

cyclohexyl-H), 2.27[s, 6H, N(CH₃)₂], 2.51~2.63(m, 1H, CH), 2.80~3.18(m, 2H, CH₂), 6.70~7.04(m, 4H, ArH)。IR(KBr, cm⁻¹): 3 425(OH), 2 938(C-H), 1 517, 1 270, 842(Ph)。¹³C-NMR: (125 MHz, DMSO-d₆) 155.64, 131.70, 130.11, 114.50, 72.62, 60.47, 51.65, 45.32, 37.21, 32.35, 27.74, 21.32, 21.25。纯度: 99.6%[色谱条件: 色谱柱 Diamonsil C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水-正丁胺-冰乙酸(54:60:1.5:1.2), 流速: 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长: 229 nm]。

3 结论

本研究的工艺路线起始原料易得, 且价格低廉, 各步骤化学反应收率稳定, 总收率为 28.8%(以对羟基苯乙酸计), 生产成本低于已有文献工艺路线, 具有一定的工业化前景。终产品经元素分析、氢谱、质谱和红外光谱检测证实其化学结构正确无误。

REFERENCES

[1] PERRY R, CASSAGNOL M. Desvenlafaxine: A new serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment

- of adults with major depressive disorder [J]. Clin Ther, 2009, 31(1): 1374-1404.
- [2] SHEPARD RG. Preparation of cyclohexanol derivatives and novel thioamide intermediates: US, 5043466 [P]. 1991-08-27.
- [3] MORRIS G E, YARDLEY J P, MILLS G, et al. 2-Phenyl-2-(1-hydroxycycloalkyl or 1-hydroxycycloalk-2-enyl) ethylamine derivatives: US, 4535186 [P]. 1985-08-13.
- [4] YARDLEY J P, MORRIS G E, STACK G, et al. 2-phenyl-2-(1-hydroxycycloalkyl)ethylamine derivatives: synthesis and antidepressant activity [J]. J Med Chem, 1990, 33(10): 2899-2905.
- [5] JERUSSI T P, SENANAYAKE C H. Derivatives of (-)-venlafaxine and methods of preparing and using the same: US, 6342533 [P]. 2002-01-29.
- [6] WEIBO B T. Preparation of *O*-desmethylvenlafaxine: China, 1625546 [P]. 2005-06-08.
- [7] WU J K, WU M D, CAI Y X, et al. The new method of preparation of *O*-desmethylvenlafaxine: China, 101117320 [P]. 2008-02-06.
- [8] VAGHANI D D, MERCHANT J R. Reactions of nitriles: Condensation of methyleneaminoacetonitrile with aldehydes [J]. J Chem Soc, 1961, 1066-1068.
- [9] CAI F P. The method of preparation of *N,N*-dimethyl-4-benzyloxy phenylacetamide: China, 101597238A [P]. 2009-12-09.
- [10] SKRABANJA V, ZUPANCIC S. Process for preparation of *O*-demethylvenlafaxine and its analogue: WO2007147564 [P]. 2007-12-27.

收稿日期: 2012-11-05

半合成紫杉醇工艺杂质研究

王永毅¹, 冯锋², 田连忠¹, 王琮¹, 喻琼林¹ (1. 红豆集团江苏红豆杉药业有限公司, 江苏 无锡 214199; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要: 目的 研究半合成紫杉醇工艺杂质, 结合合成路线推测工艺杂质的来源。方法 利用硅胶柱色谱制备分离了 kingston 半合成路线中的 4 个工艺杂质, 通过质谱及核磁共振波谱鉴定化学结构。结果 4 个工艺杂质分别是 5β,20-环氧-1,7β-二羟基-9-羧基紫杉-11-烯-2α,4,10β,13α-四取代基 4,10-二乙酰氧基 2-苯甲酰氧基 13-[(2*R*,3*S*)]-3-氨基-2-苯甲酰氧基-3-苯基丙酸酯(1)、7-乙酰基紫杉醇(2)、13-Tes-巴卡亭Ⅲ(3)、7-表紫杉醇(4)。结论 杂质(1)尚未被美国药典和欧洲药典收载, 研究结果为半合成紫杉醇的质量控制提供了依据。

关键词: 半合成紫杉醇; 质量控制; 工艺杂质

中图分类号: R284.3

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)02-0154-05

Study on the Process-related Impurities of Semi-synthetic Paclitaxel

WANG Yongyi¹, FENG Feng², TIAN Lianzhong¹, WANG Qiong¹, YU Qionglin¹ (1. Jiangsu Yew Pharmaceutical Co., Ltd., Hodo Group, Wuxi 214199, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the process-related impurities of semi-synthetic paclitaxel and discuss the formation mechanism according to the synthetic route. **METHODS** The process-related impurities of semi-synthetic paclitaxel in kingston route were isolated by silica gel column chromatography and identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analysis. **RESULTS** Their structures were 5β,20-epoxy-1,7β-dihydroxy-9-oxotax-11-ene-2α,4,10β, 13α-tetraol 4,

10-diacetate 2-benzoate 13-[(2*R*,3*S*)]-3-amino-2-benzoate-3-phenylpropanoate(**1**), 7-acetylpaclitaxel(**2**), 13-Tes-baccatin III(**3**), 7-epipaclitaxel(**4**), respectively. **CONCLUSION** Impurity(**1**) has not been recorded by United States Pharmacopoeia and European Pharmacopoeia. The result could provide a basis for quality control of semi-synthetic paclitaxel.

KEY WORDS: semi-synthetic paclitaxel; quality control; impurity

紫杉醇(paclitaxel, 商品名 Taxol)是具有抗癌活性的天然二萜类化合物, 作为临床中重要的抗肿瘤药物, 由于其结构复杂, 且在植物中的含量很低, 因而多采用半合成的方法进行制备。目前, 文献报道了多条半合成紫杉醇的方法^[1], 其中 10-去乙酰基巴卡亭III(10-DAB)为前体的半合成紫杉醇已占据紫杉醇销售总量的 2/3^[2]。

为保证患者用药安全, 药品监管部门对半合成紫杉醇的质量要求不断提高, 大部分制药企业已通过对合成工艺产生的杂质进行深入研究, 将单个未知杂质限度定在 0.1%以下。本实验研究了 kingston 合成路线^[3-4]产生的杂质, 并根据合成路线分析了杂质产生的原因, 该合成路线见图 1。研究结果为半合成紫杉醇的质量控制提供了依据。

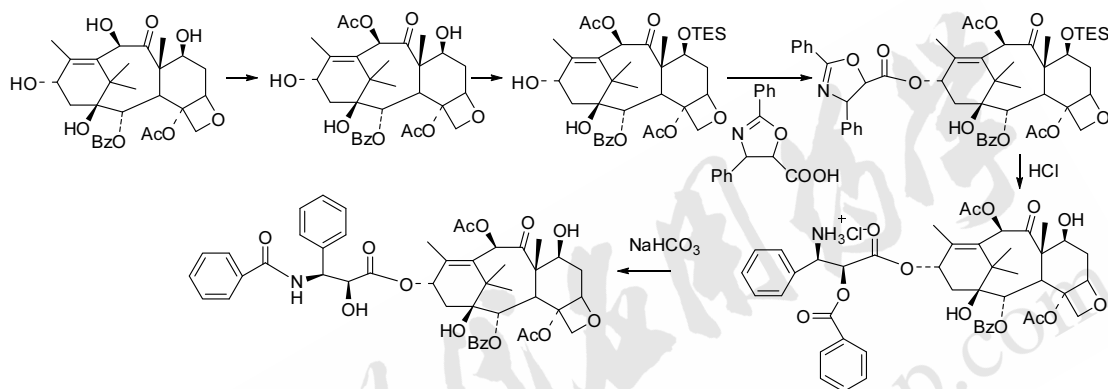


图 1 紫杉醇半合成路线

Fig 1 Semi-synthetic route of paclitaxel

1 仪器与材料

LC-20A 高效液相色谱仪(配有四元泵、在线脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器和色谱工作站, 日本岛津公司)。AV-400M 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。

半合成紫杉醇杂质样品(本公司自行制备), 结构见图 2; 硅胶(200~300 目), 由青岛海洋化工有限公司生产; 欧洲药典和美国药典收载的杂质, 7-表紫杉醇(加拿大 TRC 公司); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析条件

色谱柱 YMC-pack ODS-A(4.6 mm×150 mm, 3 μm), 流速: 1.2 mL·min⁻¹, 进样体积: 15 μL, 柱温: 35 °C。A(40%乙腈)-B(乙腈), 0~20 min, 0%B; 20~60 min, 0%→90%B; 60~62 min, 90%→0% B。核磁共振分析: 内标四甲基硅烷(TMS), 测定温度: 303 K。采集参数: 正离子模式[M+H]⁺, 碎裂电压 70 V, 载气流速 9.0 L·min⁻¹, 喷雾气压力 35 psi, 干燥气温度 350 °C, 毛细管电压 3 kV。

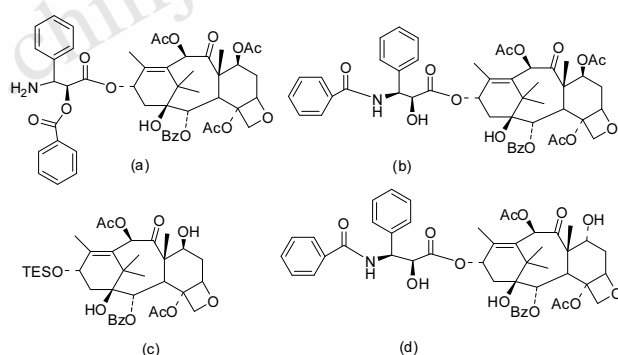


图 2 杂质结构式

a-杂质 1; b-杂质 2; c-杂质 3; d-杂质 4

Fig 2 The structures of impurities

a-impurity 1; b-impurity 2; c-impurity 3; d-impurity 4

2.2 杂质分离制备及结构鉴定

2.2.1 杂质分离制备 将紫杉醇杂质 3 g 溶于 90 mL 乙醇中, 搅拌溶解、过滤、弃去残渣。45 °C 减压条件下蒸干。将干燥后样品 2 g 溶于 50 mL 二氯甲烷中。取 2 g 硅胶拌样, 将拌有样品的硅胶研磨均匀, 减压干燥 5 h。将干燥好的混合样品加入到柱层析硅胶上, 硅胶用量为 120 g, 采用石油醚/丙酮溶剂系统为流动相进行色谱分离, 流动相比比例依

次为石油醚：丙酮-3：1，3：2，3：3。对洗脱液进行薄层分析，将薄层行为一致的流分合并，合并后的4个杂质在45℃减压蒸干。即可获取杂质(1)12 mg、杂质(2)102 mg、杂质(3)94 mg、杂质(4)125 mg。

2.2.2 杂质结构解析 杂质1：白色粉末，ESI-MS m/z 854.2[M+H]⁺，结合¹H-NMR及¹³C-NMR推测其分子式为C₄₇H₅₁NO₁₄，由此推测杂质1为紫杉醇的同分异构体。

¹H-NMR(DMSO-*d*₆，400 Mz)显示杂质1为C5(20)四元氧环6/8/6骨架的紫杉烷类化合物，特征信号包括：δ 3.55(1H, d, *J*=7.0 Hz, H-3)，以及δ 0.97, 1.02, 1.49, 1.80的4个甲基质子单峰信号。δ 2.09和2.21处的甲基单峰为2个乙酰基质子信号，δ 6.29(1H, s)为10位质子信号，δ 5.40(1H, d, *J*=7.0 Hz)为2位质子信号，δ 7.55~8.37为苯环质子信号。

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆，100 Mz)给出47个碳信号，包括1个羰基碳信号δ 202.8，1组双键碳信号δ 130.2, 139.7，5个酯羰基信号δ 165.4~170.2，3组苯环碳信号，9个连氧碳信号，其余为sp³杂化碳信号。将杂质1的核磁数据与紫杉醇比较，发现杂质1母核数据与紫杉醇母核数据基本一致，但侧链数据比紫杉醇侧链多了1个δ 134.8的碳信号，少了1个δ 138.2的碳信号。文献[5]报道，δ 138.2的碳信号为侧链上与3'位相连的苯环邻位特征碳信号，据此可确定侧链上苯甲酰基不是连在3'位的氨基上而是连在2'位的氧原子上。因此将杂质1鉴定为5β,20-环氧-1,7β-二羟基-9-羰基紫杉-11-烯-2α,4,10β,13α-四取代基4,10-二乙酰基2-苯甲酰氧基13-[(2*R*,3*S*)]-3-氨基-2-苯甲酰氧基-3-苯基丙酸酯(5β,20-Epoxy-1,7β-dihydroxy-9-oxotax-11-ene-2α,4,10β,13α-tetrayl 4,10-diacetate 2-benzoate 13-[(2*R*,3*S*)]-3-amino-2-benzoate-3-phenylpropanoate)。杂质1的化学结构见图2a，核磁共振波谱数据见表1。

杂质2：白色粉末，ESI-MS m/z 896.2 [M+H]⁺，结合¹H-NMR及¹³C-NMR推测其分子式为C₄₉H₅₄NO₁₅。

¹H-NMR(CDCl₃，400Mz)显示杂质2为C5(20)四元氧环6/8/6骨架的紫杉烷类化合物，特征信号包括：δ 3.83(1H, d, *J*=7.0Hz, H-3)，以及δ 1.09，

1.12, 1.72, 1.74 的4个甲基质子的单峰信号。δ 1.96, 2.09和2.26处的甲基单峰为3个乙酰基质子信号。δ 6.14(1H, s)为10位质子信号，δ 5.60(1H, d, *J*=7.0 Hz)为2位质子信号，δ 5.44(1H, m)为7位质子信号，δ 7.26~8.04为苯环质子信号。

¹³C-NMR(CDCl₃，100 Mz)给出49个碳信号，包括1个羰基碳信号δ 200.9，6个连杂原子的羰基信号δ 165.8~171.4，1组双键碳信号δ 131.9, 139.6，3组苯环碳信号，以及9个连氧碳信号，其余为sp³杂化碳信号。将杂质2的核磁共振波谱数据与紫杉醇比较^[5]，发现多出1个乙酰基信号δ 167.9, 19.7，此外除7位质子信号向低场位移至δ 5.44^[6]，其余信号无明显变化。因此将杂质2鉴定为7-乙酰基紫杉醇(7-acetylpaclitaxel)。杂质2的化学结构见图2b，核磁共振波谱数据见表1。

杂质3：白色粉末，ESI-MS m/z 701.3[M+H]⁺，结合¹H-NMR及¹³C-NMR推测其分子式为C₃₇H₅₂SiO₁₁。

该化合物的¹H-NMR(CDCl₃，400 Mz)谱显示其为C5(20)四元氧环6/8/6骨架的紫杉烷类化合物，特征信号包括：δ 3.80(1H, d, *J*=7.0Hz, H-3)，以及δ 1.10, 1.17, 1.66, 1.99的4个甲基质子信号。δ 1.10(9H, s)为3个甲基质子信号，0.63(6H, m)为3个亚甲基质子信号，δ 2.22, 2.28处的甲基单峰为2个乙酰基质子信号，6.30(1H, s)为10位质子信号，δ 5.62(1H, d, *J*=7.0 Hz)为2位质子信号，4.99(1H, m)为13位质子信号，7.45~8.09为1组苯环质子信号。

¹³C-NMR(CDCl₃，100 Mz)谱给出37个碳信号，包括1个羰基碳信号δ 204.3，1组双键碳信号δ 130.6, 148.0，以及3个酯羰基信号、1组苯环碳信号、3个连氧碳信号，其余为sp³杂化碳信号。将杂质3的核磁数据与紫杉醇^[5]相比较，发现侧链信号消失，多出1组三乙基硅烷信号。因此将杂质3鉴定为13-Tes-巴卡亭III(13-Tes-baccatin III)。杂质3的结构见图2c，核磁共振波谱数据见表1。

杂质4：白色粉末，液相色谱保留时间与7-表紫杉醇一致，薄层色谱3种展开系统R_f值均与7-表紫杉醇一致，由此确定该杂质为7-表紫杉醇(7-epipaclitaxel)，结构式见图2d。

表 1 3 个工艺杂质的核磁共振波谱数据

Tab 1 The NMR data of three process-related impurities

No	1 (in DMSO- <i>d</i> ₆)		2 (in CDCl ₃)		3 (in CDCl ₃)	
	δC	δH	δC	δH	δC	δH
1	77.1		77.4		79.8	
2	75.1	5.40(1H,d, <i>J</i> =7.0 Hz)	74.3	5.60(1H,d, <i>J</i> =7.0 Hz)	75.4	5.62(1H,d, <i>J</i> =7.0 Hz)
3	46.5	3.55(1H,d, <i>J</i> =7.0 Hz)	46.0	3.83(1H,d, <i>J</i> =7.0 Hz)	45.8	3.80(1H,d, <i>J</i> =7.0 Hz)
4	80.6		80.1		80.7	
5	84.1	4.97(1H,br.d, <i>J</i> =6.7 Hz)	82.9	4.87(1H, br.d, <i>J</i> =7.0 Hz)	84.4	4.93(1H,m)
6	34.7	2.33(1H,m),1.63(1H,o)	32.3	2.51(1H,m),1.78(1H,o)	35.4	2.54(1H,m),1.82(1H,o)
7	70.8	4.84(1H,br.d, <i>J</i> =9.8 Hz)	72.1	5.44(1H,m)	72.2	4.46(1H,m)
8	56.4		55.1		58.4	
9	202.8		200.9		204.4	
10	75.2	6.29(1H,s)	75.4	6.14(1H,s)	76.3	6.30(1H,s)
11	130.4		131.9		130.8	
12	139.7		139.6		148.0	
13	72.0	5.77(1H,o)	71.1	6.09(1H,m)	68.5	4.99(1H,m)
14	36.9	2.09(1H,m),2.21(1H,o)	34.5	2.23(1H,m),2.09(1H,m)	40.1	2.22(1H,o),2.15(1H,o)
15	43.4		42.2		42.9	
16	19.0	0.97(3H,s)	19.7	1.09(3H,s)	22.0	1.10(3H,s)
17	26.8	1.02(3H,s)	25.5	1.12(3H,s)	26.7	1.17(3H,s)
18	14.4	1.80(3H,o)	13.6	1.74(3H,o)	14.1	1.93(3H,s)
19	10.3	1.49(3H,o)	9.8	1.72(3H,o)	9.6	1.66(3H,s)
20	75.7	4.01(1H,o),4.10(1H,o)	76.2	4.12(1H,d, <i>J</i> =8.1 Hz) 4.24(1H,d, <i>J</i> =8.1 Hz)	76.3	4.16(1H,d, <i>J</i> =8.1 Hz) 4.29(1H,d, <i>J</i> =8.1 Hz)
2PhCO	165.6		166.0		167.0	
10-OCOCH ₃	169.2/21.1	2.09(3H,s)	169.5/20.1	2.09(3H,s)	171.4/22.9	2.22(3H,s)
4-OCOCH ₃	168.9/21.9	2.21(3H,s)	169.4/21.5	2.26(3H,s)	170.0/22.3	2.28(3H,s)
O/NBzCO	165.4		165.8			
C 1'	170.2		171.4			
C 2'	74.8	4.89(1H,br.d, <i>J</i> =9.4 Hz)	72.2	4.73(1H,dd, <i>J</i> =4.4,2.4 Hz)		
C 3'	57.8	5.72(1H,o)	53.9	5.74(1H,br.d)		
OBz(o)	129.6	8.37(2H,d, <i>J</i> =8.0 Hz)	129.1	8.04(2H,d, <i>J</i> =8.0 Hz)	130.6	8.09(2H,d, <i>J</i> =8.1 Hz)
OBz(m)	128.9	7.59(2H,o)	127.9	7.44(o)	128.6	7.47(m)
OBz(p)	134.0	7.61(2H,o)	132.7	7.51(o)	133.6	7.62(m)
OBz(q)	130.2		128.0		129.4	
3'Ph(o)	129.2	7.69(2H,o)	127.9	7.41(2H,o)		
3'Ph(m)	130.0	7.55(2H,o)	128.0	7.31(2H,o)		
3'Ph(p)	133.1	7.59(1H,o)	130.9	7.35(1H,o)		
3'Ph(q)	134.8		137.0			
NH/OBz(o)	130.8	7.96(2H,d, <i>J</i> =8.0 Hz)	128.6	7.69(2H,d, <i>J</i> =8.0 Hz)		
NH/OBz(m)	129.2	7.56(2H,o)	126.5	7.33(2H,o)		
NH/OBz(p)	128.2	7.63(1H,o)	127.2	7.28(1H,o)		
NH/OBz(q)	133.9		132.6			
7-OCOCH ₃			167.9/19.7	1.96(3H,s)		
CH ₃ CH ₂ Si						1.07(9H,s),0.63(6H,m)

3 讨论

紫杉醇的杂质来源路线见图 3, 杂质 1 由最后一步反应引入。将最后一步反应产物纯化, 通过液相色谱保留时间和薄层 3 种展开系统对比, 进

一步确认了杂质 1 的化学结构。该杂质的产生主要受反应时间和反应 pH 的影响, 延长反应时间, 增大反应 pH 会减少杂质 1 的含量, 但是会增加 7-表紫杉醇的产生^[1]。因此需要对最后一步的反应

进行详细的研究, 确定反应的最佳 pH 值和反应时间, 以确保最后一步起始物料可以反应完全, 同时 7-表紫杉醇的含量在可以接受的范围内。

杂质 **1** 由于和 7-表紫杉醇在进行 RP-HPLC 分

析时的保留时间很接近, 见图 4, 仅凭相对保留时间或绝对保留时间来进行区分容易混淆 2 个杂质, 因此在进行有关物质分析时必须采用对照品进行准确确认。7-乙酰基紫杉醇和 13-Tes-巴卡亭III由

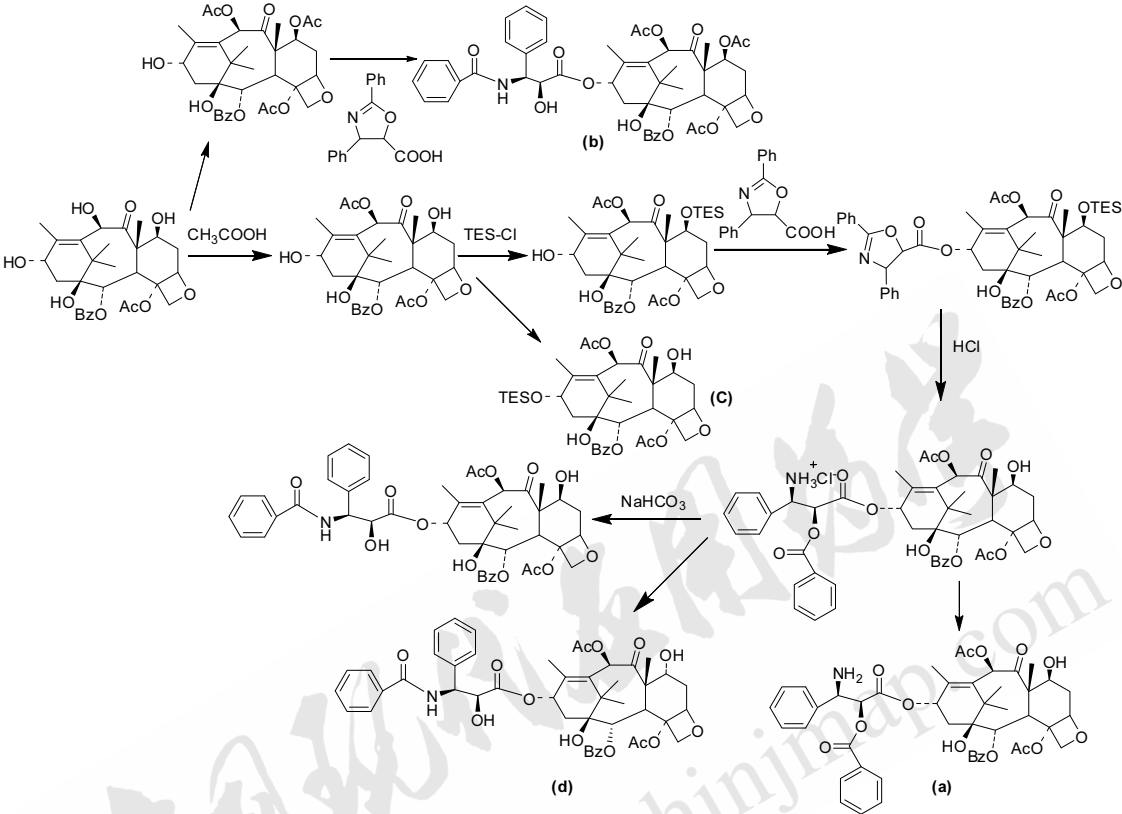


图 3 杂质来源路线

a-杂质 1; b-杂质 2; c-杂质 3; d-杂质 4

Fig 3 The routes of impurities formation

a-impurity 1; b-impurity 2; 3-impurity 3; 4-impurity 4

于性质和紫杉醇差别较大, 分离相对容易; 但是杂质 **1** 采用硅胶柱色谱的制备难度较大, 应采用将最后一步起始物料直接纯化的方法获得。

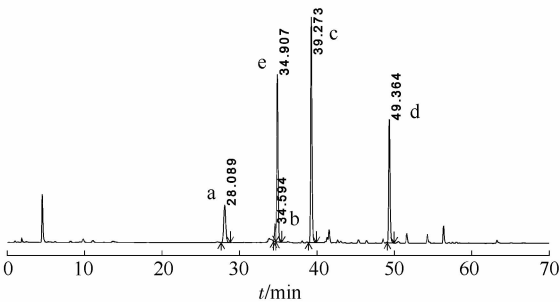


图 4 杂质和紫杉醇液相色谱

a-紫杉醇; b-杂质 1; c-杂质 2; d-杂质 3; e-杂质 4

Fig 4 Chromatogram of four impurities and paclitaxel

a-paclitaxel; b-impurity 1; c-impurity 2; d-impurity 3; e-impurity 4

REFERENCES

- [1] YANG P M. Progress of semisynthesis of taxol [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 1996, 2(27): 85-88.
- [2] XU Z G. The global market pattern was rewritten [N]. Med Econ News (医药经济报), 2013-5-17(A5).
- [3] KINGSTON D G, CHAUDHARY A G, GUNATILAKA A A, et al. Synthesis of taxol from baccatin III via an oxazoline intermediate [J]. Tetrahedron Lett, 1994, 35(26): 4483-4484.
- [4] MCCHESENEY J D, CHANDER M C, HENRI J T, et al. Method for inverting the C2' Hydroxyl group of taxane esters: WO, 2005037840 [P]. 2005-04-28.
- [5] CHMURNY G N, HILTON B D, BROBST B, et al. ¹H- and ¹³C-NMR assignments for taxol, 7-epi-taxol, and Cephalomannine [J]. J Nat Prod, 1992, 55(4): 414-423.
- [6] ZHOU J Y, CHEN W M, FANG Q C. The ¹³C-NMR features of natural taxane diterpenoid compounds [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1997, 39(5): 467-476.

收稿日期: 2013-07-05