文章编号：1001-8689(2018)12-1510-04

普鲁卡因青霉素特定杂质的合成制备

刘慧勤　米祥忻 *　吕冠芳　黄娟　王钽　严正人　王欣
(华北制药集团先泰药业有限公司，石家庄 052165)

摘要：目的　合成制备普鲁卡因青霉素的特定杂质 2-(2-((4-((2-(二乙基氨基) 乙氧基) 羰基) 苯基) 氨基)-2- 氧代 -1-(2- 苯基乙酰氨基) 乙基)-5,5- 二甲基噻唑烷 -4- 羧酸，该杂质为首次报道。**方法**　以青霉素 G 钾盐和盐酸普鲁卡因为原料，酸性条件下合成得到含有目标杂质的粗品，之后将该粗品固体通过反相制备色谱分离、冻干 12h，得到该杂质的纯化样品。**结果**　得到纯化样品结构信息 (质谱、核磁共振数据) 与目标杂质相一致， 总收率 2.5%，LC-MS 纯度 89.36%，HPLC 纯度 80.44%。**结论**　所得纯化样品为目标杂质 2-(2-((4-((2-(二乙基氨基) 乙氧基) 羰基) 苯基) 氨基)-2- 氧代 -1-(2- 苯基乙酰氨基) 乙基)-5,5- 二甲基噻唑烷 -4- 羧酸，可用于普鲁卡因青霉素产品的质量研究。

关键词：普鲁卡因青霉素；特定杂质；合成；制备分离
中图分类号：R978.1　　**文献标志码：**A

Synthesis and preparation of specific impuritiy of procaine penicillin

Liu Hui-qin, Mi Xiang-xin, Lü Guan-fang, Huang Juan, Wang Tan, Yan Zheng-ren and Wang Xin
(North China Pharmaceutical Group Semisyntech Co., Ltd, Shijiazhuang 052165)

Abstract　Objective　To synthesize and prepare the specific impurity of procaine penicillin 2-(2-((4-(2-(diethylamino)ethoxy))carbonyl)phenyl)amino)-2-oxo-1-(2-phenylacetamido)ethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, and the impurity was reported for the first time. **Methods**　The crude product containing the target impurity was synthesized using the penicillin G potassium salt and the procaine hydrochloride under the acidic condition of the raw material, and then the crude solid was separated by reverse phase preparative chromatography and lyophilized for 12 hours to obtain a purified sample of the impurity. **Results**　Structural information (MS and NMR data) of the purified sample agreed with the target impurity, which was obtained with a total yield of 2.5%, LC-MS purity of 89.36%, and HPLC purity of 80.44%. **Conclusion**　The purified sample was the target impurity, 2-(2-((4-(2-(diethylamino)ethoxy))carbonyl)phenyl)amino)-2-oxo-1-(2-phenylacetamido)ethyl)-5,5-dimethylthiazolidine-4-carboxylic acid, which could be used for the study on the quality of procaine penicillin.

Key words　Procaine penicillin; Specific impurity; Synthesis; Preparation separation

普鲁卡因青霉素 [1]，又名为对氨基苯甲酸 2-(二乙氨基) 乙酯 (6*R*)-6-(2- 苯基乙酰氨基) 青霉烷酸盐一水合物，是常见的青霉素类产品，适用于治疗对青霉素 G 高度敏感的 A 组溶血性链球菌所致的扁桃体炎、猩红热、肺炎链球菌性肺炎，对青霉素 G 敏感的金黄色葡萄球菌所致的皮肤软组织感染、樊尚咽峡炎等，也可单独用于治疗钩端螺旋体病、回归热 (虱传回归热)、早期梅毒等。普鲁卡因青霉素在酸性条件下易发生降解，产生现行药典 [2-4] 中尚未收录的新杂质 (图 1)。

按照人用药物注册技术要求国际协调会 (International Council for Harmonization，ICH) 行业

收稿日期：2018-10-11

作者简介：刘慧勤，女，生于 1974 年，工程师，主要从事精细化工研究，E-mail: lhq238@126.com
* 通讯作者，E-mail: 251021382@qq.com

