有羟考酮或其可接受盐的产物, 所述产物含有的 8- 羟基羟考酮或其盐的量小于 5ppm。

20. 权利要求 14 的方法, 包括生成含有纳曲酮或其可接受盐的产物, 所述产物含有的 8- 羟基纳曲酮或其盐的量小于 100ppm。

21. 权利要求 14 的方法, 包括生成含有纳曲酮或其可接受盐的产物, 所述产物含有的 8- 羟基纳曲酮或其盐的量小于 10ppm。

22. 权利要求 14 的方法, 包括生成含有纳曲酮或其可接受盐的产物, 所述产物含有的 8- 羟基纳曲酮或其盐的量小于 5ppm。

23. 权利要求 1 或 14 的方法, 其中由所述方法得到的组分可以被生命有机体内化。

## 用于降低羟考酮和其它组分中杂质迈克尔受体水平的方法

### 背景技术

[0001] 通常不希望在药剂、食物或其它可被生命有机体内化的组分中存在作为杂质的迈克尔受体,因为迈克尔受体可以与亲核性细胞成分进行细胞毒性反应。尤其值得关心的是迈克尔受体与核酸亲核体之间的潜在的基因毒性反应(例如 Chem. Res. Toxicol. 2004, 17, 827-838、Chem. Res. Toxicol. 1991, 4, 50-7、Environmental Health Perspectives 1990, 88, 99-106)。

[0002] 令人感兴趣的是,动物具有用于灭活内化的或代谢产生的迈克尔受体的防御系统。一种这样的灭活系统涉及迈克尔受体与内源性细胞亲核体(还原型谷胱甘肽)的反应,以形成谷胱甘肽加成物(见 Advances in Enzyme Regulation 1993, 33, 281-296 的论述)。最近的研究(Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 2849-2855 ;Chem. Commun. 2005, 886-888)表明该反应是可逆的。因此,迈克尔受体的基因毒性可能性和致癌可能性反映了迈克尔受体未能成功地与谷胱甘肽完全反应或者反映了逆转的硫醇加成反应。从而,有必要将存在于药物和其它意欲施用给生命有机体的产物中的迈克尔受体杂质(或迈克尔受体前体)的量最小化。

[0003] 最近公开的名称为“Process for preparing oxycodone hydrochloride having less than 25 PPM 14-hydroxycodone”的专利申请(20050222188A1)描述了从镇痛组分羟考酮中去除迈克尔受体 14-羟可待因酮的方法,所述方法涉及在酸性溶液中氢化含有杂质 14-羟可待因酮的羟考酮盐酸盐组分。

[0004] 尽管已经存在如 20050222188A1(以及别处)所述的用于除去和检测迈克尔受体杂质的技术,继续改进仍将提高药物和其它由生命有机体消耗的组分的安全性。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个方面涉及所附权利要求中所述的方法。

[0006] 本发明涉及从药物或其它含有可被生命有机体内化成分的组分中或者从可与意欲由生命有机体内化的成分相接触的组分中除去迈克尔受体和/或其前体的方法,其中在足以除去迈克尔受体和硫醇-迈克尔加成物的条件下,利用含巯基化合物处理所述组分。当下文提及方法时,应当理解可使用本文所述的任何方法。

[0007] 在一个方面,本发明提供一系列方法。一种方法包括从组分中除去至少一种迈克尔受体,所述组分为下述组分之一或其任意组合:可被生命有机体内化的组分、可与生命有机体相接触的组分、或可与适用于被生命有机体内化的物质相接触的组分,所述方法包括在足以除去至少一种迈克尔受体和/或硫醇-迈克尔加成物的至少部分的条件下利用含巯基化合物处理所述组分,所述硫醇-迈克尔加成物可通过含巯基化合物与至少一种迈克尔受体的加成反应形成。

[0008] 本发明的另一种方法包括从组分中除去至少一种迈克尔受体,所述组分为下述组分之一或其任意组合:可被生命有机体内化的组分、可与生命有机体相接触的组分、或可与适用于被生命有机体内化的物质相接触的组分,所述方法包括在足以与至少一种迈克尔受

体反应的条件下利用合适的可溶性含巯基化合物处理所述组分,并且从所述组分中除去所得硫醇-迈克尔加成物和未反应的含巯基化合物,其中所述含巯基化合物根据其形成可从所述组分中除去的可溶性硫醇-迈克尔加成物的能力进行选择,所述硫醇-迈克尔加成物可从所述组分中除去,并且在需要时可以被定量以便确定所述组分中迈克尔受体的含量。

[0009] 在本发明的方法中,利用被固定到固体载体上的适当硫醇处理所述组分。所述组分选自下述组分之一或其任意组合:羟考酮、氢可酮、羟吗啡酮、氢吗啡酮、纳洛酮、纳曲酮或其可接受的盐、相关生物碱或其可接受的盐。

[0010] 本发明的方法包括生成产物,其中任何单一迈克尔受体或其盐的量都不超过 5ppm,或者不超过 10ppm 或 25ppm。

[0011] 可制备这样的产物中,其中任何单一硫醇-迈克尔加成物或其盐的量都不超过 25ppm。还可制备这样的产物,其中含有羟考酮或其可接受的盐,而 14-羟可待因酮或其盐的量小于 25ppm、小于 10ppm、小于 5ppm、或小于 1ppm。

[0012] 可制备含有羟考酮或其可接受盐的产物,其中含有的 14-羟可待因酮或其盐的量小于 1ppm。可制备含有纳曲酮或其可接受盐的产物,其中含有的 7,8-脱氢纳曲酮或其盐的量小于 25ppm、小于 10ppm、小于 5ppm、或小于 1ppm。

[0013] 本发明的方法还包括定量至少一种迈克尔受体,其中测量硫醇-迈克尔加成物的量并与组分的迈克尔受体含量相关联,其中任何一种迈克尔受体杂质的量的定量极限是 10ppm 或更小,或其中任何一种迈克尔受体杂质的量的定量极限在 0.001 至 10ppm 的范围内。

[0014] 本发明的方法还包括定量下述组分之一或其任意组合中迈克尔受体的含量, :羟考酮、氢可酮、羟吗啡酮、氢吗啡酮、纳洛酮、纳曲酮或其可接受的盐,相关生物碱或其可接受的盐;其中测量硫醇-迈克尔加成物的量并将之与所述组分的迈克尔受体含量相关联,并且其中任何一种迈克尔受体杂质的量的定量极限是 10ppm 或更小,或 1ppm 或更小,或在 0.001 至 10ppm 的范围内。

[0015] 本发明的方法还包括定量羟考酮或其可接受盐的 14-羟可待因酮含量,其中 14-羟可待因酮的硫醇-迈克尔加成物之量被测量并与组分的 14-羟可待因酮含量相关联,并且其中 14-羟可待因酮杂质水平的定量极限是 10ppm 或更小,或 1ppm 或更小,或在 0.001 至 10ppm 的范围内。

[0016] 在本发明的方法中,所述感兴趣组分可以是水中溶解度随 pH 增加而降低的有机碱;并且其中在适当 pH 值的水溶液中利用适当的含巯基化合物处理所述感兴趣组分以便(与杂质迈克尔受体)形成可溶性硫醇-迈克尔加成物;并且其中随后通过提高 pH 到适当值使所述感兴趣组分从可溶性硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物的溶液中沉淀,由此从所述硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物中分离所述感兴趣的有机碱。

[0017] 在本发明的方法中,所述感兴趣组分可以是水中溶解度随 pH 降低而降低的有机酸;并且其中在适当 pH 值的水溶液中,利用适当的含巯基化合物处理所述感兴趣组分以便(与杂质迈克尔受体)形成可溶性硫醇-迈克尔加成物;并且其中通过随后降低 pH 到适当值使所述组分从可溶性硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物的溶液中沉淀,由此从所述硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物中分离所述感兴趣的有机酸。

[0018] 在本发明的方法中,可通过利用水和/或其它溶剂的选择性沉淀和/或萃取、和/

或通过选择性吸附到介质上而将所述感兴趣组分从硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物中分离,所述介质例如为但不限于离子交换树脂和/或其它固体载体,其中所含有固定化配体金属离子和/或固定化马来酰亚胺和/或固定化活性二硫化物和/或固定化抗体和/或固定化酶。

[0019] 本发明的另一种方法包括从组分中除去至少一种迈克尔受体和/或至少一种迈克尔受体水合物,所述组分为下述组分之一或其任意组合:可被生命有机体内化的组分、可与生命有机体相接触的组分、或可与适用于被生命有机体内化的物质相接触的组分,所述方法包括在通过将至少一种迈克尔受体水合物转化成迈克尔受体而足以除去所述至少一种迈克尔受体水合物的条件下,利用酸催化剂处理所述组分;然后在足以从所述组分中除去未反应含巯基化合物、至少一种最初存在于所述组分中的迈克尔受体、和由所述至少一种迈克尔水合物形成的迈克尔受体的条件下,利用适当的可溶性含巯基化合物处理所述组分;并且其中所述含巯基化合物根据其形成可溶性硫醇-迈克尔加成物的能力进行选择,所述可溶性硫醇-迈克尔加成物可以从所述组分中除去并且在需要时可以被定量以便确定所述组分中迈克尔受体水合物含量和迈克尔受体含量。在本发明的此方法或其它方法中,所述方法可包括制备含有羟考酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的8-羟基羟考酮(hydroxyoxycodone)或其盐的量小于100ppm、或小于10ppm、或小于5ppm。在本发明的此方法或其它方法中,所述方法可包括制备含有纳曲酮或其可接受盐的产物,所述产物含有的8-羟基纳曲酮(hydroxynaltrexone)或其盐的量小于100ppm、或小于10ppm、或小于5ppm。

[0020] 本发明还提供一系列产物,所述产物可根据本文所述方法进行制备、或者可以是基本上相似于或等同于可通过本发明方法制备的产物的那些产物。任何本文所述的产物或可由本文所述方法产生的产物都包括在本发明的范围内。

### 具体实施方式

[0021] 本发明涉及从含有可被生命有机体内化的成分的药物或其它组分中或者从含有可能与意欲被生命有机体内化的成分相接触的组分中除去迈克尔受体和其前体的方法,其中在足以除去迈克尔受体和硫醇-迈克尔加成物的条件下利用含巯基化合物处理所述组分。当下文提及方法时,应当理解可适用于本文所述的任何方法。

[0022] 本文所用的定义:

[0023] “迈克尔受体”意指 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和亲电体,例如但不限于 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和羰基衍生物或 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和腈。

[0024] 应当理解在定义迈克尔受体的情景中:“亲电体”意指能接受电子对;“ $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和亲电体”意指一类化合物,其中包括但不限于 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和羰基衍生物、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和腈、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和砜、或被强吸电子基团例如但不限于硝基取代的其它乙烯基衍生物;“ $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和羰基衍生物”意指一类化合物,其中包括但不限于 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和酮、醌或其衍生物、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和醛、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和羧酸衍生物,例如但不限于酯、酰胺、取代酰胺或马来酰亚胺或其衍生物。

[0025] 除了如在术语“硫醇官能化”的语境中表示硫醇部分或硫醇基团以外,“硫醇”或“含巯基化合物”意指含巯基的化合物。本领域一般技术人员知道“硫醇”是含硫化合物,一般指含硫有机化合物。

[0026] “硫醇-迈克尔加成物”意指含巯基化合物与迈克尔受体的加成反应形成的硫醚或硫醚混合物。

[0027] “巯基-硫醇-迈克尔加成物”意指当迈克尔受体与过量二硫醇或多硫醇（含有至少两个巯基的化合物）反应时形成的巯基-硫醚或巯基-硫醚混合物。

[0028] 在本发明的情景中，“迈克尔受体前体”意指在与其可能存在的环境一致的条件下可转化为迈克尔受体的任何物质（包括硫醇-迈克尔加成物或迈克尔受体水合物）。例如，在药剂或其它治疗剂的情景中，无论在施用给对象之前或之后，在药物组分或治疗组分的合成、形成、储存和 / 或使用期间，迈克尔受体前体是在药物组分或治疗组分可以存在的条件下可转化为迈克尔受体的物质。迈克尔受体水合物是迈克尔受体前体的一个实例。

[0029] “迈克尔受体水合物”意指将水与  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和亲电体例如但不限于  $\beta$ - 羟基酮的加成产物。

[0030] “加工组分”或“加工产物”意指已经过本发明方法处理的组分。

[0031] “HPLC”意指高效液相色谱。

[0032] “PPM”或“ppm”意指每百万重量份中的份数。

[0033] “允许速率”意指与制备有定价竞争力的加工产品所需制造周期一致的速率。

[0034] “适当的硫醇”或“适用于除去迈克尔受体和 / 或前体的硫醇”意指能有效除去迈克尔受体和硫醇-迈克尔加成物以便能制备有定价竞争力的加工产物的含巯基化合物。本文描述了选择适当含巯基化合物的考虑因素和方法。