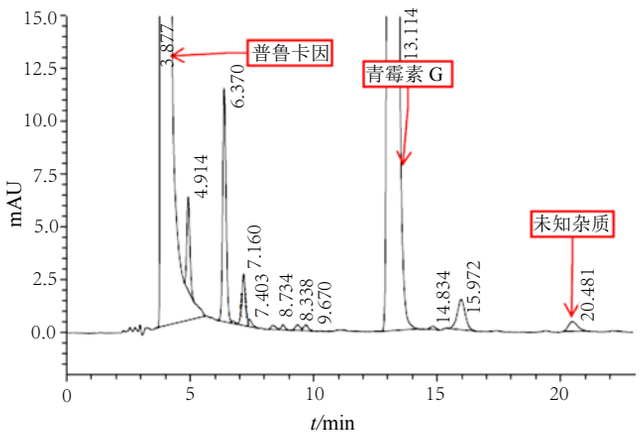
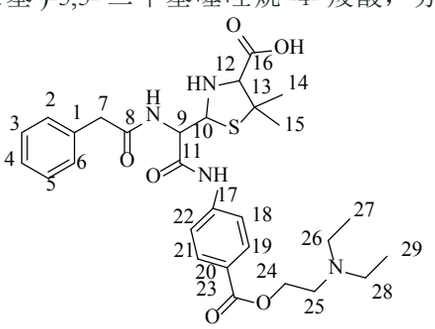


图 1　普鲁卡因青霉素强酸降解产物

Fig. 1　Strong acid degradation products of procaine benzylpenicillin

指导原则 [5]，本研究对该杂质的结构、生成条件等进行了一系列前期研究之后发现，该杂质分子式 $C_{29}H_{38}N_4O_6S$，化学命名为 2-(2-((4-((2-(二乙基氨基) 乙氧基) 羰基) 苯基) 氨基)-2- 氧代 -1-(2- 苯基乙酰氨基) 乙基)-5,5- 二甲基噻唑烷 -4- 羧酸，分子量为 570，结构如图 2 所示。该杂质是由青霉素与普鲁卡因在酸性条件下直接反应而生成，生成机理如图 3 所示。根据欧洲药物管理局 (European Medicines Agency, EMA) 基因毒性杂质指南问答 [6]，查阅基因毒性杂质结构数据库 [7-8] 可知，目标杂质为非基因毒性杂质。基于以上研究结果，应对该杂质进行合成制备，按照现行初级标准品 [9] 的要求制备分离得到该杂质的纯化样品，用于普鲁卡因青霉素产品的质量研究。



普鲁卡因青霉素
Chemical Formula: $C_{29}H_{38}N_4O_6S$
Exact Mass: 570.25

图 2　目标杂质的结构

Fig. 2　Structure of the target impury

1　材料与方法

1.1　主要材料与试剂

盐酸普鲁卡因 (购于重庆西南制药二厂有限责任公司)、青霉素 G 钾 (购于国药威奇达)、乙腈 (色谱纯，购于天津科密欧)、浓盐酸 (购于天津科密欧)、无水甲醇 (化学纯，购于天津康科德)、二氯甲烷 (化学纯，购于天津科密欧)、氢氧化钠 (购于天津科密欧)。

1.2　仪器

高效液相色谱系统：LC solution 工作站、岛津 SPD-M20A 检测器、岛津 CTO-20AC 柱温箱、岛津 SIL-20A 自动进样器、岛津 LC-20AD 泵 (以上仪器购于杭州赛析科技有限公司)。Gilson 281 制备色谱 (Gilson 公司)、Agilent1260 Infinity/6120 液质联用仪 (安捷伦科技中国有限公司)、Bruker Ascend 400 型核磁共振谱仪 (布鲁克北京科技有限公司)、LGJ-18A 冷冻干燥机 (上海能共实业有限公司)、SHB- Ⅲ 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司)、2XZ-4 型旋片式真空泵 (上海开良泵阀制造有限公司)、DZ-1BC Ⅱ 真空干燥箱 (天津泰斯特)、R-201 旋转蒸发仪 (南京大卫仪器设备有限公司)。

1.3　方法

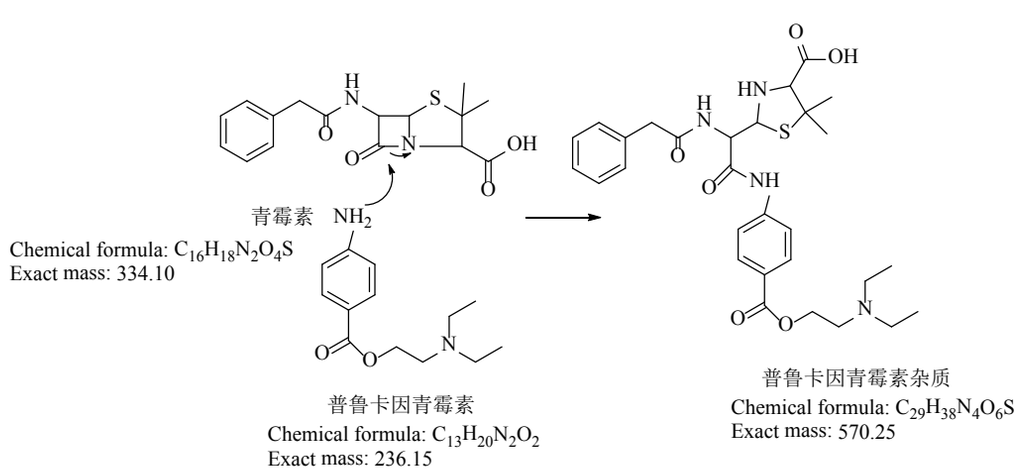


图 3　目标杂质的形成机理

Fig. 3　Formation mechanism of the target impurity

1.3.1　合成制备方法

将盐酸普鲁卡因溶于 22mL 浓盐酸，配制成普鲁卡因盐酸溶液；将 75g 青霉素 G 钾溶于 25mL 纯化水，并加入 37.5mL 甲醇，制成青霉素 G 钾盐溶液；5℃下向普鲁卡因溶液中流加钾盐溶液，5min 加毕；反应 3h 后，得到反应液 150mL。加入二氯甲烷 200mL，甲醇 100mL，充分搅拌后用分液漏斗静置，取下层有机相，将有机相常温下减压蒸馏 2h，得到油状液体；将该油状液体常温下真空干燥 24h，得到黄色粗品固体。

1.3.2　制备分离方法

样品溶剂：甲醇；检测波长：220nm；色谱柱：Xbridge Prep C_{18}(19mm×50mm, 5μm)；流动相 A：水，流动相 B：乙腈；流速：20mL/min；进样体积：200μL。进行制备分离的洗脱梯度如表 1 所示。洗脱后将洗脱液冻干 12h 得到目标杂质的纯化样品。

1.3.3　LC-MS 分析方法

样品溶剂：甲醇；检测波长：220nm；色谱柱：Xbridge C_{18}(4.6mm×50mm, 5μm)；流动相 A：0.1% NH_3。H_2O 水溶液，流动相 B：乙腈；流速：1.7mL/min；进样体积：1μL。进行检测的洗脱梯度如表 2 所示。

1.3.4　HPLC 分析方法

参照 EP9.0[4] 中方法进行 HPLC 检测，检测波长：225nm；色谱柱：Kromasil C_{18}(4.6mm×250mm, 5μm)；流速：1.0mL/min；流动相的配制：将 250mL 乙腈、250mL 纯化水与 500mL 含磷酸二氢钾 14g/L、四丁基溴化铵 6.5g/L 的溶液混合，用 1mol/L 氢氧化钾调至 pH=7.0。流速：1.0mL/min。

表 1　制备色谱洗脱梯度

Tab. 1　Gradient of the preparative chromatography

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
10	70	30
12	5	95
15	5	95
15.1	90	10
20	90	10
20.01	停止	停止

表 2　LC-MS 洗脱梯度

Tab. 2　Gradient of the LC-MS

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
4.5	5	95
5.5	5	95
5.6	90	10
6	90	10
6.01	停止	停止

1.3.5　核磁共振分析方法

目标杂质的分子式 $C_{29}H_{38}N_4O_6S$，结构如图 2 所示，对目标杂质的原子进行编号，以 DMSO-d_6 为溶剂，加入少量四甲基硅烷 (TMS) 作内标，对目标杂质别做 ^{1}H NMR、^{13}C NMR、DEPT 90°、DEPT 135°、^{1}H-^{1}H COSY、^{1}H-^{13}C HSQC 和 ^{1}H-^{13}C HMBC 进行全谱解析。