[0035] 本文所用的“除去”或“去除”意指减少至少一种迈克尔受体和 / 或相应的硫醇-迈克尔加成物的量和 / 或含巯基化合物的量，或所述量的减少。在一组实施方案中，此类物质被除去至原来的五分之一、十分之一、二十分之一、四十分之一、六十分之一、百分之一、五百分之一或更少。在另一组实施方案中，除去包括从组分中以足以检测到此类物质的存在、浓度和 / 或量的量除去此类物质。

[0036] 当涉及操作时，本文所用的“分离”包括将一种或多种组分分成两个或更多个部分，其中某些成分在一个部分中富集而另一些成分在另外的部分中富集，包括从至少一个部分中基本上完全清除某些成分的情形。例如，当各成分在两相（例如，两种不混溶的液体，或固体沉淀和液相）中分配时，一种或多种成分的含量在一相中富集而在另一相中被清除。应当理解，被富集在一相中的组分仍可以存在于其它相中，虽然水平更低。

[0037] 本领域一般技术人员应当理解，“可被生命有机体内化的组分”包括但不限于食物、药品等。

[0038] 本领域一般技术人员应当理解，“可与适用于被生命有机体内化的物质相接触的组分”包括但不限于药物递送装置、食物包装、以及其它通过此类物质的制备、储存或使用而常规地或可能常规地与生命有机体内化的组分相接触的组分和 / 或物质。

[0039] “可与核酸反应的迈克尔受体（或亲电体）”包括能不利地与核酸相互作用的物质种类，例如可参与与核酸亲核体的潜在地有基因毒性的反应的物质种类。

[0040] 迈克尔受体与有机硫醇反应形成硫醇-迈克尔加成物是大量文献证明的反应（Chem. Commun. 2005, 669-671 以及其中引用的文献）。已显示该反应在水和有机溶剂中进行。酸性催化剂和碱性催化剂都已被用于促进硫醇-迈克尔加成物的形成和将副反应最小化。

[0041] 文献证明硫醇-迈克尔加成物的形成具有可逆性 (Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 2849-2855 ; Chem. Commun. 2005, 886-888), 提示利用硫醇试剂除去组分中迈克尔受体以制备其中所述迈克尔受体水平降至二十分之一或更低的产物是令人怀疑的。

[0042] 然而, 本发明 (包括所附实施例和权利要求) 的教导显示如何在一些实施方案中将迈克尔受体水平降低 20 倍以制备迈克尔受体水平低于 10ppm 或本文所述其它水平的加工产物; 此外, 本发明 (包括所附实施例和权利要求) 的教导还显示如何在 10ppm 或更低水平或在本文所述其它水平的定量极限下定量迈克尔受体水平。

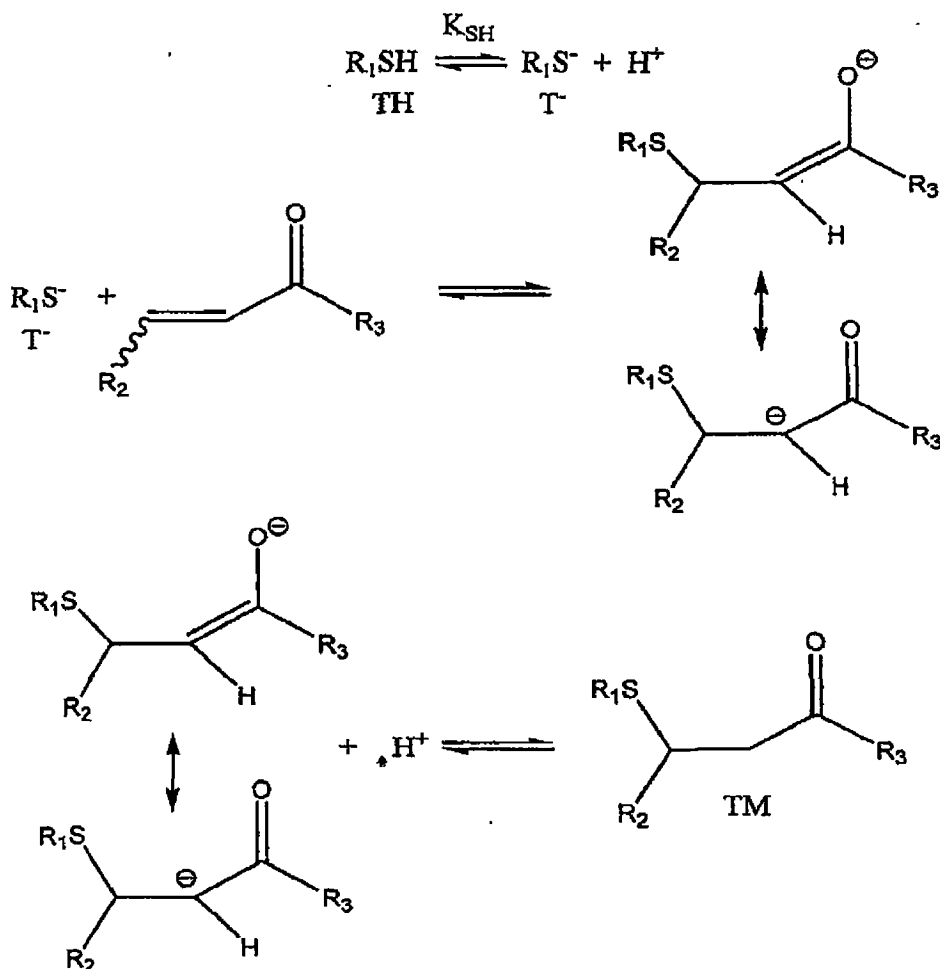
[0043] 公开的文献 (Bioorg. Med. Chem. 1999 7, 2849-2855 ; Chem. Commun. 2005, 886-888) 表明: 在水溶液中, 随着 pH 升高, 由于硫醇盐阴离子的形成增加, 硫醇与迈克尔受体的加成反应速度增加。因此, 在本发明观测到的形成硫醇-迈克尔加成物 (TM) 的假一级速率常数  $k_r$  应当随总硫醇浓度 ( $[T]_t = [TH] + [T^-]$ )、迈克尔受体浓度  $[M]$ 、以及氢离子浓度  $[H^+]$  而变化, 符合以下方程式:

$$[0044] \quad k_r = k_s [T]_t / (1 + [H^+] / K_{SH})$$

[0045] 其中  $k_s$  是硫醇盐阴离子 ( $T^-$ ) 与迈克尔受体 ( $M$ ) 反应的速率常数,  $K_{SH}$  是硫醇 ( $TH$ ) 的酸解离常数。

[0046] 根据微观可逆性定律, 硫醇-迈克尔加成物中硫醇盐阴离子的消除速率取决于以负碳离子存在的硫醇-迈克尔加成物的份数。因此, 可通过下述三步反应路径描述总反应的进行。

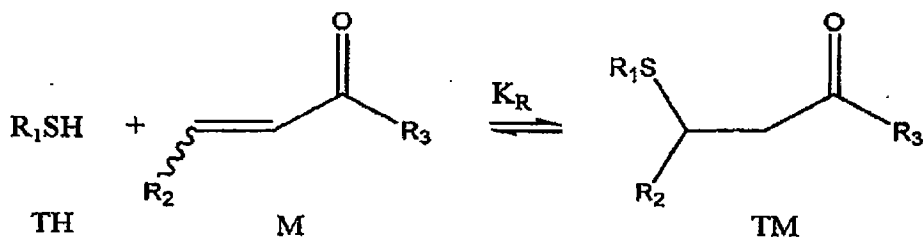
[0047]



[0048] 反应路径的第一步和第三步包括在热力学有利方向上呈现为扩散控制的质子转移反应,而第二步中加成物的形成和分解速率表现为总反应路径的速率决定步骤。当然,迈克尔受体与硫醇盐阴离子的加成反应的速率和平衡位置将自然反映所述硫醇盐阴离子和所述迈克尔受体的特性。这些理由说明了硫醇、迈克尔受体和硫醇-迈克尔化合物的平衡速率随 pH 增加而增加的结果。然而,平衡时加成物形成的程度随 pH 增加而降低的观察结果 (Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 2849-2855) 还没能定量地加以解释。

[0049] 从总反应的方程式:

[0050]



[0051] 以及总反应和巯基电离的平衡表达式:

$$[0052] \quad K_R = [TM]/[TH][M] \quad K_{SH} = [T^-][H]/[TH]$$

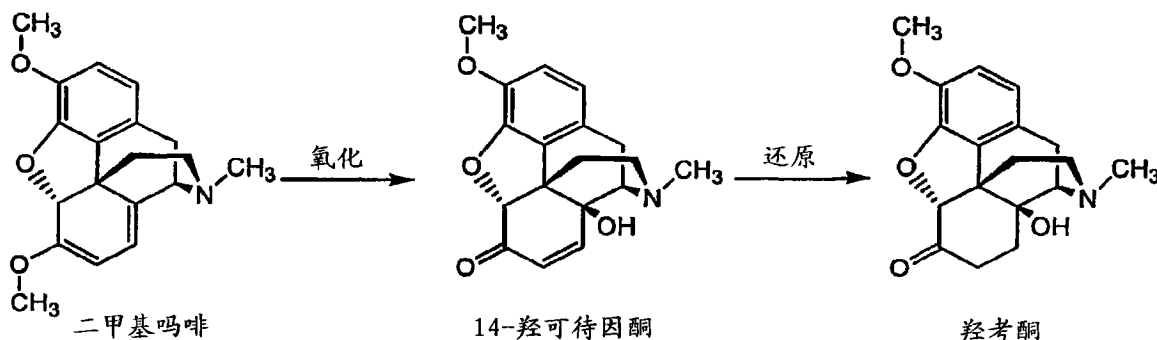
[0053] 得出

$$[0054] \quad [TM]/[M] = K_R [T^-] / (1 + K_{SH} / [H^+]).$$

[0055] 作为本发明的贡献,该表达式首次允许定量预测硫醇-迈克尔加成物 [TM] 和迈克尔受体 [M] 的平衡浓度比对氢离子浓度的依赖性。此表达式与本文所述  $K_R$  的表达式一起教导了氢离子浓度降低是怎样降低硫醇-迈克尔加成物形成程度和提高加成物形成速率的,并且使得有可能设计用于从羟考酮和其它组分中除去迈克尔受体的本发明方法。

[0056] 羟考酮是一种半合成阿片,通过下述方案将天然产物二甲基吗啡经氧化转化成 14-羟可待因酮而制得。

[0057]



[0058] 羟考酮前体 14-羟可待因酮是一种经常污染羟考酮制剂的迈克尔受体。本发明除去迈克尔受体的方法可用于除去羟考酮中的 14-羟可待因酮。所述方法包括利用硫醇处理羟考酮以便将 14-羟可待因酮转化成硫醇-迈克尔加成物。在本发明的一个实施方案中,在适当 pH 的水中进行此反应。选择 pH 以便同时得到适于制备有定价竞争力羟考酮加工产品的适度浓缩的均质羟考酮溶液和合理的反应速率。在本发明的某些实施方案中,为了在水中形成硫醇-迈克尔加成物,选择水溶性的硫醇以便形成能将迈克尔受体含量降低至小于 10ppm 的硫醇-迈克尔加成物。根据本发明,在其它的实施方案中,迈克尔受体的含量被降低至小于 2000、1000、500、200、100、50、25、10、5、2、1、0.5 或 0.25ppm。本发明还可将迈克

尔受体水平降低 20 倍以上,例如至少 40 倍、至少 60 倍、至少 80 倍、至少 100 倍、至少 500 倍、至少 1000 倍、或至少 2000 倍。在本发明的纯化羟考酮的一个应用中,在室温和 pH6 时利用 20mM 巯基乙酸钠和 2mM EDTA(用于抑制由痕量金属离子催化的硫醇氧化反应)处理 7.5%羟考酮溶液 2.8 小时。

[0059] 有关羟考酮溶解度按照下述关系式随氢离子浓度  $[H^+]$  增加而增加的知识,

[0060] 溶解羟考酮的总浓度 =  $[Oxy]_s + [Oxy H^+] = [Oxy]_s(1 + [H^+]/K)$ ,

[0061] 其中  $[Oxy]_s$  是羟考酮游离碱的溶解度,并且 K 是羟考酮共轭酸 ( $OxyH^+$ ) 的酸解离常数。基于上述公开的  $K_p$ 、硫醇浓度和氢离子浓度之间的关系以及对反应速率随温度而增加的理解,结合本文公开的内容,本领域技术人员能够有效地确定其它期望的反应条件。例如,可通过降低 pH 而在实际上更高的羟考酮浓度下进行均质反应以增加可得到的溶解羟考酮的量。为了补偿较低 pH 下较低的反应速率,本领域技术人员在本文所述因素的指导下,如果需要的话,可适当地增加硫醇的浓度、和 / 或温度、和 / 或反应时间。

[0062] 利用已知的分析方法,例如利用与监测流出流性质(例如吸光度、荧光、光散射、电导、折射率或质谱)的系统连接的高效液相色谱或气相色谱,本领域技术人员可在酸淬反应混合物中定量硫醇-迈克尔加成物的增加,并且由此将迈克尔受体转化为硫醇-迈克尔加成物的时间依赖性表征为硫醇结构、硫醇浓度、反应介质和温度的函数。例如,如果迈克尔受体在大于 10 倍摩尔量的硫醇存在下反应并且保持以硫醇盐阴离子存在的硫醇份数恒定(在水中,通过添加酸或碱维持恒定的 pH;在有机溶剂中,通过在反应期间添加有机酸或有机碱或其混合物维持恒定的 pH),本领域技术人员可确定形成硫醇-迈克尔加成物的假一级速率常数。因为所述的假一级速率常数与本文所述的硫醇盐阴离子浓度成正比同时又是硫醇结构和温度的函数,通过对少数反应的假一级速率常数的测量,能够有效地选择适当的硫醇、适当的硫醇浓度、适当的 pH(对于水中的反应)或碱(对于有机溶剂中的反应)、适当的时间和适当的温度以便得到可接受的硫醇-迈克尔加成物转化程度。含有 20mM 硫醇和 0.1 ~ 10%以硫醇盐阴离子存在的硫醇(通过适当调整 pH(对于在水中的反应)或添加适当的碱(对于在有机溶剂中的反应)得到)、以及 < 2mM 迈克尔受体的反应混合物,在存在或不存在所述组分的情况下,通常是筛选最佳反应条件的合适起点。

[0063] 在本发明的某些实施方案中,在形成硫醇-迈克尔加成物之后,可以从硫醇-迈克尔加成物和 / 或过量硫醇中除去所述组分。该大量的去除可以是例如改变组分使其适于人类消费或其它临床用途,或者其他量的去除(例如更小量)可以用于检测 / 测定组分中迈克尔受体的存在和 / 或量。反应中所用的适当硫醇包括但不限于本文(包括所附权利要求)所述的那些。如下述段落的讨论以及实施例和所附权利要求中的说明,硫醇的适当性取决于所述组分和所述硫醇的应用情形。

[0064] 适当的硫醇是可以有效地从所述组分中除去并且能形成可以有效地从所述组分中除去的硫醇-迈克尔加成物、以及形成可在除去所述组分中的硫醇-迈克尔加成物所用的条件下很少或不再转化回迈克尔受体的硫醇-迈克尔加成物、并且在内化之后基本上不再转化回迈克尔受体(在不能充分地除去所述组分中的所述硫醇-迈克尔加成物的情形下)。在所述硫醇-迈克尔加成物保留在加工组分中的情形下,需要证明:在所述加工组分的货架寿命期间,对于有能力检查食物或药物或医疗设备安全性的个人和机构而言,不必担心由留在加工组分中的硫醇-迈克尔加成物构成的硫醇-迈克尔加成物的量。

[0065] 可通过测量硫醇-迈克尔加成物浓度的时间依赖性降低来评价硫醇-迈克尔加成物在具体介质(例如被考虑用于从硫醇-迈克尔加成物中分离所述组分的介质、或内化之后硫醇-迈克尔加成物可能接触的生理流体)中的稳定性或储存期间的稳定性。

[0066] 在本发明的某些实施方案中,制备迈克尔受体水平小于 100ppm、10ppm、5ppm、2ppm、1ppm、0.5ppm、0.1ppm 或 0.01ppm 以及硫醇-迈克尔加成物水平小于 500ppm、100ppm、10ppm、5ppm、2ppm、1ppm、0.5ppm、0.1ppm 或 0.01ppm 的加工产物。

[0067] 本发明的实施方案包括以下方法:其中选择可溶性的含巯基化合物以便形成可有效地从组分中除去的可溶性硫醇-迈克尔加成物、以及便于定量组分中低水平的迈克尔受体杂质,其中由于所述组分的干扰,所述迈克尔受体杂质难于用其他方法直接测量。因此,在本发明的某些实施方案中,通过利用适当的含巯基化合物处理组分、从所述组分和/或含巯基化合物中除去硫醇-迈克尔加成物以便能够定量所述硫醇-迈克尔加成物、并将硫醇-迈克尔加成物的量与所述组分中的迈克尔受体相相关联,可以测定组分中迈克尔受体含量。本领域技术人员可利用已知的分析方法,例如利用与监测流出流性质(例如流出流的吸光度、荧光、光散射、电导、折射率或质谱)系统连接的高效液相色谱或气象色谱来定量硫醇-迈克尔加成物。因此,本发明的某些实施方案以小于 100ppm、10ppm、5ppm、1ppm、0.1ppm 和 0.01ppm 的定量极限来定量所述加工组分和未加工组分中的迈克尔受体的水平。

[0068] 在本发明的实施方案中,其中在形成硫醇加成物之后,将所述硫醇-迈克尔结合物和/或过量硫醇从所述组分中除去,选择硫醇以便使所述硫醇-迈克尔加成物具有不同于所述组分的特性。这些特性包括但不限于在适当 pH 值下在有机溶剂或水/有机溶剂混合物、或水中的不同溶解度、和/或对离子交换树脂和/或其它固体介质(包括例如含固定化二硫化物的化合物、含固定化马来酰亚胺的化合物)的不同亲合力、和/或对固定化抗体或其片段、或固定化酶或其片段的不同亲合力。

[0069] 下面的描述将很好地阐明如何根据本发明的教导选择适当的含巯基化合物。在用于除去羟考酮中 14-羟可待因酮的方法的一个实施方案中,当硫醇-迈克尔加成物在约 pH6 下形成之后,将反应混合物的 pH 升高以便从水溶液中沉淀和/或萃取羟考酮游离碱并且使大多数所述硫醇-迈克尔加成物和过量巯基乙酸钠保留在水溶液中。已经提及的羟考酮在水中溶解度的 pH 依赖性的表达式表明碱性 pH 有利于羟考酮游离碱的有效沉淀和/或萃取。本发明教导中公开的关系式  $[TM]/[M] = K_r [T]_f / (1 + K_{SH} / [H^+])$  表明当使用巯基乙酸钠 ( $pK_{SH} 10.3$ ) 时,将 pH 升高到 9 将导致少量的硫醇-迈克尔加成物(在 pH ~ 6 下形成,其时羟考酮是可溶的)转化回 14-羟可待因酮。利用  $pK_{SH} 10.3$  的硫醇,将 pH 从 6 升高到 9,  $[TM]/[M]$  平衡比将仅仅降低 5%。因此,在 pH6 非常有利于在特定硫醇浓度下形成硫醇-加成物的条件下, pH 从 6 升高到 9,迈克尔受体的含量将仅仅增加 5%。然而,利用  $pK 9$  的硫醇将导致  $[TM]/[M]$  平衡比在 pH 从 6 升高到 9 时降低两倍。当然,降低用于沉淀或萃取羟考酮的 pH 将降低逆反应程度,但由于 pH 降低将增加羟考酮在水中的溶解度,回收羟考酮产物也将变得更加困难。在本发明的实施例中举例说明了利用更低 pH 沉淀和/或萃取羟考酮的方法和/或利用更低 pK 的硫醇的方法。令人感兴趣的是,尽管 5-巯基-2-硝基-苯甲酸 ( $pK 4.8$ ) 不易兼容于从来自含有由 5-巯基-2-硝基-苯甲酸形成的硫醇-迈克尔加成物的碱溶液中沉淀和/或萃取羟考酮的方法,但是此含巯基化合物可用于利用其它手段从硫醇-迈克尔加成物和未反应硫醇中除去迈克尔受体的方法(尤其是涉及组分中迈克尔

受体杂质定量的方法)。

[0070] 因此,在本发明的某些实施方案中,利用含巯基化合物处理之后,通过但不限于下述操作之一或其任意组合从硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物中基本上除去所述组分:通过调节溶液 pH 引起的从水溶液中的选择性沉淀;当适当时通过调节水溶液的 pH(利于萃取)、硫醇含量(抑制硫醇-迈克尔受体分解)以及盐含量(利于相分离)从水溶液选择性地萃取到与水不互溶的溶剂中;通过添加一种或多种与水互溶的有机溶剂选择性地从水溶液中沉淀;在适当 pH 和硫醇含量下选择性地从与水不互溶的有机溶剂中萃取到水溶液中;通过添加水溶液选择性地从与水互溶的有机溶剂中沉淀;通过添加第二种有机溶剂或有机溶剂混合物选择性地从有机溶剂或有机溶剂混合物中沉淀;高效液相色谱;或选择性吸附到包含但不限于下述固体介质之一或其任意组合的固体介质上或与之反应:离子交换树脂、利用马来酰亚胺部分官能化的固体介质、利用活性二硫化物官能化的固体介质、利用整合金属离子官能化的固体介质、或含有固定化蛋白质的固体介质。

[0071] 在本发明的其它实施方案中,根据所述组分和迈克尔受体的性质,利用含巯基化合物形成可有效地从所述组分中除去的硫醇-迈克尔加成物,所述含巯基化合物例如为但不限于巯基乙酸、2-巯基乙磺酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、高半胱氨酸、巯基琥珀酸、巯基甘油、2-氨基乙硫醇、二硫醇(例如但不限于乙二硫醇、二硫苏糖醇)、还原的硫辛酸(当希望形成巯基-硫醇-迈克尔加成物时)、或固定在固体载体上的含巯基化合物。含有固定化硫醇的固体载体通常用于整合重金属离子并可商业购得。还可通过含有固定化 N-羟基琥珀酰亚胺酯或对硝基苯酯或其它胺活性酯与氨基硫醇(例如但不限于谷胱甘肽、2-氨基乙硫醇、或半胱氨酸)反应,或通过利用有机卤化物或马来酰亚胺官能化的固体介质与二硫醇(例如但不限于乙二硫醇或还原态的硫辛酸)反应得到硫醇官能化的固体介质。

[0072] 应当着重指出的是,最适用于某方法的硫醇的选择可能需要该方法详细的成本分析,所述成本分析应当考虑到某些可溶性含巯基化合物可能允许更短的制造周期、可能成本更低、以及可能易于测定迈克尔受体水平,而且某些硫醇官能化的固体介质可能更方便地除去硫醇-迈克尔加成物。

[0073] 本发明的某些实施方案包括从由水中溶解度随 pH 增加而降低的有机碱例如羟考酮组成的组分中除去迈克尔受体。这样的实施方案可包括利用适当的可溶性含巯基化合物(例如但不限于巯基乙酸钠、半胱氨酸盐酸盐、2-巯基乙基磺酸钠、5-巯基-2-硝基-苯甲酸、或 N-丹磺酰半胱氨酸)处理所述组分,以及(在适当 pH 的水溶液中)形成可溶性硫醇-迈克尔加成物。通过将 pH 升高到适当值可以从可溶性硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物的溶液中沉淀所述的有机碱。此外,可能还需要单元操作以便从沉淀的组分中除去共沉淀的硫醇-迈克尔加成物。

[0074] 本发明的其它实施方案包括从水中溶解度随 pH 降低而降低的组分(例如有机酸)中除去迈克尔受体。这样的实施方案可以包括利用适当的可溶性含巯基化合物(例如但不限于半胱氨酸盐酸盐、2-巯基乙基磺酸钠、或 2-氨基乙硫醇)处理所述组分,以及(在适当 pH 的水溶液中)形成可溶性硫醇-迈克尔加成物。通过将 pH 降低到适当值可以从可溶性硫醇-迈克尔加成物和过量含巯基化合物的溶液中沉淀所述有机组分。此外,可能还需要单元操作以便从沉淀的组分中除去共沉淀的硫醇-迈克尔加成物。

[0075] 本发明的其它实施方案可包括除去杂质迈克尔受体,其中因为所述组分在水中的

溶解度低,所以希望在非水溶剂中进行反应。这样的情况可以包括利用适当的硫醇处理所述组分以便从所述组分中除去所述硫醇和 / 或硫醇 - 迈克尔加成物。硫醇 (例如但不限于 2- 氨基乙硫醇) 可以是适用于本发明这些实施方案的硫醇,由于 2- 氨基乙硫醇可形成可萃取到酸水溶液中的硫醇 - 迈克尔加成物,因此可从水不溶性的所述组分中除去所述硫醇 - 迈克尔加成物。此外,可能还需要单元操作以便从沉淀组分中除去共沉淀的硫醇 - 迈克尔加成物。

[0076] 本发明的又其它实施方案包括检测和除去迈克尔受体水合物。在迈克尔受体前体显著地转化成迈克尔受体的情况下,可能期望从组分中除去所述迈克尔受体前体。本发明的某些实施方案包括通过利用酸性催化剂处理使迈克尔受体水合物转化成迈克尔受体,以及随后利用本发明教导将所述迈克尔受体转化成硫醇 - 迈克尔加成物以便除去和 / 或定量所述迈克尔受体。

[0077] 所附实施例举例说明了将本发明方法用于降低羟考酮以及相关组分中迈克尔受体水平和 / 或用于定量在羟考酮以及相关组分中的迈克尔受体水平的应用。

[0078] 所附实施例与本发明的其它教导一起 (包括所附权利要求) 使本领域技术人员能够将本发明实施方案应用于未被实施例具体举例说明的情况。本发明的这些另外实施方案包括但不限于以下情况:

[0079] 迈克尔受体和所述组分选自但不限于一个或多个下述实例:

[0080] i. 迈克尔受体是丙烯晴;以及所述组分通过利用丙烯晴的方法制备并且选自但不限于一种或多种下述组分:苯乙烯 - 丙烯晴、以及丙烯晴 - 丁二烯 - 苯乙烯、以及丙烯晴 - 甲基丙烯酸甲酯聚合物。

[0081] ii. 迈克尔受体是丙烯酰胺;以及所述组分通过利用丙烯酰胺的方法制备并且选自但不限于一种或多种下述组分:聚丙烯酰胺及其共聚物。

[0082] iii. 迈克尔受体是丙烯酸甲酯;以及所述组分通过利用丙烯酸甲酯的方法制备并且选自但不限于一种或多种下述组分:维生素 B1、聚(丙烯酸甲酯)及其共聚物。

[0083] iv. 迈克尔受体是丙烯酸乙酯;以及所述组分通过利用丙烯酸乙酯的方法制备并且选自但不限于一种或多种下述组分:聚(丙烯酸乙酯)及其共聚物。

[0084] v. 迈克尔受体是甲基丙烯酸甲酯;以及所述组分通过利用甲基丙烯酸甲酯的方法制备并且选自但不限于一种或多种下述组分:聚(甲基丙烯酸甲酯)及其共聚物。

[0085] vi. 迈克尔受体是丙烯酸 -2- 乙基己酯;以及所述组分通过利用丙烯酸 -2- 乙基己酯的方法制备并且选自但不限于一种或多种下述组分:聚(丙烯酸 -2- 乙基己酯)及其共聚物。

[0086] vii. 迈克尔受体是巴豆醛;以及所述组分通过利用巴豆醛的方法制备并且选自但不限于一种或多种下述组分:2- 乙基己醇、丁醛和喹哪啶。

[0087] viii. 迈克尔受体是甲基乙烯基酮;以及所述组分通过利用甲基乙烯基酮的方法制备并且可选自但不限于维生素 A。

[0088] ix. 迈克尔受体是丙烯醛;以及所述组分是香烟、雪茄或烟斗烟。

[0089] 除非另外指出,下述实施例中的所有操作在室温下进行。

[0090] 实施例 1A

[0091] 从羟考酮组分中除去 14- 羟可待因酮

[0092] 该实施例描述了利用 20mM 巯基乙酸钠在 pH6 处理含有大于 300ppm 但是小于 1000ppm 的 14-羟可待因酮的羟考酮游离碱组分,以便(与其它操作一起)实现 14-羟可待因酮和硫醇-迈克尔加成物的去除,以及制备含有小于 10ppm 的 14-羟可待因酮的加工产物。

[0093] 将含有大于 300ppm 14-羟可待因酮的羟考酮样品溶解在 pH6.0 的水中以制备 7.5% 溶液 (75mg/mL),其中利用 4M HCl 实现羟考酮的中和以及在 pH6 下的溶解。加入足量的固体 EDTA 和固体巯基乙酸钠使得这些成分在反应混合物中的浓度分别为 2mM EDTA 和 20mM 巯基乙酸钠。室温下将 pH 维持在 pH6.0 下 2.8 小时,然后将反应混合物升高到 pH9 以便从含有巯基乙酸盐-迈克尔加成物和过量巯基乙酸盐的溶液中沉淀羟考酮。沉淀的羟考酮用 pH9 的 0.05M 碳酸氢钠缓冲液洗涤,然后溶解在乙酸乙酯中。用 pH9 的 0.05M 碳酸氢钠缓冲液萃取羟考酮的乙酸乙酯溶液,减压下除去乙酸乙酯得到含有小于 10ppm 14-羟可待因酮的羟考酮。

[0094] 实施例 1B

[0095] 利用 20mM 巯基乙酸钠从羟考酮组分中除去 14-羟可待因酮

[0096] 该实施例描述了利用 20mM 巯基乙酸钠处理含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮游离碱组分,以便(与其它操作一起)将组分中的 14-羟可待因酮含量降低 800 倍以上,以及制备 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸的总量小于 5ppm 的加工产物。

[0097] 将含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮 (5.0g, 15.9mmol) 溶解在 50mL 0.33N HCl 中。搅拌下添加 1M 碳酸钠将所得溶液的 pH 升高到 6.1 ~ 6.2。待添加碳酸钠期间沉淀的所有羟考酮溶解后,加入巯基乙酸钠作为含巯基化合物 (0.114g, 1mmol)。搅拌所得的溶液 1 小时,然后在强烈搅拌下向溶液中加入固体碳酸钠 (1.5g, 14.2mmol)。约 6 分钟后(溶液的 pH 增加到约 7.6),将羟考酮悬浮液萃取到乙酸乙酯 (250mL) 中,强烈搅拌乙酸乙酯萃取物和 50mL 的 20mM 巯基乙酸钠水溶液 20 分钟。分离巯基乙酸钠洗液后,用 50mL 水洗涤羟考酮的乙酸乙酯溶液,与 50mL 0.33N HCl 一起搅拌 30 分钟以将羟考酮萃取到酸水溶液中。分离水层并用 1M 碳酸钠 (约 22mL) 将 pH 升高到 9.1 ~ 9.3 以沉淀羟考酮游离碱。收集沉淀,用 25mL 水洗涤,并在干燥器中减压干燥得到 4.7g (94% 收率) 羟考酮产物,其中 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸 (硫醇-迈克尔加成物) 的总量小于 5ppm (见实施例 2 ~ 3)。

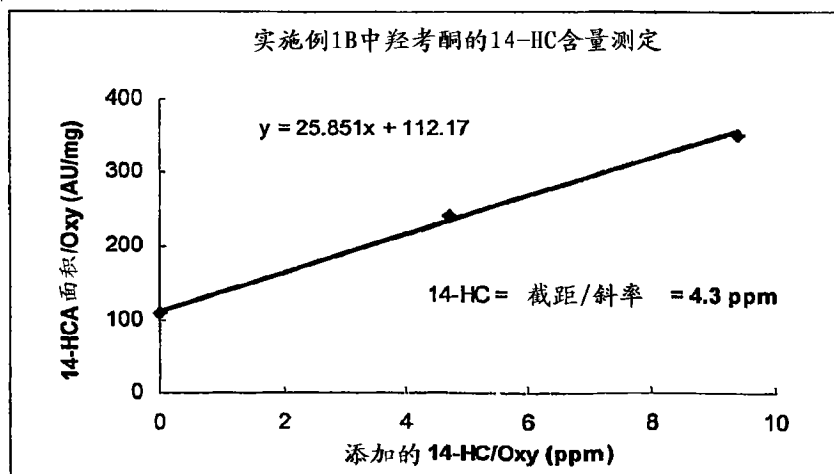
[0098] 实施例 2

[0099] 实施例 1B 的羟考酮产物中 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸总量的测定

[0100] 将实施例 1B 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在 0.2N HCl (10mL) 中。搅拌下加入乙二胺四乙酸 (EDTA) (0.005g, 0.017mmol) 并利用 1M 碳酸钠将溶液的 pH 升高到 6.1 ~ 6.2 以溶解所有沉淀的羟考酮。向均匀反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.025g, 0.22mmol)。在分开的尖峰试验中,在添加巯基乙酸钠之前引入已知量的 14-羟可待因酮。1.5 小时后,用 1M 碳酸钠 (约 1.6mL) 将溶液的 pH 升高到 8.2 ~ 8.4,用二氯甲烷 (2×15mL) 将悬液萃取到 30mL 分液漏斗中。分离水层并用 1NHCl (1.7mL) 酸化至 pH2.6 ~ 3.6。在 30 ~ 40°C 下,将水溶液 (15 ~ 16mL) 的预定体积的等份 (2mL) 在旋转蒸发仪上减压蒸干并将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (200 μL) 中。通过 HPLC 分析溶液的等份,其中用 280nm 下的吸光

度定量流出液中的分析物。如下图所示,根据每毫克被分析羟考酮中的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮的量 (ppm,即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮微克数)的图计算的 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸的总量是 4.3ppm。

[0101]



[0102] 纵坐标表示的是相对于硫醇-迈克尔加成物 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 重量与被分析羟考酮重量的比值 (ppm)。

[0103] 实施例 3

[0104] 实施例 1B 中羟考酮产物的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸的含量测定

[0105] 将实施例 1B 的羟考酮产物 (0.51g, 1.6mmol) 溶解在二氯甲烷 (3mL) 中并用水 (3mL) 萃取溶液。含水萃取物的等份 (1mL) 用 1N HCl (10 μL) 酸化并在 30 ~ 40°C 下,在旋转蒸发器上减压蒸干,将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (200 μL) 中,并通过 HPLC 分析所述溶液的等份,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。样品中 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸的含量等于或小于 0.1ppm。

[0106] 实施例 4

[0107] 实施例 1B 中羟考酮产物的 14-羟可待因酮的含量测定

[0108] 从实施例 2 中测定的 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸的总量中减去实施例 3 中测定的羟考酮产物中的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸含量来确定 14-羟可待因酮的含量。因此,实施例 1 中羟考酮产物中的 14-羟可待因酮含量是 ≤ 4.3ppm。

[0109] 实施例 5

[0110] 利用 20mM 的 2-巯基乙磺酸钠除去羟考酮组分中的 14-羟可待因酮

[0111] 该实施例描述了利用 20mM 的 2-巯基乙磺酸钠处理含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮游离碱组分,以便 (与其它操作一起) 实现将所述组分中 14-羟可待因酮的含量降低 300 倍以上,以及制备其中 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙磺酸的总量小于 15ppm 的加工产物。

[0112] 将含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮 (5.0g, 15.9mmol) 溶解在 50mL 0.33N HCl 中。搅拌下添加 1M 碳酸钠将所得溶液的 pH 升高到 6.1 ~ 6.2。待添加碳酸钠期间沉淀的所有羟考酮溶解后,加入 2-巯基乙磺酸钠 (0.165g, 1mmol), 所得溶液搅拌 1 小时,然后在强烈搅拌下向溶液中加入固体碳酸钠 (1.5g, 14.2mmol)。约 6 分钟后 (溶液的 pH 增加

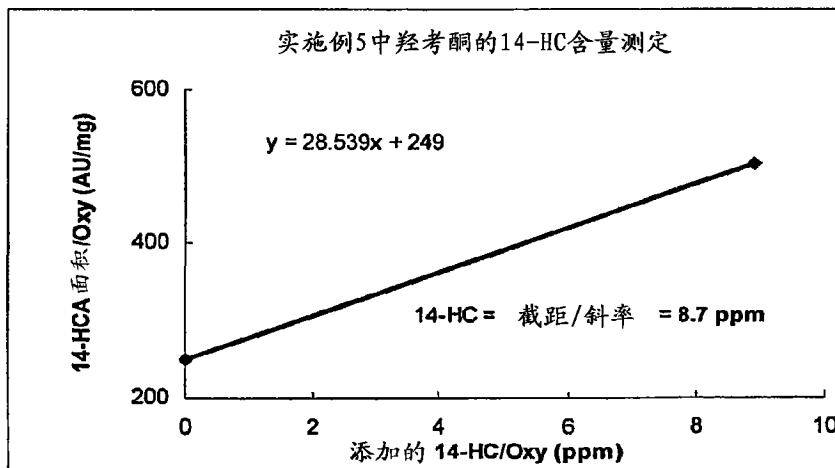
到约 7.6), 将羟考酮悬液萃取到乙酸乙酯 (250mL) 中, 强烈搅拌乙酸乙酯萃取物和 50mL 的 20mM 2- 巯基乙磺酸钠水溶液 20 分钟。除去 2- 巯基乙磺酸钠洗液后, 羟考酮的乙酸乙酯溶液用 50mL 水洗涤, 并与 50mL 0.33N HCl 一起搅拌 10 分钟以将羟考酮萃取到酸水溶液中。分离水层并用 1M 碳酸钠 (约 22mL) 将 pH 升高到 9.2 ~ 9.4 以沉淀羟考酮游离碱。收集沉淀, 用 25mL 水洗涤, 并在干燥器中减压干燥得到 4.7g (94% 收率) 羟考酮产物, 其中 14- 羟可待因酮和 2-( 羟考酮 -8- 硫烷基) - 乙磺酸的总量小于 15ppm (见实施例 6 ~ 7)。

#### [0113] 实施例 6

[0114] 实施例 5 中羟考酮产物的 14- 羟可待因酮的含量测定

[0115] 将实施例 5 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在 0.2N HCl (10mL) 中。搅拌下加入 EDTA (0.005g, 0.017mmol) 并利用 1M 碳酸钠将溶液的 pH 升高到 6.1 ~ 6.2 以溶解所有的沉淀羟考酮。向均匀反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.025g, 0.22mmol)。在分开的尖峰试验中, 在添加巯基乙酸钠之前引入已知量的 14- 羟可待因酮。1.5 小时后, 用 1M 碳酸钠 (约 1.6mL) 将溶液的 pH 升高到 8.2 ~ 8.4 并用二氯甲烷 (2 × 15mL) 将悬液萃取到 30mL 分液漏斗中。分离水层并用 1N HCl (1.7mL) 酸化至 pH 2.6 ~ 3.6。在 30 ~ 40°C 下, 将水溶液 (15 ~ 16mL) 的预定体积的等份 (2mL) 在旋转蒸发仪上减压蒸干并将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (200 μL) 中。通过 HPLC 分析所述溶液的等份, 其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下图所示, 根据每毫克被分析羟考酮中的 2-( 羟考酮 -8- 硫烷基) - 乙酸峰下的面积对添加的 14- 羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14- 羟可待因酮微克数) 的图测定的 14- 羟可待因酮的量是 8.7ppm。对照试验表明: 在利用巯基乙酸钠的分析测定期间, 包含在该实施例分析物 (2-( 羟考酮 -8- 硫烷基) - 乙磺酸) 中的硫醇 - 迈克尔加成物和包含在本发明其它实施例分析物中的硫醇 - 迈克尔加成物向相应的 2-( 羟考酮 -8- 硫烷基) - 乙酸硫醇 - 迈克尔加成物的转化是可以忽略的 (< 15%)。

[0116]



[0117] 纵坐标表示的是相对于硫醇 - 迈克尔加成物 2-( 羟考酮 -8- 硫烷基) - 乙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU) / mg)。横坐标表示的是尖峰 14- 羟可待因酮 (14-HC) 重量与被分析羟考酮重量的比值 (ppm)。

#### [0118] 实施例 7

[0119] 实施例 5 中羟考酮产物的 2-( 羟考酮 -8- 硫烷基) - 乙磺酸的含量测定

[0120] 将实施例 5 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在二氯甲烷 (3mL) 中并用水 (3mL)

萃取溶液 1 次。含水萃取物的等份 (1mL) 用 1N HCl (10  $\mu$  L) 酸化,并在 30 ~ 40 $^{\circ}$ C 下,在旋转蒸发仪上减压蒸干。将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (200  $\mu$  L) 中并通过 HPLC 分析样品,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。由此测定实施例 5 中制备的羟考酮产物中 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙磺酸的含量是 1.3ppm。

[0121] 实施例 8

[0122] 利用 40mM 的 L-半胱氨酸除去羟考酮组分中的 14-羟可待因酮

[0123] 该实施例描述了利用 40mM 的 L-半胱氨酸盐酸盐处理含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮游离碱组分以便(与其它操作一起)实现将组分中 14-羟可待因酮含量降低 500 倍以上,并制备了其中 14-羟可待因酮和 2-(R)-氨基-3-(羟考酮-8-硫烷基)-丙酸的总量小于 10ppm 的产物。

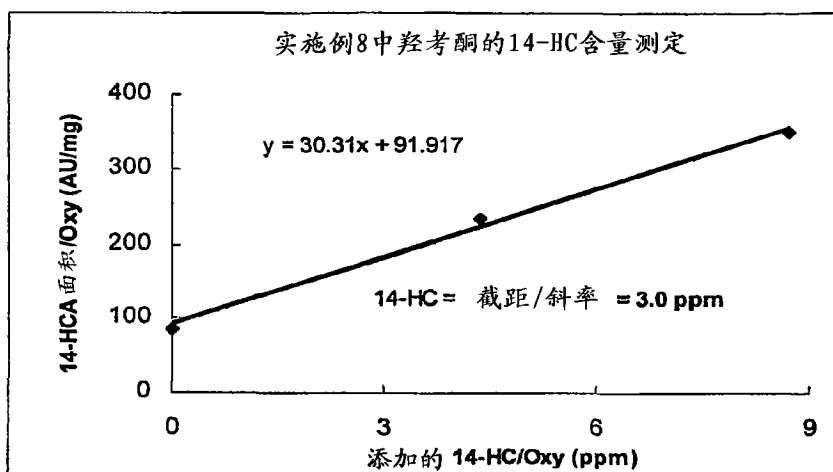
[0124] 将含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮 (5.0g, 15.9mmol) 和作为含巯基化合物的 L-半胱氨酸盐酸盐水合物 (0.352g, 2mmol) 溶解在 50mL 0.33N HCl 中。搅拌下添加 1M 碳酸钠将所得溶液的 pH 升高到 6.0 ~ 6.1 以溶解所有的沉淀羟考酮。所得溶液搅拌 1 小时,然后在强烈搅拌下向溶液中加入固体碳酸钠 (1.6g, 15.1mmol)。约 7 分钟后(溶液的 pH 增加到约 7.6),将羟考酮悬液萃取到乙酸乙酯 (250mL) 中,强烈搅拌乙酸乙酯萃取物和 50mL 的 40mM L-半胱氨酸水溶液 (pH8.0) 45 分钟。除去 L-半胱氨酸洗液后,用 50mL 水洗涤羟考酮的乙酸乙酯溶液并与 50mL 0.33N HCl 一起搅拌 10 分钟以将羟考酮萃取到酸水溶液中。分离水层并用 1M 碳酸钠 (约 22mL) 将 pH 升高到 9.1 ~ 9.3 以沉淀羟考酮游离碱。收集沉淀,用 25mL 水洗涤,并在干燥器中减压干燥得到 4.65g (93% 收率) 羟考酮产物,其中 14-羟可待因酮和 2-(R)-氨基-3-(羟考酮-8-硫烷基)-丙酸(硫醇-迈克尔加成物)的总量小于 5ppm (见实施例 9 ~ 10)。

[0125] 实施例 9

[0126] 实施例 8 中羟考酮产物的 14-羟可待因酮的含量测定

[0127] 将实施例 8 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在 0.2N HCl (10mL) 中。搅拌下加入 EDTA (0.005g, 0.017mmol) 并利用 1M 碳酸钠将溶液的 pH 升高到 6.0 ~ 6.3 以溶解所有的沉淀羟考酮。向均匀反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.025g, 0.22mmol)。在分开的尖峰试验中,在添加巯基乙酸钠之前引入已知量的 14-羟可待因酮。1 小时后,用 1M 碳酸钠 (约 1.4 ~ 1.5mL) 将溶液的 pH 升高到 8.1 ~ 8.6 并用二氯甲烷 (2 $\times$ 15mL) 将悬液萃取到 30mL 分液漏斗中。分离水层并用 1N HCl (1.5 ~ 1.7mL) 酸化至 pH3.2 ~ 3.8。在 30 ~ 40 $^{\circ}$ C 下,将水溶液 (14mL) 的预定体积的等份 (2mL) 在旋转蒸发仪上减压蒸干并将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (400  $\mu$  L) 中。通过 HPLC 分析所述溶液的等份,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下图所示,根据每毫克被分析羟考酮中的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮的微克数) 的图测定的样品中 14-羟可待因酮的量为 3.0ppm。

[0128]



[0129] 纵坐标表示的是相对于硫醇-迈克尔加成物 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 重量与被分析羟考酮重量的比值 (ppm)。

[0130] 实施例 10

[0131] 实施例 8 中羟考酮产物的 2-(R)-氨基-3-(羟考酮-8-硫烷基)-丙酸含量测定

[0132] 将实施例 8 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在二氯甲烷 (3mL) 中并用水 (3mL) 萃取溶液 1 次。将含水萃取物的等份 (1mL) 用 1N HCl (10  $\mu$ L) 酸化并在 30 ~ 40 $^{\circ}$ C 下, 在旋转蒸发仪上减压蒸干。将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸/水 (200  $\mu$ L) 中并通过 HPLC 分析样品, 其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。由此测定的实施例 8 中制备的羟考酮产物中 2-(R)-氨基-3-(羟考酮-8-硫烷基)-丙酸的含量是 1.6ppm。

[0133] 实施例 11

[0134] 利用硫醇官能化的硅胶从羟考酮组分中去除 14-羟可待因酮

[0135] 该实施例描述了利用可商业购得的硫醇官能化的硅胶 (其中 3-巯基丙醇部分已共价键地结合到硅胶上) 处理含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮游离碱组分以便 (与其它操作一起) 实现将组分中的 14-羟可待因酮含量降低 500 倍以上, 并制备其中 14-羟可待因酮含量小于 5ppm 的产物。

[0136] 将含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮 (2.0g, 6.3mmol) 溶解在 80mL 0.08N HCl 中。搅拌下添加 2N 氢氧化钠将所得溶液的 pH 升高到 7.0 ~ 7.05。待添加氢氧化钠期间沉淀的所有羟考酮溶解后, 加入硫醇官能化的硅胶 (1g, 负载 1.44mmol/g) 用作含巯基化合物 (1g, 负载 1.44mmol/g)。所得溶液搅拌 17.5 小时, 然后过滤。用 1M 碳酸钠 (约 7mL) 将水层 pH 升高到 9.2 以沉淀羟考酮游离碱。收集沉淀, 用 10mL 水洗涤, 并在干燥器中减压干燥得到 1.89g (94.5% 收率) 羟考酮产物, 其中 14-羟可待因酮含量小于 5ppm (见实施例 12)。

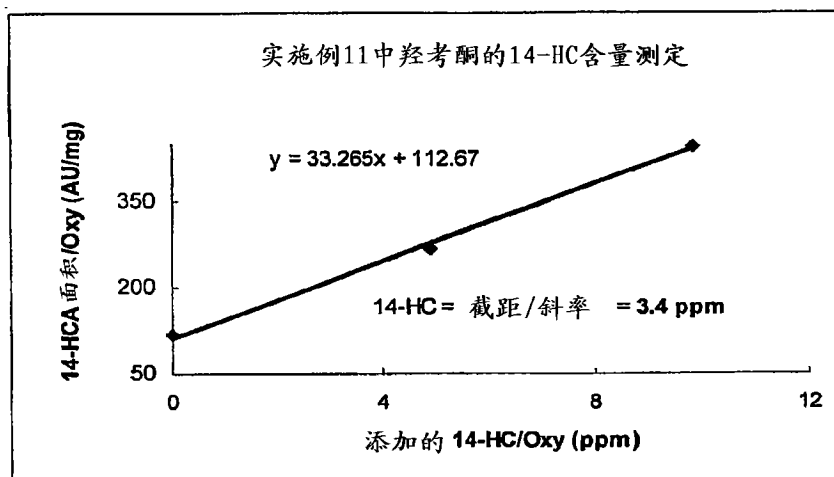
[0137] 实施例 12

[0138] 实施例 11 中羟考酮产物的 14-羟可待因酮的含量测定

[0139] 将实施例 11 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在 0.2N HCl (10mL) 中。搅拌下加入 EDTA (0.005g, 0.017mmol) 并利用 1M 碳酸钠将溶液的 pH 升高到 6.0 ~ 6.2 以溶解所有的沉淀羟考酮。向均匀反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.025g, 0.22mmol)。在分别的尖

峰试验中,在添加巯基乙酸钠之前引入已知量的 14- 羟可待因酮。1 小时后,用 1M 碳酸钠 (约 1.5 ~ 1.6mL) 将溶液的 pH 升高到 8.0 ~ 8.3 并用二氯甲烷 (2×15mL) 将悬液萃取到 30mL 分液漏斗中。分离水层并用 1N HCl (1.6 ~ 1.7mL) 酸化至 pH2.5 ~ 3.4。在 30 ~ 40°C 下,在旋转蒸发仪上将水溶液 (15mL) 的预定体积的等份 (2mL) 减压蒸干并将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (400 μ L) 中。通过 HPLC 分析所述溶液的等份,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下图所示,根据每毫克被分析羟考酮中的 2-( 羟考酮 -8- 硫烷基)- 乙酸峰下的面积对添加的 14- 羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14- 羟可待因酮微克数) 的图测定的样品中 14- 羟可待因酮的含量是 3.4ppm。

[0140]



[0141] 纵坐标表示的是相对于硫醇 - 迈克尔加成物 2-( 羟考酮 -8- 硫烷基)- 乙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14- 羟可待因酮 (14-HC) 的重量和被分析羟考酮的重量之间的比值 (ppm)。

[0142] 实施例 13

[0143] 利用 20mM N- 乙酰基 -L- 半胱氨酸除去羟考酮组分中的 14- 羟可待因酮

[0144] 该实施例描述了利用 20mM 的 N- 乙酰基 -L- 半胱氨酸处理含有 3525ppm 14- 羟可待因酮的羟考酮游离碱组分以便 (与其它操作一起) 实现将组分中 14- 羟可待因酮含量降低 500 倍以上,并制备其中 14- 羟可待因酮含量小于 5ppm 的产物。

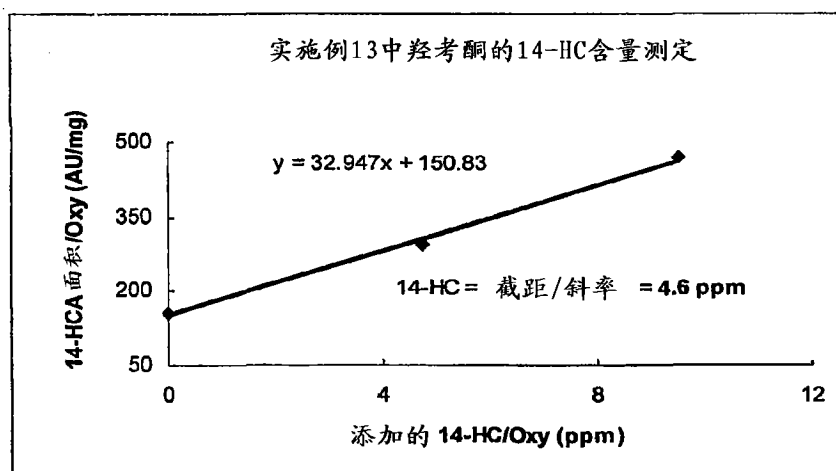
[0145] 将含有 3525ppm 14- 羟可待因酮的羟考酮 (5.0g, 15.9mmol) 和 N- 乙酰基 -L- 半胱氨酸 (含巯基化合物) (0.163g, 1mmol) 溶解在 50mL 0.32N HCl 中。搅拌下添加 1M 碳酸钠将所得溶液的 pH 升高到 6.0 ~ 6.1 以溶解所有的沉淀羟考酮。所得溶液搅拌 1 小时,然后在强烈搅拌下向溶液中加入固体碳酸钠 (1.6g, 15.1mmol)。约 6 分钟后 (溶液的 pH 增加到约 8.0), 将羟考酮悬液萃取到乙酸乙酯 (250mL) 中,强烈搅拌乙酸乙酯萃取物和 50mL 的 20mM N- 乙酰基 -L- 半胱氨酸水溶液 (pH8.0) 20 分钟。除去 N- 乙酰基 -L- 半胱氨酸洗液后,用 50mL 水洗涤羟考酮的乙酸乙酯溶液并与 50mL 0.34N HCl 一起搅拌 10 分钟以将羟考酮萃取到酸水溶液中。分离水层并用 1M 碳酸钠 (约 22mL) 将 pH 升高到 9.1 ~ 9.2 以沉淀羟考酮游离碱。收集沉淀,用 25mL 水洗涤,并在干燥器中减压干燥得到 4.7g (94% 收率) 羟考酮产物,其中 14- 羟可待因酮含量小于 5ppm (见实施例 14)。

[0146] 实施例 14

[0147] 实施例 13 中羟考酮产物的 14- 羟可待因酮的含量测定

[0148] 将实施例 13 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在 0.2N HCl (10mL) 中。搅拌下加入 EDTA (0.005g, 0.017mmol) 并利用 1M 碳酸钠将溶液的 pH 升高到 6.0 ~ 6.2 以溶解所有的沉淀羟考酮。向均匀反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.025g, 0.22mmol)。在分别的尖峰试验中, 在添加巯基乙酸钠之前引入已知量的 14-羟可待因酮。1 小时后, 用 1M 碳酸钠 (约 1.5mL) 将溶液的 pH 升高到 8.2 并用二氯甲烷 (2×15mL) 将悬液萃取到 30mL 分液漏斗中。分离水层并用 1N HCl (1.6mL) 酸化至 pH3.5 ~ 3.7。在 30 ~ 40℃ 下, 在旋转蒸发仪上将水溶液 (15 ~ 16mL) 的预定体积的等份 (2mL) 减压蒸干并将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (400 μL) 中。通过 HPLC 分析所述溶液的等份, 其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下图所示, 根据每毫克被分析羟考酮中的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮微克数) 的图测定的样品中 14-羟可待因酮的含量是 4.6ppm。

[0149]



[0150] 纵坐标表示的是相对于巯醇-迈克尔加成物 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 的重量与被分析羟考酮的重量之间的比值 (ppm)。

[0151] 实施例 15

[0152] 利用 40mM 的 2-巯基乙磺酸钠除去羟考酮组分中的 14-羟可待因酮

[0153] 该实施例描述了利用 40mM 的 2-巯基乙磺酸钠处理含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮游离碱组分以便 (与其它操作一起) 实现将组分中 14-羟可待因酮含量降低 300 倍以上, 并制备其中 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙磺酸的总量小于 10ppm 的加工产物。

[0154] 将含有 3525ppm 14-羟可待因酮的羟考酮 (5.0g, 15.9mmol) 溶解在 50mL 0.33N HCl 中。搅拌下添加 1M 碳酸钠将所得溶液的 pH 升高到 6.2。待添加碳酸钠期间沉淀的所有羟考酮溶解后, 加入 2-巯基乙磺酸钠 (0.33g, 2mmol), 所得溶液搅拌 1 小时, 然后在强烈搅拌下向溶液中加入固体碳酸钠 (1.5g, 14.2mmol)。约 6 分钟后 (溶液的 pH 增加到约 7.8), 将羟考酮悬液萃取到乙酸乙酯 (250mL) 中, 强烈搅拌乙酸乙酯萃取物和 50mL 的 20mM 的 2-巯基乙磺酸钠水溶液 20 分钟。除去 2-巯基乙磺酸钠洗液后, 用 50mL 水洗涤羟考酮的乙酸乙酯溶液并与 50mL 0.34N HCl 一起搅拌 10 分钟以将羟考酮萃取到酸水溶液中。分离水层并用 1M 碳酸钠 (约 22mL) 将 pH 升高到 9.2 ~ 9.3 以沉淀羟考酮游离碱。收集沉淀,

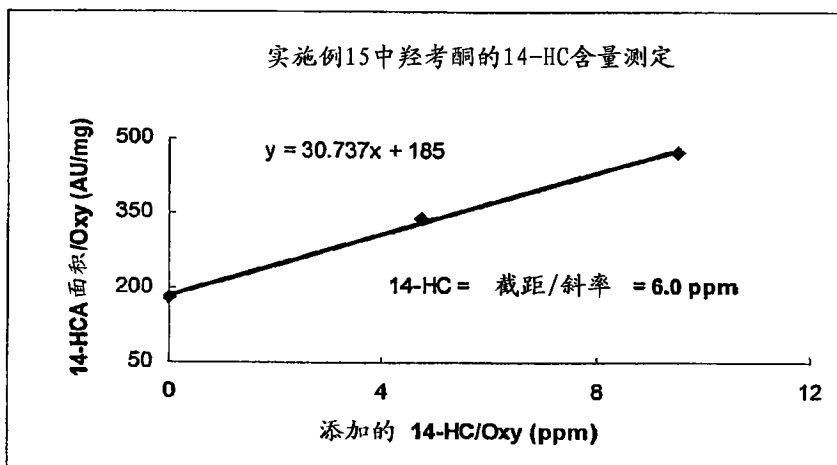
用 25mL 水洗涤,并在干燥器中减压干燥得到 4.66g(93.2%收率)羟考酮产物,其中 14-羟可待因酮和 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙磺酸的总量小于 10ppm(见实施例 16~17)。

[0155] 实施例 16

[0156] 实施例 15 中羟考酮产物的 14-羟可待因酮的含量测定

[0157] 将实施例 15 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在 0.2N HCl (10mL) 中。搅拌下加入 EDTA (0.005g, 0.017mmol) 并利用 1M 碳酸钠将溶液的 pH 升高到 6.1~6.2 以溶解所有沉淀的羟考酮。向均匀反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.025g, 0.22mmol)。在分别的尖峰试验中,在添加巯基乙酸钠之前引入已知量的 14-羟可待因酮。1 小时后,用 1M 碳酸钠 (约 1.5mL) 将溶液的 pH 升高到 8.2~8.4 并用二氯甲烷 (2×15mL) 将悬液萃取到 30mL 分液漏斗中。分离水层并用 1N HCl (1.6mL) 酸化至 pH3.2~3.5。在 30~40℃ 下,在旋转蒸发仪上将水溶液 (14.5~16mL) 的预定体积的等份 (2mL) 减压蒸干并将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸/水 (400 μL) 中。通过 HPLC 分析所述溶液的等份,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下图所示,根据每毫克被分析羟考酮中的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮的微克数) 的图测定的 14-羟可待因酮的量是 6.0ppm。

[0158]



[0159] 纵坐标表示的是相对于硫醇-迈克尔加成物 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 的重量与被分析羟考酮的重量之间的比值 (ppm)。

[0160] 实施例 17

[0161] 实施例 15 中羟考酮产物的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙磺酸的含量测定

[0162] 将实施例 15 的羟考酮产物 (0.5g, 1.6mmol) 溶解在二氯甲烷 (3mL) 中并用水 (3mL) 萃取溶液 1 次。萃取物水溶液的等份 (1mL) 用 1N HCl (10 μL) 酸化并在 30~40℃ 下,在旋转蒸发仪上减压蒸干。将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸/水 (200 μL) 中并通过 HPLC 分析样品,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。由此测定的实施例 15 中制备的羟考酮产物中 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙磺酸的含量是 1.6ppm。

[0163] 实施例 18

[0164] 降低纳曲酮中的 7,8-脱氢纳曲酮含量

[0165] 该实施例描述了将纳曲酮中 7,8-脱氢纳曲酮含量降低 300 倍以上,以及通过利用

巯基乙酸钠在水中处理纳曲酮制备其中 7,8-脱氢纳曲酮含量小于 5ppm 的纳曲酮产物。

[0166] 将含有 690ppm 7,8-脱氢纳曲酮的纳曲酮 (2.0g, 5.9mmol) 溶解在 20mL 0.3N HCl 中。搅拌下添加 1M 碳酸钠将所得溶液的 pH 升高到 6.15。待添加碳酸钠期间沉淀的所有纳曲酮溶解后,加入巯基乙酸钠 (0.046g, 0.4mmol)。所得溶液搅拌 1 小时,然后在强烈搅拌下向溶液中加入固体碳酸钠 (0.6g, 5.7mmol)。约 8 分钟后 (溶液的 pH 增加到约 8.1 ~ 8.2),将纳曲酮悬液萃取到乙酸乙酯 (100mL) 中,强烈搅拌乙酸乙酯萃取物和 20mL 的 20mM 巯基乙酸钠水溶液 20 分钟。除去巯基乙酸钠洗液后,用 20mL 水洗涤纳曲酮的乙酸乙酯溶液并与 20mL 0.34N HCl 一起搅拌 10 分钟以将纳曲酮萃取到酸水溶液中。分离水层并用 1M 碳酸钠 (约 7.5mL) 将 pH 升高到 8.8 ~ 8.9 以沉淀纳曲酮。收集沉淀,用 4mL 水洗涤,并在干燥器中减压干燥得到 1.95g (97.5% 收率) 纳曲酮产物,其中 7,8-脱氢纳曲酮含量小于 5ppm (见实施例 19)。

[0167] 实施例 19

[0168] 实施例 18 中纳曲酮产物的 7,8-脱氢纳曲酮的含量测定

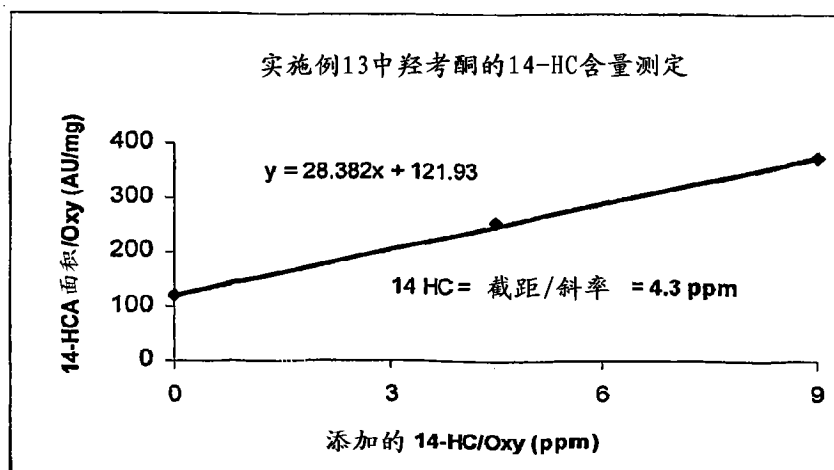
[0169] 将实施例 18 的纳曲酮产物 (0.5g, 1.47mmol) 溶解在 0.2N HCl (10mL) 中。搅拌下加入 EDTA (0.005g, 0.017mmol) 并利用 1M 碳酸钠将溶液的 pH 升高到 6.0 以溶解所有沉淀的纳曲酮。向均匀反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.025g, 0.22mmol)。1 小时后,用 1M 碳酸钠 (约 1.5mL) 将溶液的 pH 升高到 8.9 并用二氯甲烷 (2×15mL) 将悬液萃取到 30mL 分液漏斗中。分离水层并用 1N HCl (1.6mL) 酸化。在 30 ~ 40°C 下,在旋转蒸发仪上将水溶液 (15 ~ 16mL) 的预定体积的等份 (2mL) 减压蒸干并将剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (400 μL) 中。通过 HPLC 分析所述溶液的等份,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。所述 7,8-脱氢纳曲酮的含量是约 1ppm。

[0170] 实施例 20

[0171] 利用还原量的样品测定羟考酮产物中 14-羟可待因酮的含量

[0172] 下述步骤代表实施例 14 中所述步骤的改进,其经设计用于可用于分析的羟考酮产物的量是有限的。将实施例 13 的羟考酮产物 (100mg, 0.317mmol) 置于 8mL 反应瓶中,并溶解在 0.2N HCl (2mL) 中,所述反应瓶配有聚四氟乙烯内衬的螺纹帽和小型磁搅拌子。搅拌下加入 EDTA (0.001g, 0.0034mmol) 并利用 1M 碳酸钠水溶液将溶液的 pH 升高到 6.0 ~ 6.2 以溶解所有沉淀的羟考酮。用 pH 计完成 pH 测定,所述 pH 计具有足够窄的复合电极 (约 5mm) 以便允许其直接插入样品瓶中。向均匀的反应混合物中添加巯基乙酸钠 (0.005g, 0.044mmol); 在分别的尖峰试验中,在添加巯基乙酸钠之前引入已知量的 14-羟可待因酮。1 小时后,用 1M 碳酸钠水溶液 (约 0.07mL) 将溶液的 pH 升高到 8.2 并通过将二氯甲烷 (2×3mL) 添加到瓶中、盖住并强力摇动来萃取悬液。利用巴斯德吸管除去瓶中有有机层。用 1N HCl (0.3mL) 酸化水层并通过旋转蒸发将溶液减压干燥 (浴温 30 ~ 40°C)。剩余物溶解在 0.07% 三氟乙酸 / 水 (400 μL) 中并通过 HPLC 分析所述溶液的等份,其中用 280nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下所示,根据每毫克被分析羟考酮中的 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮的微克数) 的图测的定样品中 14-羟可待因酮的量是 4.3ppm。通过该方法测定的 14-羟可待因酮的量 (4.3ppm) 在实施例 14 中所述相同样品的测定值 (4.6ppm) 的 10% 内。

[0173]



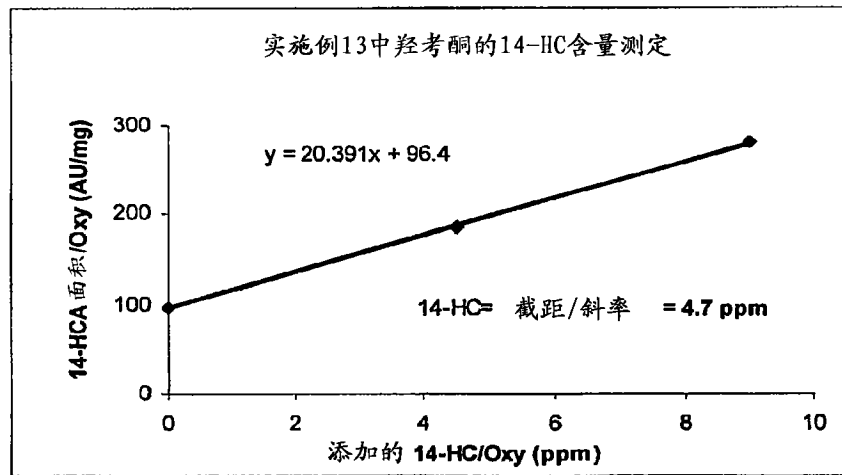
[0174] 纵坐标表示的是相对于硫醇-迈克尔加成物 2-(羟考酮-8-硫烷基)-乙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 的重量和被分析羟考酮的重量之间的比值 (ppm)。

[0175] 实施例 21

[0176] 利用 5-巯基-2-硝基-苯甲酸测定实施例 13 的羟考酮产物中 14-羟可待因酮的含量

[0177] 将实施例 13 的羟考酮产物 (0.300g, 0.952mmol) 悬浮在 8mL 反应瓶 (配备带聚四氟乙烯内衬的螺纹帽和小型磁搅拌子) 的 0.2N HCl 水溶液 (3mL) 中。加入浓 HCl (30  $\mu$ L) 彻底溶解固体, 添加 100mg/mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液 (0.11mL) 和 1N HCl 水溶液 (0.05mL) 将 pH 升高到 4.5。用 pH 计完成 pH 测定, 所述 pH 计具有足够窄的复合电极 (约 5mm) 以便允许其直接插入样品瓶中。该溶液的等份 (1mL) 用 pH4.5 的 0.05M NaOAc/HOAc 缓冲液 (0.1mL) 稀释并在一边静置; 保留剩余物用于分别的尖峰试验, 其中在下一步骤之前加入已知量的 14-羟可待因酮。在单独的反应瓶中, 5,5'-二硫代双 (2-硝基-苯甲酸) (10mg, 0.025mmol) 完全溶解在 pH7 的 0.05M 磷酸钠缓冲水溶液 (5mL) 中。加入 EDTA (5mg) 和二硫苏糖醇 (2.0mg, 0.013mmol) 并用 100mg/mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液 (0.45mL) 将所得橙色溶液的 pH 升高到 6.8。搅拌 30 分钟后, 用 25% 的醋酸水溶液 (0.105mL) 将 pH 降低到 4.7 并将该溶液的等份 (1mL) 添加到含有之前制备的羟考酮溶液的瓶中。搅拌 90 分钟后, 用浓 HCl (15  $\mu$ L) 将合并溶液的 pH 降低至 2, 通过将二氯甲烷 (4 $\times$ 2mL) 添加到瓶中、盖住并强力摇动来萃取所得悬液。利用巴斯德吸管完全除去瓶中的有机层。通过 HPLC 分析水层, 其中在其吸光度 325nm 下定量流出液中的分析物。如下所示, 根据每毫克被分析羟考酮中的 2-硝基-5-(羟考酮-8-硫烷基)-苯甲酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮的微克数) 的图测定的样品中 14-羟可待因酮的量是 4.7ppm。通过该方法测定的 14-羟可待因酮的量 (4.7ppm) 在实施例 14 中所述同一样品的测定值 (4.6ppm) 的 10% 内。

[0178]



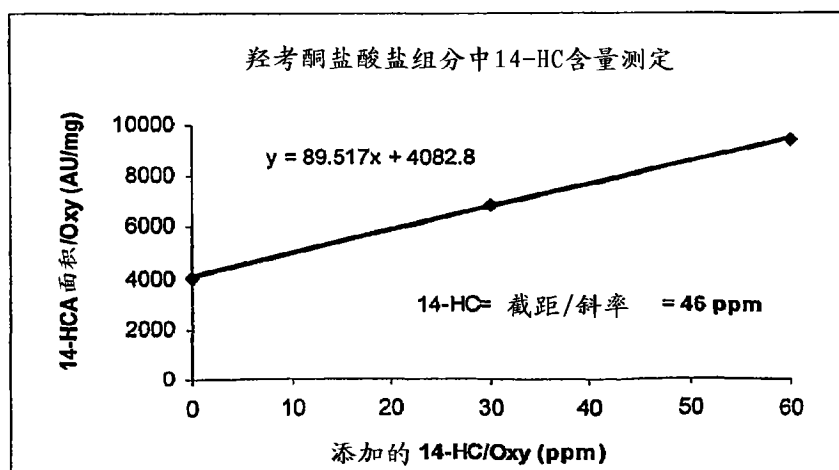
[0179] 纵坐标表示的是相对于硫醇-迈克尔加成物 2-硝基-5-(羟考酮-8-硫烷基)-苯甲酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 的重量和被分析羟考酮的重量之间的比值 (ppm)。

[0180] 实施例 22

[0181] 利用 5-巯基-2-硝基-苯甲酸测定羟考酮盐酸盐组分中 14-羟可待因酮的含量

[0182] 在 8mL 反应瓶 (配有聚四氟乙烯内衬的螺纹帽和小型磁搅拌子) 中将 5mg EDTA 溶解在 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液 (4.75mL) 和 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液 (0.25mL) 中配制 pH 7.4 缓冲液。加入 5,5'-二硫代双 (2-硝基-苯甲酸) (9.8mg, 0.025mmol) 之后加入二硫苏糖醇 (2.1mg, 0.014mmol), 溶液颜色立刻变成橙色。当固体完全溶解时 (5 分钟), 用 1N HCl 水溶液 (0.35mL) 将溶液 pH 降低到 4.5。用 pH 计完成 pH 测定, 所述 pH 计具有足够窄的复合电极 (约 5mm) 以便允许其直接插入样品瓶中。将羟考酮盐酸盐 (482mg, 1.37mmol) 置于单独的 8mL 反应瓶中, 向其中加入 3.0mL 之前配制的溶液。添加 1N HCl 水溶液 (10  $\mu\text{L}$ ) 将溶液的 pH 降低至 4.5, 移出 1.0mL 等份并搅拌。保留剩余物用于分别的尖峰试验, 其中向混合物中加入已知量的 14-羟可待因酮。90 分钟后, 用浓 HCl (10  $\mu\text{L}$ ) 将 pH 降低到 2, 通过将二氯甲烷 (4  $\times$  1mL) 添加到瓶中、盖住并强力摇动来萃取所得悬液。利用巴斯德吸管完全除去瓶中有机层。通过 HPLC 分析水层, 其中用 325nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下所示, 根据每毫克被分析羟考酮中的 2-硝基-5-(羟考酮-8-硫烷基)-苯甲酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮微克数) 的图测定的样品中 14-羟可待因酮的量是 46ppm。

[0183]



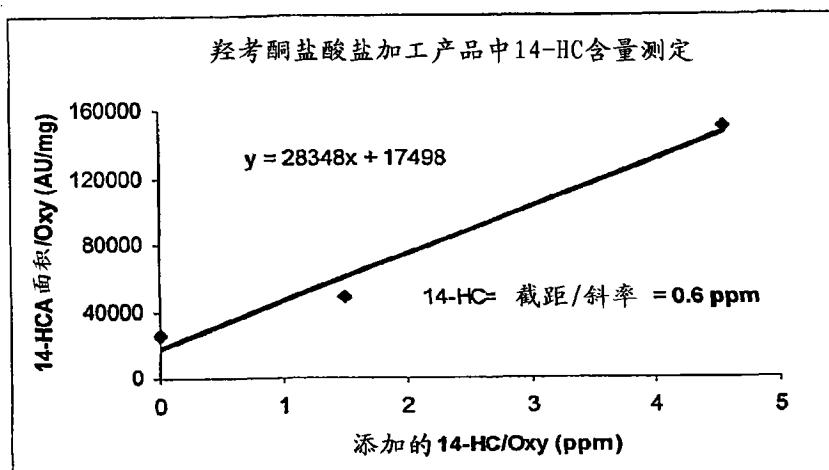
[0184] 纵坐标表示的是相对于硫醇-迈克尔加成物5-(羟考酮-8-硫烷基)-2-硝基-苯甲酸(14-HCA)的峰得到的面积与被分析羟考酮(Oxy)的重量之间的比值(面积单位(AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰14-羟可待因酮(14-HC)的重量和被分析羟考酮的重量之间的比值(ppm)。

[0185] 实施例 23

[0186] 利用N-丹硫烷基-L-半胱氨酸测定羟考酮盐酸盐加工产物中14-羟可待因酮的含量,所述产物通过从在实施例22中分析的组分中除去14-羟可待因酮(利用20mM巯基乙醇酸盐)制备

[0187] 在装有磁搅拌子的25mL圆底反应烧瓶中,加入以下物质:10mL pH7.0的50mM磷酸盐缓冲液、EDTA(2mg,0.007mmol)、二硫苏糖醇(3.1mg,0.020mmol)、N,N'-二丹硫烷基-L-胱氨酸(28mg,0.038mmol)。用10%的磷酸氢二钠水溶液(0.5mL)将所得溶液的pH升高到7.0,搅拌溶液1小时。然后向含有羟考酮盐酸盐(230mg,0.65mmol)的8mL反应瓶中加入所述溶液的3.5mL等份。加入10%的磷酸氢二钠水溶液(0.2mL)将所得羟考酮溶液的pH升高到6.1~6.2。移出等份(1.2mL)并置于8mL反应瓶中。保留剩余物用于分别的尖峰试验。90分钟后,用1N HCl将反应混合物的pH降低到2.4~2.5,并且所得溶液用乙酸乙酯(1.5mL)萃取1次。通过HPLC分析水相,其中用530nm下的吸光度定量流出液中的分析物。如下所示,根据每毫克被分析羟考酮中的2-(R)-(5-二甲基氨基-萘-1-硫烷基氨基)-3-(羟考酮-8-硫烷基)-丙酸峰下的面积对添加的14-羟可待因酮量(ppm,即每克羟考酮中添加的14-羟可待因酮的微克数)的图测定的样品中14-羟可待因酮的量是0.6ppm。

[0188]



[0189] 纵坐标表示的是归属于硫醇-迈克尔加成物 2-(R)-(5-二甲基氨基-萘-1-硫烷基氨基)-3-(羟考酮-8-硫烷基)-丙酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (发射单位 (EU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 的重量和被分析羟考酮的重量之间的比值 (ppm)。

[0190] 实施例 24

[0191] 在含有小于 1ppm 14-羟可待因酮的羟考酮组分中测定 8-羟基羟考酮的含量

[0192] 该实施例描述了用于测定含有小于 1ppm 14-羟可待因酮的羟考酮组分中 8-羟基羟考酮含量的方法,其中所述迈克尔受体前体 8-羟基羟考酮被转化成 14-羟可待因酮,并且所得产物的 14-羟可待因酮含量被测定并与初始羟考酮组分中的 8-羟基羟考酮含量相关联。

[0193] 在装有回流冷凝器的 500mL 圆底烧瓶中,羟考酮 (1.50g, 4.76mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (1.52g, 8.0mmol) 溶解在甲苯 (300mL) 中并加热回流。2.5 小时后,在 35 ~ 40°C 下,通过旋转蒸发减压除去甲苯。所得剩余物溶解在水 (100mL) 中并加入固体碳酸钠 (1.25g) 调节 pH 到 9。用二氯甲烷 (3×30mL) 萃取水溶液,在无水硫酸钠中干燥合并的有机层并过滤,通过旋转蒸发除去溶剂。所得的白色固体进一步减压干燥得到羟考酮 (1.37g, 91%)。

[0194] 利用实施例 20 中所述方法测定的羟考酮产物中 14-羟可待因酮含量表明 14-羟可待因酮的含量为 85ppm。该结果与在用于实现脱水的条件下单独测定的 > 98% 的 8-羟基羟考酮转化成 14-羟可待因酮一起表明初始羟考酮组分中含有约 85ppm 的 8-羟基羟考酮。

[0195] 实施例 25

[0196] 除去羟考酮组分中的 8-羟基羟考酮

[0197] 该实施例描述从含有约 85ppm 8-羟基羟考酮的羟考酮组分中除去 8-羟基羟考酮的方法。

[0198] 如实施例 24 所述,回流下,在甲苯和对甲苯磺酸中将含有约 85ppm 8-羟基羟考酮的羟考酮组分进行酸催化脱水。所得羟考酮产物样品 (1.35g, 4.29mmol) 和 EDTA (15mg) 溶解在 0.2N HCl 水溶液 (27mL) 中,并用 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液将 pH 升高到 6.1。搅拌溶液直到少量羟考酮沉淀已经溶解,之后加入巯基乙酸钠 (68.3mg, 0.60mmol)。另外搅拌 60 分钟后,用 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液 (4.4mL) 将 pH 升高到 8.1,并且将所得白色沉淀萃取到二氯甲烷

(3×40mL) 中。在无水硫酸钠中干燥合并的有机萃取物并过滤,通过旋转蒸发除去溶剂以得到羟考酮产物,其中 8-羟基羟考酮和 14-羟可待因酮的总量小于 5ppm(见实施例 26 中的测定)。

[0199] 实施例 26

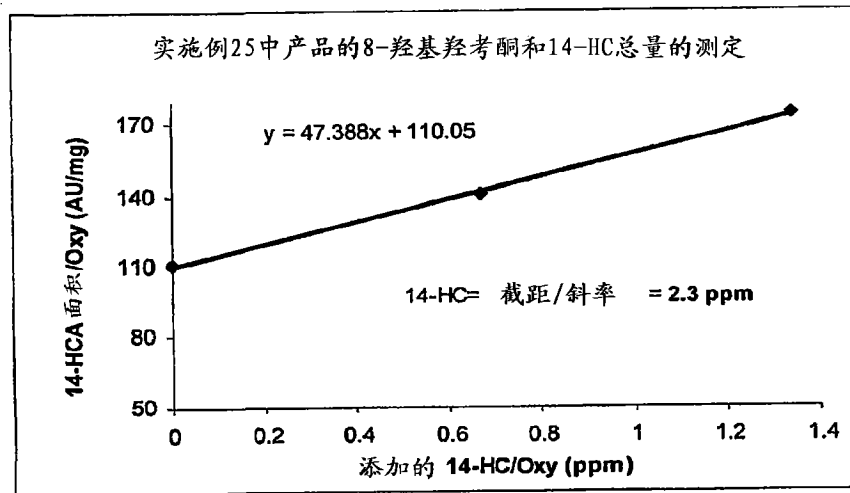
[0200] 实施例 25 中产物的 8-羟基羟考酮和 14-羟可待因酮的总量测定

[0201] 在装有回流冷凝器的 250mL 圆底烧瓶中加热回流实施例 25 的羟考酮产物样品 (0.703g, 2.23mmol) 和对甲苯磺酸一水合物 (0.727g, 3.8mmol)、以及甲苯 (125mL)。2.5 小时后,在 35 ~ 40°C 下,通过旋转蒸发减压除去甲苯。所得剩余物溶解在水 (50mL) 中并加入固体碳酸钠 (0.50g) 调节 pH 到 9。用二氯甲烷 (3×15mL) 萃取所述水溶液,在无水硫酸钠中干燥合并的有机层并过滤,通过旋转蒸发除去溶剂。所得的白色固体进一步高真空干燥 15 分钟,并溶解在 0.1N HCl 水溶液 (25mL) 中。在 30 ~ 35°C 下,通过旋转蒸发减压除去水,高真空干燥固体以得到羟考酮盐酸盐。

[0202] 利用下述步骤制备用于羟考酮盐酸盐分析的含有 5-巯基-2-硝基-苯甲酸的溶液。在 8mL 反应瓶(配有聚四氟乙烯内衬的螺纹帽和小型磁搅拌子)中将 5mg EDTA 溶解在 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液 (4.75mL) 和 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液 (0.25mL) 中配制成 pH7.4 的缓冲液。加入 5,5'-二硫代双(2-硝基-苯甲酸) (10mg, 0.025mmol) 之后加入二硫苏糖醇 (1.9mg, 0.012mmol), 溶液颜色立刻变成橙色。当固体完全溶解时 (5 分钟), 用 1N HCl 水溶液 (0.285mL) 将溶液 pH 降低到 4.6 ~ 4.5。用 pH 计完成 pH 测定, 所述 pH 计具有足够窄的复合电极 (约 5mm) 以便允许其直接插入样品瓶中。

[0203] 将羟考酮盐酸盐样品 (579mg, 1.65mmol) 置于 8mL 反应瓶中, 向其中加入 3.5mL 之前配制的 5-巯基-2-硝基-苯甲酸溶液。通过加入 100mg/mL  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液 (0.47mL) 使 pH 升高到 4.5, 移出 1.0mL 所述溶液的等份并用 pH4.5 的 0.01M NaOAc/HOAc 缓冲液 (10  $\mu$ L) 稀释并搅拌。保留剩余物 (2.5mL) 用于分别的尖峰试验, 其中向混合物中加入已知量的 14-羟可待因酮。90 分钟后, 用浓 HCl (10  $\mu$ L) 将合并溶液的 pH 降低到 2, 通过将乙酸乙酯 (3×1mL) 添加到瓶中、盖住并强力摇动来萃取悬液。然后利用巴斯德吸管完全除去瓶中有有机层。通过 HPLC 分析水层, 其中用 325nm 下的吸光度定量流出液中的分析物。如下所示, 根据每毫克被分析羟考酮中的 5-(羟考酮-8-巯烷基)-2-硝基-苯甲酸峰下的面积对添加的 14-羟可待因酮量 (ppm, 即每克羟考酮中添加的 14-羟可待因酮的微克数) 的图测定的 14-羟可待因酮含量以及由此实施例 24 中 8-羟基羟考酮和 14-羟可待因酮的总量是 2.3ppm。

[0204]



[0205] 纵坐标表示的是相对于硫醇-迈克尔加成物 5-(羟考酮-8-硫烷基)-2-硝基-苯甲酸 (14-HCA) 的峰得到的面积与被分析羟考酮 (Oxy) 的重量之间的比值 (面积单位 (AU)/mg)。横坐标表示的是尖峰 14-羟可待因酮 (14-HC) 的重量和被分析羟考酮的重量之间的比值 (ppm)。

[0206] 虽然本文描述并举例说明了本发明的几个实施方案,但是本领域一般技术人员将容易地预想多种用于实施功能和/或得到本文所述的结果和/或一个或多个益处的其它方法和/或结构,并且每个这样的变体和/或改进都认为落入了本发明的范围。更一般而言,本领域技术人员将容易地认为本文所述的所有参数、尺寸、物质和构型是示例性的并且精确的参数、尺寸、物质和构型将取决于本发明教导的具体应用。本领域技术人员仅仅利用常规试验将认识到或能确认本文所述的本发明具体实施方案的许多等同物。因此,应当理解前述实施方案仅仅是作为实例给出的,并且在所附权利要求及其等同物的范围内,除了根据说明书描述和权利要求,可另外实施本发明。如果不相互矛盾,本发明的两种或多种方法、方法步骤或其它特征的任意组合都被包括在本发明的范围内。

[0207] 除非清楚地相反指出,本文说明书和权利要求书中所用的没有用数量词限定的名词应当理解为意指“至少一个”。

[0208] 本文说明书和权利要求书中所用的短语“和/或”应当理解为由此结合在一起的元素的“或者或都”,即在一些情况下联合存在并且在另外情况下分离地存在的元素。用“和/或”列举的多个元素应当以相同方式进行解释,即“一个或多个”因此而结合的元素。除了通过“和/或”子句具体确定的元素以外,其它元素也可任选地存在,或与具体确定的元素相关或不相关。因此,作为非限定性实例时,参照“A和/或B”,当与开放式结尾的语言例如“包括”一起使用时,可在一个实施方案中仅仅指A(任选地包括除了B以外的元素);在另一个实施方案中仅仅指B(任选地包括除了A以外的元素);在又一另外实施方案中指A和B(任选地包括其它的元素)等。

[0209] 本文说明书和权利要求书中所用的短语“或”应当理解为具有上述定义“和/或”相同的意思。例如,当分离列举的条款时,“或”或“和/或”应当解释为包括,即包括至少一个但是还包括一个以上的多数或多个列举的元素,以及任选地另外的未列举的条款。除非术语清楚地相反指出,例如“仅仅一个”或“确切一个”或当在权利要求书中使用时“由...组成”,“或”将指包括确切地一个多数或多个列举的元素。一般而言,本文所用的术语“或”应

当仅仅被解释为当为排他性术语加上前言时,表示排他性的替代(即“一种或另一种而不是都”)例如“或”、“之一”、“仅仅一个”、或“确切地一个”。当在权利要求书中使用时,“基本上由…组成”应当具有专利法领域中所用的一般意义。

[0210] 本文说明书和权利要求书中所用的关于一个或多个元素的短语“至少一个”应当理解为意指选自元素列表中的任意一个或多个元素的至少一个元素,但是不必包括元素列表中具体列举的每个和每种元素的至少一个并且不排除元素列表中元素的任意组合。该定义还承认除了元素列表中具体确定的元素以外可任选地存在的元素,术语“至少一个”指与具体确定的元素相关或不相关。因此,作为非限定性实例时,“至少一个 A 和 B”(或等价地“至少一个 A 或 B”、或等价地“至少一个 A 和 / 或 B”)可在一个实施方案中指一个以上,任选地包括一个以上的 A,而 B 不存在(并且任选地包括除了 B 以外的元素);在另一个实施方案中指一个以上,任选地包括一个以上的 B,而 A 不存在(并且任选地包括除了 A 以外的元素);在又一另外实施方案中指一个以上,任选地包括一个以上的 A,以及一个以上,任选地包括一个以上的 B(并且任选地包括其它元素);等等。

[0211] 除非清楚地相反指出,还应当理解,在包括一种以上步骤或作用的本文权利要求的任何方法中,所述方法的步骤或作用的顺序不必限制于所叙述方法的步骤或作用的顺序。

[0212] 在权利要求中以及上述说明书中,所有过渡短语例如“包括”、“含有”、“带有”、“具有”、“包含”、“涉及”、“持有”、“包含”等应当理解为是开放式结尾的,即意指包括但不限于。仅仅过渡短语“由…组成”和“基本上由…组成”应当分别是闭式或半闭式过渡短语,如美国专利局专利审查程序手册 2111.03 部分所述。