表 3　纯化样品的核磁数据谱图解析结果

Tab. 3　Analytical results of NMR data for purified sample of the target impurity

Position/*n*	δ_H/(mult.)	δ_C/(mult.)	HMBC
1	-	136.43	C-2,C-6,C -7
2	7.2819~7.2992(d, *J*=6.92Hz, 1H)	129.06	C-1
3	7.2313~7.2504(d, *J*=7.64Hz, 1H)	128.04	C-4,C-2
4	7.1643~7.1992(t, *J*=13.96Hz, 1H)	126.61	C-3,C-5
5	7.2313~7.2504(d, *J*=7.64Hz, 1H)	128.04	C-4,C-6
6	7.2819~7.2992(d, *J*=6.92Hz, 1H)	129.06	C-1
7	3.5384~3.5565(d, *J*=7.24Hz, 2H)	41.8	C-1,C-8
8	-	170.27	C-7
9	4.5900~4.6307(t, *J*=16.28Hz, 1H)	58.49	C-10,C-11
10	4.9276~4.9468(d, *J*=7.68Hz, 1H)	67.06	C-9
11	-	169.27	C-9
12	3.5928~3.6013(d, *J*=3.4Hz, 1H)	72.75	C-16,C-13
13	-	58.99	C-14, C-15,C-12
14	1.5388(3H)	27.4	C-13
15	1.5388(3H)	27.08	C-13
16	-	170.77	C-12
17	-	124.19	C-22,C-18
18	7.7322~7.7542(d, *J*=8.8Hz, 1H)	118.69	C-19,C-17
19	7.9062~7.9281(d, *J*=8.76Hz, 1H)	130.23	C-20,C-18
20	-	143.16	C-19,C-23,C-21
21	7.9062~7.9281(d, *J*=8.76Hz, 1H)	130.23	C-20,C-22
22	7.7322~7.7542(d, *J*=8.8Hz, 1H)	118.69	C-21,C-17
23	-	165.19	C-20
24	4.3126~4.3416(t, *J*=11.6Hz, 2H)	62.25	C-25
25	2.8515~2.8804(t, *J*=11.56Hz, 2H)	50.37	C-24
26	2.6139~2.6672(4H)	46.93	C-27
27	0.9872~1.0227(t, *J*=14.2Hz, 6H)	11.42	C-26
28	2.6139~2.6672(4H)	46.93	C-29
29	0.9872~1.0227(t, *J*=14.2Hz, 6H)	11.42	C-28

“-”：图 1 中相应碳原子并无氢原子，无化学位移数据

2　结果 (表 3)

合成粗品固体收率 50.4%，制备分离收率 5%，总收率 2.5%。LC-MS 纯度 89.36%，HPLC 纯度 80.44%。ESI-MS(*m/z*): 571.0[M+H]$^+$、286.0[1/2(M+H)$^+$]，全谱解析结果如表 3 所示。结合质谱数据结果和表 3 的全谱解析结果可知，通过合成制备得到的纯化样品的结构信息与目标杂质结构相吻合，即 2-(2-((4-((2-(二乙基氨基) 乙氧基) 羰基) 苯基) 氨基)-2- 氧代 -1-(2- 苯基乙酰氨基) 乙基)-5,5- 二甲基噻唑烷 -4- 羧酸。

3　讨论

本研究以市售的盐酸普鲁卡因和青霉素 G 钾盐为原料，在酸性条件下成功合成了普鲁卡因青霉素的杂质 2-(2-((4-((2-(二乙基氨基) 乙氧基) 羰基) 苯基) 氨基)-2- 氧代 -1-(2- 苯基乙酰氨基) 乙基)-5,5- 二甲基噻唑烷 -4- 羧酸，最终制备得到该杂质的分离纯化样品，总收率 2.5%，纯化样品 LC-MS 纯度 89.36%，HPLC 纯度 80.44%，由于该杂质为首次报道。因此，本纯化样品可作为对照品，用于普鲁卡因青霉素产品的质量控制。

参 考 文 献

[1] Penicillin G Procaine[DB/OL]. https://www.rxlist.com/penicillin-g-procaine-drug.htm.

[2] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典 [S]. (2015 年版第二部). 北京 : 中国医药科技出版社 , 2015: 1434-1435.

[3] IPC. India Pharmacopoeia 2010[S]. Ministry of Health and Family Welfare, 2010: 1970-1971.

[4] EPC. European Pharmacopoeia 9.0[S]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2017: 1826-1827.

[5] ICH. ICH Harmonised tripartite guideline[S/OL]. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use, Q3A(R2), 2006, 10: 8-10

[6] EMA. Questions and Answers on the 'Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities'[EB/OL]. (2010-9-23).[2018-3-29]. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/questions-answers-guideline-limits-genotoxic-impurities_en.pdf.

[7] Romualdo B, Cecilia B, Olga T, *et al*. Worth, developmentof structural alerts for the *in vivo* micronucleus assay inrodents[R/OL][2018-3-29]. http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC52274/eur_23844_en.pdf.

[8] The Carcinogenic Potency Database[DB/OL]. [2018-4-13]. https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/pdfs/structure.pdf.

[9] European Pharmacopoeia 9.0[S]. Reference Standards, 2017: