



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103113359 A

(43) 申请公布日 2013.05.22

(21) 申请号 201310057065.5

(22) 申请日 2013.02.22

(71) 申请人 西安安健药业有限公司

地址 710400 陕西省西安市周至县药厂路 1
号

(72) 发明人 曾韶辉 王伟 梅丹 傅卫国
甘剑征

(51) Int. Cl.

C07D 407/04 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

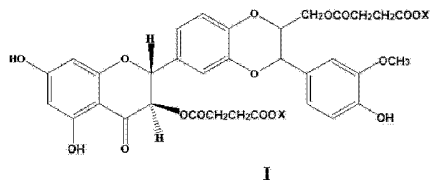
权利要求书11页 说明书31页 附图1页

(54) 发明名称

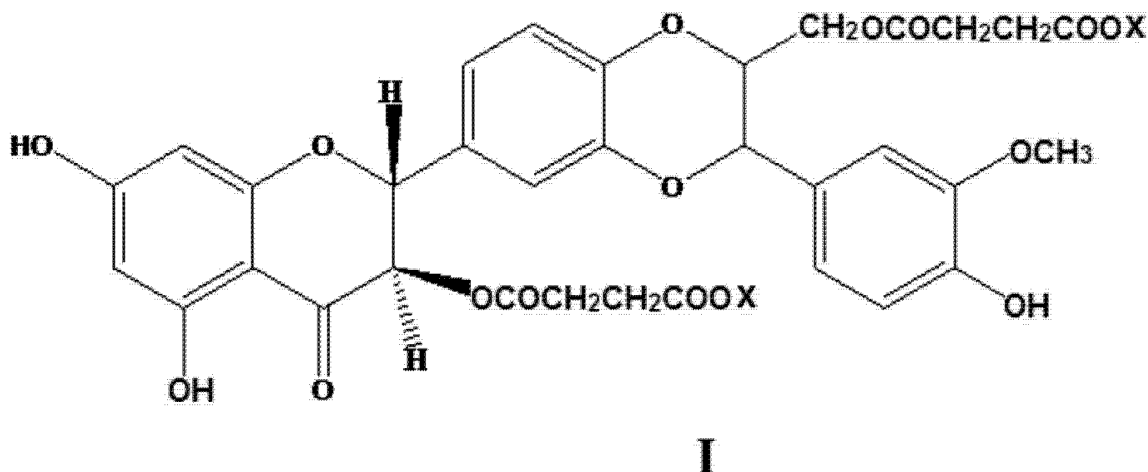
水飞蓟宾二偏琥珀酸酯及其药用盐

(57) 摘要

本发明涉及水飞蓟宾二偏琥珀酸酯及其药用盐。具体讲,本发明提供了一种化合物,其为下述式 I 化合物四种异构体的组合:其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子。本发明还提供了制备所述化合物的方法以及所述化合物的制药用途。本发明化合物具有积极的生物和/或物理和/或化学方面的效果。



1. 一种化合物,其为下述式 I 化合物的四种异构体的组合:



其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子。

2. 根据权利要求 1 的化合物,其中所述金属离子是碱金属离子或者碱土金属离子;或者,其中 X 各自独立地表示氢、钠离子、钾离子、锂离子、镁离子、或钙离子。

3. 根据权利要求 1 至 2 的化合物,其中包含式 I 化合物的四种异构体,所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上。

4. 根据权利要求 1 至 3 的化合物,照高效液相色谱法测定,其在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四个主要色谱峰,所述第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四者的峰面积之和占总峰面积的 95% 以上。

5. 根据权利要求 1 至 4 的化合物,照高效液相色谱法测定,其在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四个主要色谱峰,其中所述第二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍,所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍,所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;或者,所述 E 峰、F 峰、G 峰、H 峰四者峰面积比为 1:(0.5~1.5):(4.5~13.5):(4.5~13.5)。

6. 根据权利要求 5 的化合物,其中所述第一色谱峰和第二色谱峰在所述高效液相色谱法测定条件下二者的分离度大于 0.8;和/或,其中所述第三色谱峰和第四色谱峰在所述高效液相色谱法测定条件下二者的分离度大于 1.0。

7. 根据权利要求 1 至 6 的化合物,其中高效液相色谱法具有使所述第一色谱峰和第二色谱峰能够达到分离度大于 0.8 的高效液相色谱法测定条件;和/或,其中高效液相色谱法具有使所述第三色谱峰和第四色谱峰能够达到分离度大于 1.0 的高效液相色谱法测定条件。

8. 根据权利要求 1 至 7 的化合物,其中所述高效液相色谱法测定是按包括如下“(i) 色谱条件与系统适用性试验”方式进行的:

(i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)—甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30°C;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μg 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μg/ml

的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.0(例如大于 1.2,例如大于 1.5,例如大于 2)。

9. 根据权利要求 1 至 8 的化合物,其中色谱纯度和峰面积比测定的一个典型实例是按包括如下“(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法”方式进行的:

(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取本发明化合物适量,加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用本发明所述(i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法,取对照溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计;记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积,E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数,即为本发明化合物色谱纯度,另外分别以 F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比。

10. 根据权利要求 1 至 9 的化合物,照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,本发明化合物的第一色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.7~2.4,本发明化合物的第二色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.85~2.55,本发明化合物的第三色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.4~3.2,本发明化合物的第四色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.8~3.6。

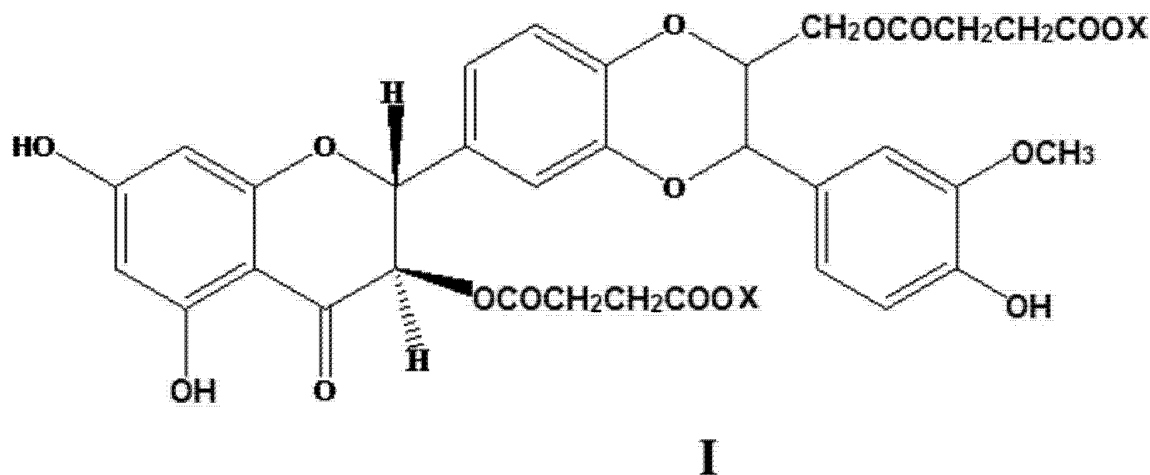
11. 根据权利要求 1 至 10 的化合物,照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,本发明化合物的第一色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.7~2.4,本发明化合物的第二色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.85~2.55,本发明化合物的第三色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.4~3.2,本发明化合物的第四色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.8~3.6,所述高效液相色谱法测定相对保留时间是按包括如下的方式进行的:

(i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)一甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30 $^{\circ}$ C;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μ g 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μ g/ml 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.0(例如大于 1.2,例如大于 1.5,例如大于 2);

(iii) 相对保留时间(RRt)的测定:取本发明化合物适量,加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品贮备液;精密量取供试品贮备液 1ml,置 10ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成包含本发明化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液,作为供试品测试溶液 I;另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml,置 10ml 量瓶中,用流动相

稀释至刻度,摇匀,制成包含本发明化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 $50 \mu\text{g/ml}$ 的溶液,作为供试品测试溶液 II;精密量取 $20 \mu\text{l}$ 的供试品测试溶液 II,注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明化合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间,用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间,用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间,用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间,用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

12. 根据权利要求 1 至 11 的化合物,其为下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体的组合:



其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上,或者该化合物的色谱纯度大于 95%;

该化合物照高效液相色谱法测定,在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四个主要色谱峰,所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8,所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于 1.0,并且其中所述第二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍,所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍,所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;

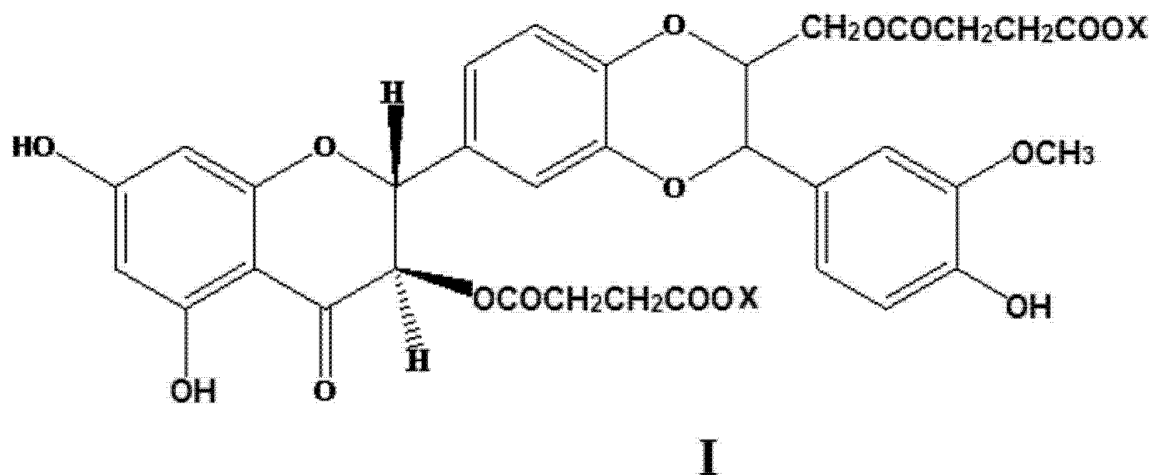
所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

(i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)—甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30°C ;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 $200 \mu\text{g}$ 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 $20 \mu\text{g/ml}$ 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 $20 \mu\text{l}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6~9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0;

(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取本发明化合物适量,加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1ml ,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用本发明所述(i)色谱条件与系统适用性试验中的方法,取对照溶液 $20 \mu\text{l}$ 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;

精密量取供试品溶液和对照溶液各 $20\ \mu\text{L}$, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍; 供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计; 记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积, E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数, 即为本发明化合物色谱纯度, 另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比。

13. 根据权利要求 1 至 12 的化合物, 其为下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体的组合:



其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上, 或者该化合物的色谱纯度大于 95%;

该化合物照高效液相色谱法测定, 在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四个主要色谱峰;

该化合物照高效液相色谱法测定, 以水飞蓟宾为参比品, 并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰, 该化合物的第一色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 $1.7\sim 2.4$, 该化合物的第二色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 $1.85\sim 2.55$, 该化合物的第三色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 $2.4\sim 3.2$, 该化合物的第四色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 $2.8\sim 3.6$;

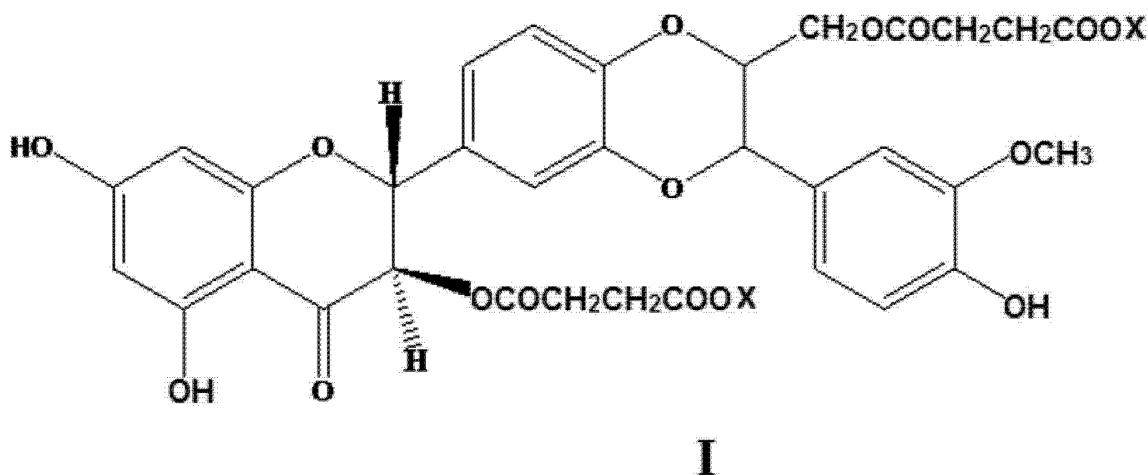
所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

(i) 色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50 : 50) 为流动相, 检测波长为 288nm , 柱温为 30°C ; 取参比品水飞蓟宾适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 $200\ \mu\text{g}$ 的溶液, 作为参比品贮备液; 另取该参比品贮备液用流动相稀释成 $20\ \mu\text{g/ml}$ 的溶液, 作为系统适用性试验溶液, 取该系统适用性试验溶液 $20\ \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰, 调整 A 峰的保留时间在 $6\sim 9\text{min}$ 之间, 并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.0;

(iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定: 取本发明化合物适量, 加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品贮备液; 精密量取供试品贮备液 1ml , 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物浓度约为 $50\ \mu\text{g/ml}$ 的溶液, 作为供试品测试溶液 I; 另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml , 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 $50\ \mu\text{g/ml}$ 的溶

液,作为供试品测试溶液 II;精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II,注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明化合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间,用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间,用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间,用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间,用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

14. 根据权利要求 1 至 13 的化合物, 其为下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体的组合:



其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子；

所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上, 或者该化合物的色谱纯度大于 95%;

该化合物照高效液相色谱法测定,在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰的四个主要色谱峰:

所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8, 并且其中所述第二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍; 所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于 1.0, 并且其中所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍, 所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;

该化合物照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,该化合物的第一色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.7~2.4,该化合物的第二色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.85~2.55,该化合物的第三色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.4~3.2,该化合物的第四色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.8~3.6 ;

所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的：

(i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)—甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30°C;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μg 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μg/ml 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0;

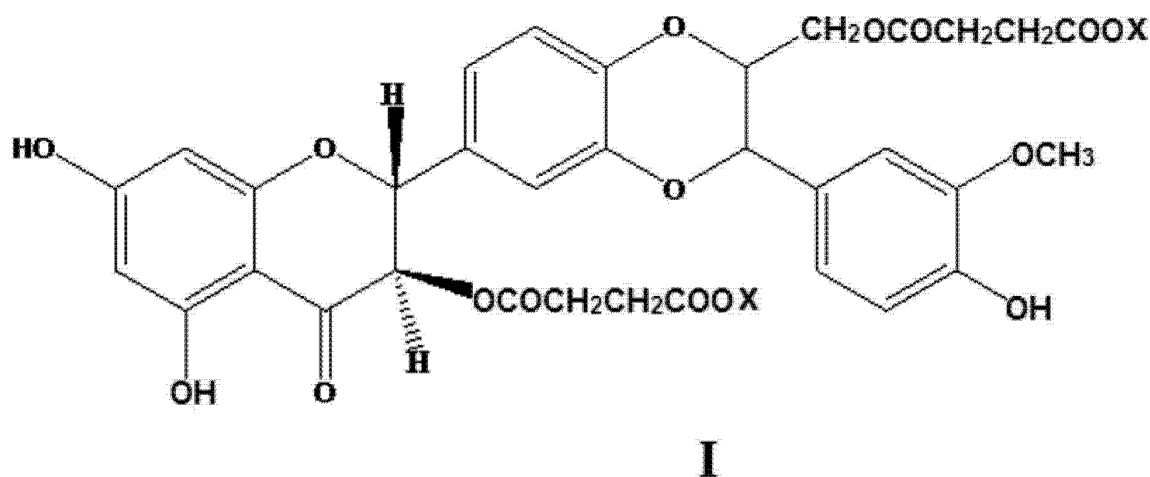
(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取本发明化合物适量,加流动相溶解并制成浓度为

0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用本发明所述(i)色谱条件与系统适用性试验中的方法,取对照溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计;记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积,E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数,即为本发明化合物色谱纯度,另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比;

(iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定:取本发明化合物适量,加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品贮备液;精密量取供试品贮备液 1ml,置 10ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成包含本发明化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液,作为供试品测试溶液 I;另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml,置 10ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成包含本发明化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μ g/ml 的溶液,作为供试品测试溶液 II;精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II,注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明化合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间,用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间,用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间,用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间,用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

15. 一种药物组合物,其中包含权利要求 1-14 任一项所述化合物以及任选的药用辅料。

16. 根据权利要求 15 的药物组合物,其中包含作为活性成分的下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体以及任选的药用辅料:



其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

该药物组合物照高效液相色谱法测定,不计辅料色谱峰,在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四个主要色谱峰,所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8,并且其中所述第二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍;所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于

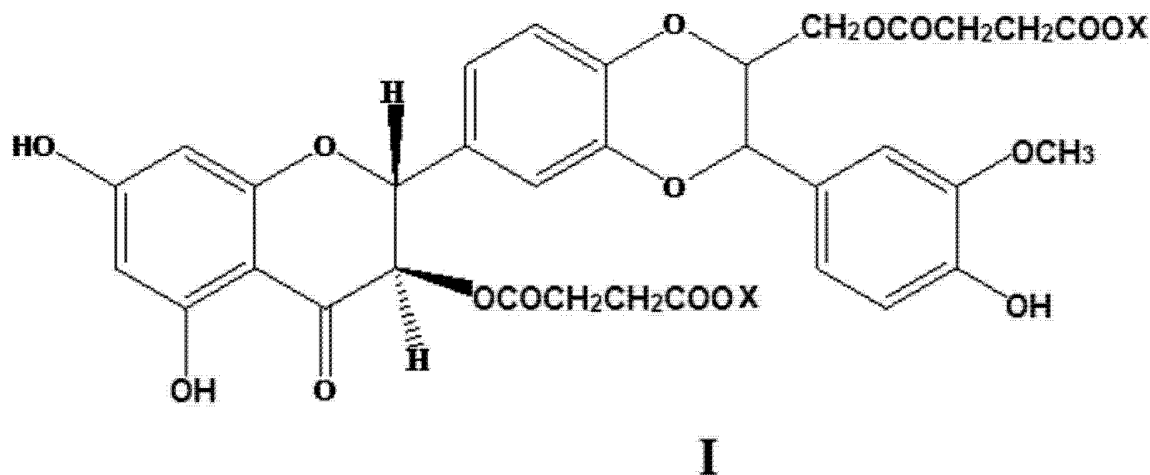
1.0, 并且其中所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍, 所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;

所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

(i) 色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50 : 50) 为流动相, 检测波长为 288nm, 柱温为 30° C; 取参比品水飞蓟宾适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μ g 的溶液, 作为参比品贮备液; 另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μ g/ml 的溶液, 作为系统适用性试验溶液, 取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰, 调整 A 峰的保留时间在 6~9min 之间, 并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0;

(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法: 取本发明药物组合物适量, 加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取 1ml, 置 100ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液; 采用本发明所述 (i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法, 取对照溶液 20 μ l 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%; 精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ l, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍; 供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计, 辅料峰亦忽略不计; 记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积, E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数, 即为本发明药物组合物色谱纯度, 另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比。

17. 根据权利要求 15 至 16 的药物组合物, 其中包含作为活性成分的下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体以及任选的药用辅料:



其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

该药物组合物照高效液相色谱法测定, 不计辅料色谱峰, 在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四个主要色谱峰;

该药物组合物照高效液相色谱法测定, 以水飞蓟宾为参比品, 并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰, 该药物组合物的第一色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.7~2.4, 该药物组合物的第二色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.85~2.55, 该药物组合物

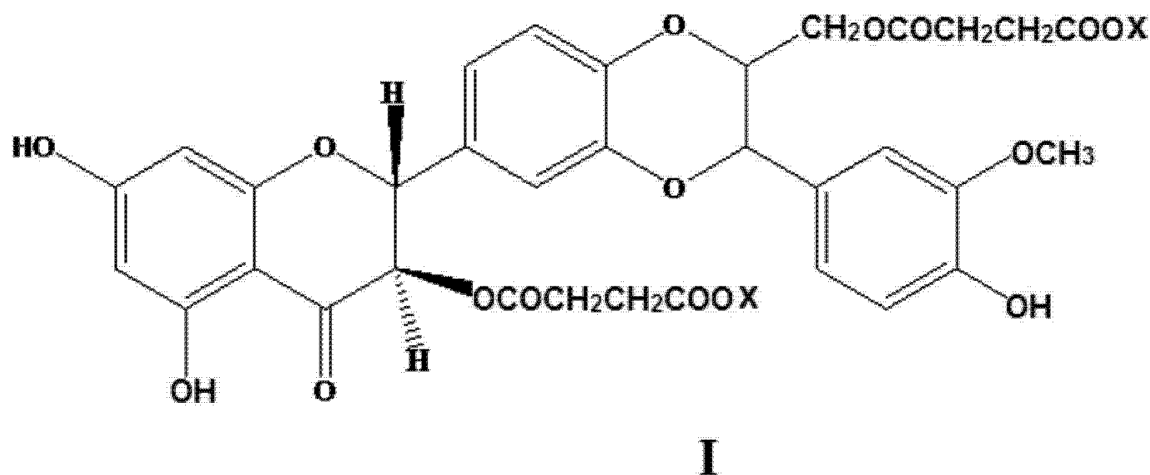
的第三色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.4~3.2, 该药物组合物的第四色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.8~3.6;

所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

(i) 色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50 : 50) 为流动相, 检测波长为 288nm, 柱温为 30° C; 取参比品水飞蓟宾适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μ g 的溶液, 作为参比品贮备液; 另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μ g/ml 的溶液, 作为系统适用性试验溶液, 取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰, 调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间, 并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0;

(iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定: 取本发明药物组合物适量, 加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品贮备液; 精密量取供试品贮备液 1ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含含式 I 化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 I; 另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含含式 I 化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 II; 精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍; 记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明药物组合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间, 用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间, 用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间, 用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间, 用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

18. 根据权利要求 15 至 17 的药物组合物, 其中包含作为活性成分的下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体以及任选的药用辅料:



其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

该药物组合物照高效液相色谱法测定, 不计辅料色谱峰, 在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四个主要色谱峰;

所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8, 并且其中所述第二色谱峰峰面

积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍;所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于 1.0,并且其中所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍,所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;

该药物组合物照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,该药物组合物的第一色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.7~2.4,该药物组合物的第二色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.85~2.55,该药物组合物的第三色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.4~3.2,该药物组合物的第四色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.8~3.6;

所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

(i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)–甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30°C;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μg 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μg/ml 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6–9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0;

(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取本发明药物组合物适量,加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用本发明所述(i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法,取对照溶液 20 μl 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计,辅料峰亦忽略不计;记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积, E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数,即为本发明药物组合物色谱纯度,另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比;

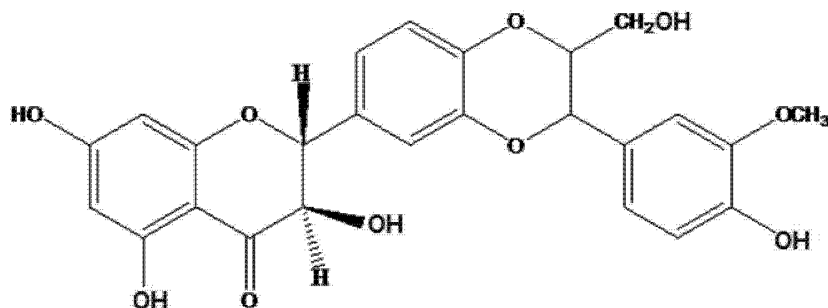
(iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定:取本发明药物组合物适量,加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品贮备液;精密量取供试品贮备液 1ml,置 10ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成包含含式 I 化合物浓度约为 50 μg/ml 的溶液,作为供试品测试溶液 I;另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml,置 10ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成包含含式 I 化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μg/ml 的溶液,作为供试品测试溶液 II;精密量取 20 μl 的供试品测试溶液 II,注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明药物组合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间,用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间,用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间,用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间,用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

19. 根据权利要求 15 至 18 的药物组合物,其照高效液相色谱法测定,不计辅料色谱峰,

在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰的四个主要色谱峰,所述第一色谱峰、第二色谱峰、第三色谱峰和第四色谱峰四者的峰面积之和占总峰面积的 95% 以上。

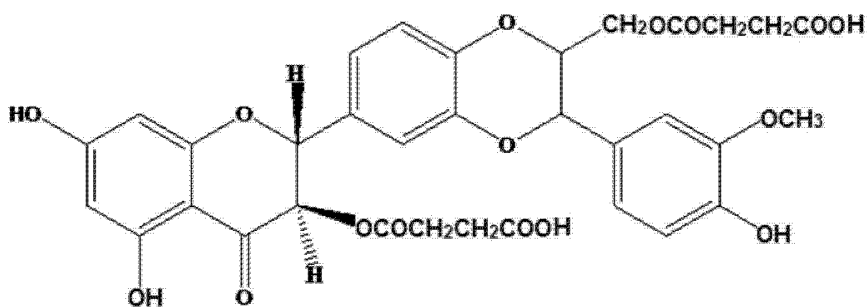
20. 制备权利要求 1 至 14 任一项所述化合物的方法,其包括以下步骤:

(a) 酯化步骤:使下式所示水飞蓟宾:



在适宜的有机溶剂中溶解,加入琥珀酸酐,在 30~80° C 温度 (例如 35~50° C) 下反应 5~50 小时 (例如 10~40 小时,例如 15~30 小时);

(b) 水解步骤:向步骤 (a) 所得反应液中加入适量 50~90% 乙醇 (例如 65~85% 乙醇),继续在 30~80° C 温度 (例如 35~50° C) 下搅拌反应至水解完全;降温至室温,加入 2~8mol/L 盐酸适量、以及乙酸乙酯适量,用 pH 试纸测该混合物呈酸性后,加水,搅拌 5~60min,静置分层后,弃去下层水层,有机层用水洗涤,直到水层显示呈中性,静置分层,有机层用活性炭脱色,过滤,收集滤液,除去溶剂,得到水飞蓟宾 3- 位羟基和 12- 位羟甲基分别与琥珀酸形成偏酯的下式所示水飞蓟宾二偏琥珀酸酯:



(c) 分离步骤:使用制备型液相色谱法进行分离,将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱填料 (例如填料粒径为 10 μm,例如可以是品牌为 Daiso SP-100-10-ODS-P 的 C18 色谱填料) 装入动态轴向压缩柱制备型液相色谱系统中 (例如可以是江苏汉邦科技有限公司的 DAC-HB80 动态轴向压缩柱系统),以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50:50) 为流动相,检测波长为 288nm;将步骤 (b) 所得产物用流动相溶解,用进样泵进样,洗脱并记录色谱图至全部色谱峰完全洗脱出来,以最后一个色谱峰的保留时间为基准,截取相对保留时间在 0.4~0.7 之间洗脱出来的两个色谱峰以及相对保留时间在 0.7~1.0 之间洗脱出来的两个色谱峰的共包含四个色谱峰的洗脱液;

(d) 提取步骤:量取 1 体积的步骤 (c) 所得洗脱液至分液漏斗中,再加入 0.5~2 体积的纯水,混合后,再加入 0.5~2 体积的乙酸乙酯,振摇萃取,静置分层,弃去下层废液;上层乙酸乙酯层加入 0.5~2 体积纯水,振摇萃取,静置分层,弃去下层水层,如此重复 2 次或以上,乙酸乙酯层于 30~50° C 除去溶剂 (例如 35~50° C,例如约 40° C 旋转蒸发除溶剂),干燥 (例如于 50~70° C 真空干燥),得到水飞蓟宾二偏琥珀酸酯;和任选的

(e) 成盐步骤:将步骤(d)所得水飞蓟宾二偏琥珀酸酯溶解于有机溶剂(例如甲醇、无水乙醇)中,再加入碱金属氢氧化物或者碱土金属氢氧化物的溶液(例如溶解于有机溶剂(例如甲醇、无水乙醇)中的溶液),搅拌使反应,析出白色固体,过滤,干燥,得到水飞蓟宾二偏琥珀酸酯的碱金属盐或者碱土金属盐。

21. 权利要求 1 至 14 任一项所述化合物在制备用于治疗、改善或预防肝脏疾病的药物中的用途。

22. 根据权利要求 21 的用途,其中所述肝脏疾病选自:因鬼笔鹅膏引起的急性肝中毒,急慢性肝炎,初期肝硬化,中毒性肝损害,脂肪肝所致肝功能异常,酒精肝所致肝功能异常。

水飞蓟宾二偏琥珀酸酯及其药用盐

技术领域

[0001] 本发明属医药技术领域,涉及用于治疗肝病的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯及其药用盐,以及其制备方法,还涉及一种包含该水飞蓟宾二偏琥珀酸酯或其药用盐的药物组合物。本发明的药物组合物具有期望的良好性质。

背景技术

[0002] 近年来,随着人们生活水平的提高和饮食结构的变化,我国脂肪肝发病率已接近乙肝病毒携带率,并呈明显上升趋势。其中,30 ~ 40 岁的男性是脂肪肝患者大军中的“主力”,基本占到全部脂肪肝患者的 1/4。据估计,现在脂肪肝发病率较 20 世纪 80 年代以前增加了 30 倍左右。据报道 15% 脂肪肝患者会发展成肝硬化,3% 的脂肪肝患者会死于肝衰竭。因此脂肪肝及早预防和治疗具有非常重要的意义。

[0003] 肝炎是指由于不同病因的肝脏炎症,日常生活中病毒性肝炎最常见,它具有发病率高,病程长,病势反复性强,危害性大的特点,若不进行及时治疗,有转变为肝硬化及肝癌的可能。我国又是肝炎高发的国家,据统计,我国有超过 1.2 亿人感染乙肝病毒,慢性乙肝病人约 3000 万,3800 万人携带丙肝病毒,仅从乙肝病毒携带者的数字来说,差不多占国民十分之一。

[0004] 目前,虽然肝病药物种类很多,但尚无一种药物能真正杀灭乙肝病毒。目前多采用抑制病毒复制、或改善症状、控制病情发展两种治疗思路。前者虽然能快速抑制病毒复制,但存在长期用药风险。如肝病一线药物拉米夫定虽可以将乙肝病毒抑制在较低水平($\text{DNA} < 10^3$ 拷贝 /ml),但需要长期用药(通常 2-3 年),并不能随意停用,不仅费用高昂,而且长期用药直接导致部分患者乙肝病毒出现耐药变异株,病情更趋复杂。因此,研制一种能有效改善肝病症状、适合长期用药、且价格合理的药物,用于肝脏疾病的预防和治疗,符合当前的国情,满足临床需要。

[0005] 水飞蓟,菊科,是优良的护肝植物,其主要成分为水飞蓟宾(silybin)。药理实验证明,水飞蓟宾有保护肝细胞膜,改善肝功能的作用,预防多种肝脏毒物所致的肝损伤,促进肝细胞再生,主要用于治疗各种急慢性肝炎、初期肝硬化和肝中毒等症。

[0006] 水飞蓟宾非常难溶于水,限制了其口服吸收,成盐后水溶性明显增加。目前,主要研究集中在水飞蓟宾葡甲胺盐和水飞蓟宾磷脂复合物。西利宾安片的主要成分即是水飞蓟宾葡甲胺,但仍存生物利用度不高的缺点。水林佳的主要成分是水飞蓟宾卵磷脂复合物,虽然通过改善脂溶性在一定程度上提高了生物利用度,但是其水溶性仍较差。

[0007] 影响体内生物利用度的因素包括剂型因素和生理因素两个方面:剂型因素如药物的脂溶性、水溶性和 pKa 值,药物的剂型特性(如崩解时限、溶出速率)及一些工艺条件的差别;生理因素包括胃肠道内液体的作用,药物在胃肠道内的转运情况,吸收部位的表面积与局部血流,药物代谢的影响,肠道菌株及某些影响药物吸收的疾病等。由此,一个药物在体内的吸收情况不仅与药物本身的脂溶性有关,而且水溶性也是一关键参数。

[0008] 水飞蓟宾二偏琥珀酸酯钠盐是一种水飞蓟宾的衍生物,其在水溶性方面显著优于

水飞蓟宾,据信其具有降低血清中游离脂肪酸和甘油三酯的含量、调节磷脂代谢的紊乱、清除氧自由基、抑制脂质过氧化、稳定肝细胞膜、减轻脂肪变性、对抗肝细胞坏死的功能,可用于鬼笔鹅膏引起的急性肝中毒的治疗,还可用于急性、慢性肝损伤的治疗,以及用于脂肪肝和酒精肝所造成的肝功能异常的恢复。

[0009] CN101302212A 公开了水飞蓟宾二偏琥珀酸酯及其盐类的制备方法和用途,这种据说有效的制备方法是使水飞蓟宾在适合的有机溶剂中与丁二酸酐反应合成得到水飞蓟宾丁二酯单甲酯,然后在特定的介质中与氢氧化钠反应生成氟苯尼考丁二酸酯钠盐而实现的。

[0010] CN101244041A 公开了一种用于预防及治疗急性肝损伤的药物及其制备方法。该发明专利文献具体涉及一种成分为水飞蓟宾丁二酸钠冻干粉针的制备方法,包括以下步骤:(1) 将水飞蓟宾丁二酸钠溶解于注射用水中,充分搅拌成溶液;(2) 于上述溶液加入甘露醇或乳糖使溶解;(3) 将上述溶解用活性炭加热脱色并用盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节 pH7~9,过滤;(4) 滤液无菌分装,冷冻干燥,即得。

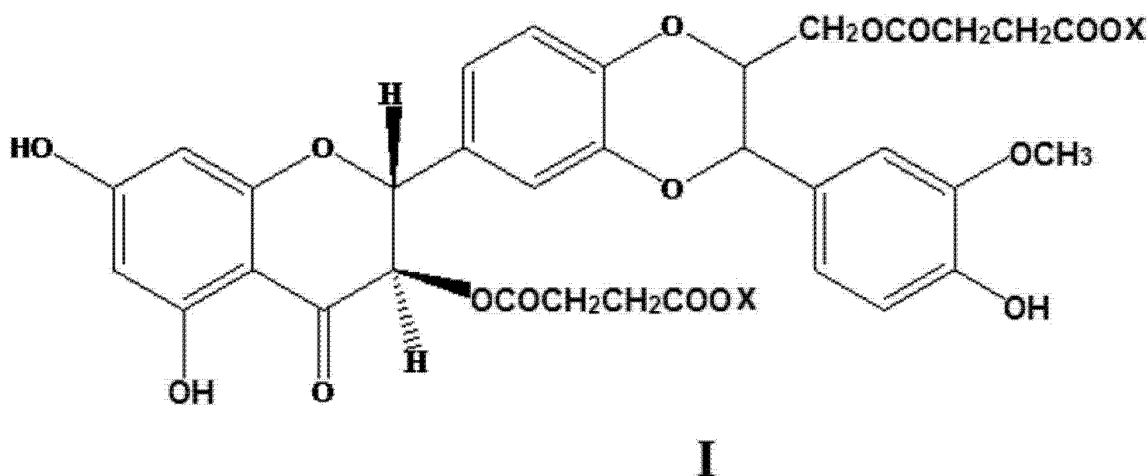
[0011] 尽管人们在使用水飞蓟宾产品例如水飞蓟宾或其衍生物如水飞蓟宾二偏琥珀酸酯或其盐等方面,然而人们仍然期待有一种改进的方法来治疗或预防肝脏等与水飞蓟宾或其衍生物所治疗的相关疾病,特别是期待有一种改进的方法使用水飞蓟宾二偏琥珀酸酯或其盐来治疗与肝脏相关的疾病。

发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供一种改进的方法来治疗或预防肝脏等与水飞蓟宾或其衍生物所治疗的相关疾病,特别是期待有一种改进的方法使用水飞蓟宾二偏琥珀酸酯(亦可称为水飞蓟宾二琥珀酸半酯)或其盐来治疗与肝脏相关的疾病。本发明人出人意料的发现,本发明水飞蓟宾二偏琥珀酸或其盐显示出积极的生物和/或物理和/或化学方面的效果。本发明基于此发现而得以完成。

[0013] 因此,本发明第一方面提供了一种化合物,其为下述式 I 化合物的四种异构体的组合:

[0014]



[0015] 其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子。

[0016] 就本发明而言,本发明第一方面所述化合物实质是式 I 化合物的四种异构体的混

合物,因此严格来讲,本发明第一方面所述化合物并非单一的一种化学单体,而是由四种具有相同化学结构但不同空间取向的异构体组成的混合物。然而作为化合物,其主体部分是具有式 I 结构的几种异构体,而不具式 I 结构的物质可以理解为本发明化合物中可能存在的不可避免的杂质。

[0017] 根据本发明第一方面的化合物,其中所述金属离子是碱金属离子或者碱土金属离子。

[0018] 根据本发明第一方面的化合物,其中 X 各自独立地表示氢、钠离子、钾离子、锂离子、镁离子、或钙离子。在一个实施方案中,其中 X 表示氢、钠离子、钾离子、锂离子、镁离子、或钙离子。

[0019] 根据本发明第一方面的化合物,其中包含式 I 化合物的四种异构体。

[0020] 根据本发明第一方面的化合物,其中包含式 I 化合物的四种异构体,所述异构体是由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的。

[0021] 根据本发明第一方面的化合物,其中包含式 I 化合物的四种异构体,所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上(例如 97% 以上,例如 98% 以上,例如 99% 以上)。从化学原料的角度来讲,此参数通常与本文所述色谱纯度有相同或接近的含义而使得二者可互换使用。

[0022] 根据本发明第一方面的化合物,照高效液相色谱法测定,其在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为 E 峰或 E) 和第二色谱峰(其在本发明中可简称为 F 峰或 F) 以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为 G 峰或 G) 和第四色谱峰(其在本发明中可简称为 H 峰或 H) 的四个主要色谱峰。该四个主要色谱峰 E 峰和 F 峰以及 G 峰和 H 峰表示本发明化合物中的四个式 I 化合物的不同异构体。术语“主要色谱峰”表示色谱图中期望的物质所呈现的色谱峰,而不包括流动相溶剂、杂质和另外一些特别添加的物质(例如辅料)等所形成的色谱峰,通常而言,色谱图中各“主要色谱峰”峰面积总和占全部色谱峰(辅料、溶剂等除外)面积总和的百分数通常大于 50%,更通常大于 75%,更通常大于 90%,更通常大于 95%,更通常大于 98%,例如大于 98.5%。

[0023] 根据本发明第一方面的化合物,照高效液相色谱法测定,其在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为 E 峰或 E) 和第二色谱峰(其在本发明中可简称为 F 峰或 F) 以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为 G 峰或 G) 和第四色谱峰(其在本发明中可简称为 H 峰或 H) 的四个主要色谱峰,所述第一色谱峰和第二色谱峰以及第三色谱峰和第四色谱峰四者的峰面积之和占总峰面积的 95% 以上(例如 97% 以上,例如 98% 以上,例如 99% 以上)(其亦可称为本发明化合物的色谱纯度)。术语“总峰面积”表示色谱图中期望的物质以及主要杂质所呈现的全部色谱峰面积之和,而不包括流动相溶剂和另外一些特别添加的物质(例如辅料)等所形成的色谱峰。术语“主要杂质”表示含量较高的杂质,通常而言是指峰面积大于期望物质色谱峰(例如上述 G 峰和 / 或 H 峰)面积的 0.0001%(特别是大于 0.001%,特别是大于 0.01%,特别是大于 0.05%)的那些杂质。

[0024] 根据本发明第一方面的化合物,照高效液相色谱法测定,其在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为 E 峰或 E) 和第二色谱峰(其在本发明中可简称为 F 峰或 F) 以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为 G 峰或 G) 和第四色谱峰(其在本发明中可简称为 H 峰或 H) 的四个主要色谱峰。在一个实施方案中,所述第

二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的0.5~1.5倍(亦可表示为 $AR(F/E)=0.5\sim 1.5$,例如0.7~1.3倍,例如0.8~1.2倍,其中缩写“AR”表示面积,缩写“AR(F/E)”表示F峰峰面积除以E峰峰面积,亦可理解为两个峰的峰面积比,在本发明中有类似缩写时具有相类似的含义)。在一个实施方案中,所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的4.5~13.5倍,例如6.3~11.7倍,例如7.2~10.8倍。在一个实施方案中,所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的4.5~13.5倍,例如6.3~11.7倍,例如7.2~10.8倍。在一个实施方案中,所述E峰、F峰、G峰、H峰四者峰面积比为1:(0.5~1.5):(4.5~13.5):(4.5~13.5);例如所述E峰、F峰、G峰、H峰四者峰面积比为1:(0.7~1.3):(6.3~11.7):(6.3~11.7);例如所述E峰、F峰、G峰、H峰四者峰面积比为1:(0.8~1.2):(7.2~10.8):(7.2~10.8)。上述各峰的峰面积比可以参照本文所述“(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法”中所得色谱图中E峰、F峰、G峰和H峰的峰面积计算获得。

[0025] 根据本发明第一方面的化合物,其中所述第一色谱峰和第二色谱峰在所述高效液相色谱法测定条件下二者的分离度大于0.8(例如大于1.0,例如大于1.2,例如大于1.5);和/或,其中所述第三色谱峰和第四色谱峰在所述高效液相色谱法测定条件下二者的分离度大于1.0(例如大于1.25,例如大于1.5,例如大于2.0)。

[0026] 根据本发明第一方面的化合物,其中高效液相色谱法具有使所述第一色谱峰和第二色谱峰能够达到分离度大于0.8(例如大于1.0,例如大于1.2,例如大于1.5)的高效液相色谱法测定条件;和/或,其中高效液相色谱法具有使所述第三色谱峰和第四色谱峰能够达到分离度大于1.0(例如大于1.25,例如大于1.5,例如大于2.0)的高效液相色谱法测定条件。

[0027] 根据本发明第一方面的化合物,照高效液相色谱法测定,其在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为E峰或E)和第二色谱峰(其在本发明中可简称为F峰或F)以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为G峰或G)和第四色谱峰(其在本发明中可简称为H峰或H)的四个主要色谱峰,所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于0.8(例如大于1.0,例如大于1.2,例如大于1.5),所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于1.0(例如大于1.25,例如大于1.5,例如大于2.0)。

[0028] 根据本发明第一方面的化合物,其中所述高效液相色谱法测定的一个典型实例是按包括如下“(i) 色谱条件与系统适用性试验”方式进行的:

[0029] (i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以0.05mol/L磷酸二氢钠溶液(用磷酸调pH值至4.0)—甲醇(50:50)为流动相,检测波长为288nm,柱温为30°C;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每1ml中含水飞蓟宾200μg的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成20μg/ml的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液20μl注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为A峰和B峰的两个主要色谱峰,调整A峰的保留时间在6-9min之间,并且A峰和B峰的分离度应大于1.0(例如大于1.2,例如大于1.5,例如大于2)。本领域技术人员已知,为满足上述A峰和B峰的保留时间和分离度的要求,可以通过适当选择色谱柱的规格和/或调节流动相流速等方式来实现,例如可以使用的色谱柱直径为4.6mm,填充剂粒度可以为5μm,其柱长可以为15~30cm(例如约15cm、20cm、25cm、30cm),流动相流速可以调节在0.8~1.5ml/min的范围内,通过调节柱长和流动

相流速可以容易的实现上述要求。这对于本领域特别是药物分析领域技术人员而言是常规技能。

[0030] 根据本发明第一方面的化合物,其中色谱纯度和峰面积比测定的一个典型实例是按包括如下“(ii) 色谱纯度和峰面积比测定法”方式进行的:

[0031] (ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取本发明化合物适量,加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用本发明所述(i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法,取对照溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计;记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积,E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数,即为本发明化合物色谱纯度,另外分别以 F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比。

[0032] 根据本发明第一方面的化合物,照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,本发明化合物的第一色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.7~2.4(例如 1.8~2.3,例如 1.85~2.25,例如 1.9~2.2,例如 1.95~2.15),本发明化合物的第二色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.85~2.55(例如 1.95~2.45,例如 2.0~2.4,例如 2.05~2.35,例如 2.1~2.3),本发明化合物的第三色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.4~3.2(例如 2.45~3.15,例如 2.5~3.1,例如 2.55~3.05,例如 2.6~3.0),本发明化合物的第四色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.8~3.6(例如 2.85~3.55,例如 2.9~3.5,例如 2.95~3.45,例如 3.0~3.4)。

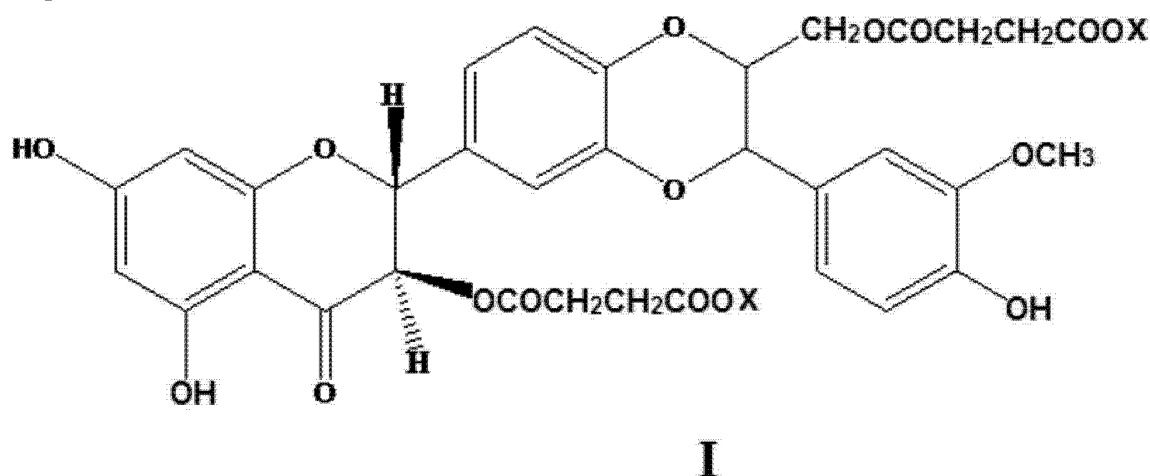
[0033] 根据本发明第一方面的化合物,照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,本发明化合物的第一色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.7~2.4(例如 1.8~2.3,例如 1.85~2.25,例如 1.9~2.2,例如 1.95~2.15),本发明化合物的第二色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.85~2.55(例如 1.95~2.45,例如 2.0~2.4,例如 2.05~2.35,例如 2.1~2.3),本发明化合物的第三色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.4~3.2(例如 2.45~3.15,例如 2.5~3.1,例如 2.55~3.05,例如 2.6~3.0),本发明化合物的第四色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.8~3.6(例如 2.85~3.55,例如 2.9~3.5,例如 2.95~3.45,例如 3.0~3.4),所述高效液相色谱法测定相对保留时间是按包括如下的方式进行的:

[0034] (i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)–甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30°C;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μ g 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μ g/ml 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6–9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0(例如大于 1.2,例如大于 1.5,例如大于 2);

[0035] (iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定: 取本发明化合物适量, 加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品贮备液; 精密量取供试品贮备液 1ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 I; 另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 II; 精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍; 记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明化合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间, 用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间, 用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间, 用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间, 用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

[0036] 根据本发明第一方面的化合物, 其为下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体的组合:

[0037]



[0038] 其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

[0039] 所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上, 或者该化合物的色谱纯度大于 95%;

[0040] 该化合物照高效液相色谱法测定, 在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰 (其在本发明中可简称为 E 峰或 E) 和第二色谱峰 (其在本发明中可简称为 F 峰或 F) 以及第三色谱峰 (其在本发明中可简称为 G 峰或 G) 和第四色谱峰 (其在本发明中可简称为 H 峰或 H) 的四个主要色谱峰, 所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8, 所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于 1.0, 并且其中所述第二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍 (例如 0.7~1.3 倍, 例如 0.8~1.2 倍), 所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍 (例如 6.3~11.7 倍, 例如 7.2~10.8 倍), 所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍 (例如 6.3~11.7 倍, 例如 7.2~10.8 倍);

[0041] 所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

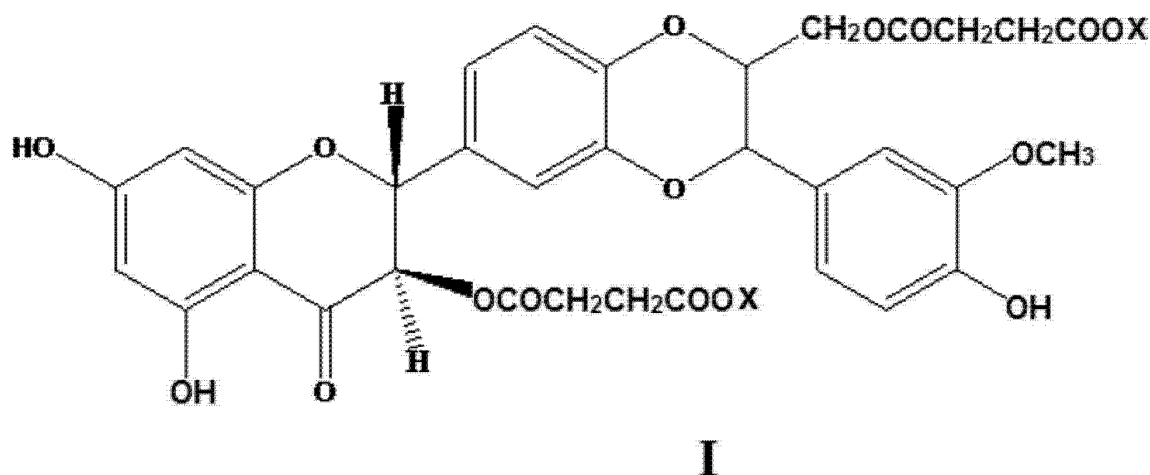
[0042] (i) 色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50:50) 为流动相, 检测波

长为 288nm,柱温为 30° C;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μg 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μg/ml 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.0;

[0043] (ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取本发明化合物适量,加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用本发明所述 (i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法,取对照溶液 20 μl 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计;记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积,E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数,即为本发明化合物色谱纯度,另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比。

[0044] 根据本发明第一方面的化合物,其为下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体的组合:

[0045]



[0046] 其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

[0047] 所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上,或者该化合物的色谱纯度大于 95%;

[0048] 该化合物照高效液相色谱法测定,在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为 E 峰或 E)和第二色谱峰(其在本发明中可简称为 F 峰或 F)以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为 G 峰或 G)和第四色谱峰(其在本发明中可简称为 H 峰或 H)的四个主要色谱峰;

[0049] 该化合物照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,该化合物的第一色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.7~2.4,该化合物的第二色谱峰的相对保留时间(RRt)为 1.85~2.55,该化合物的第三色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.4~3.2,该化合物的第四色谱峰的相对保留时间(RRt)为 2.8~3.6;

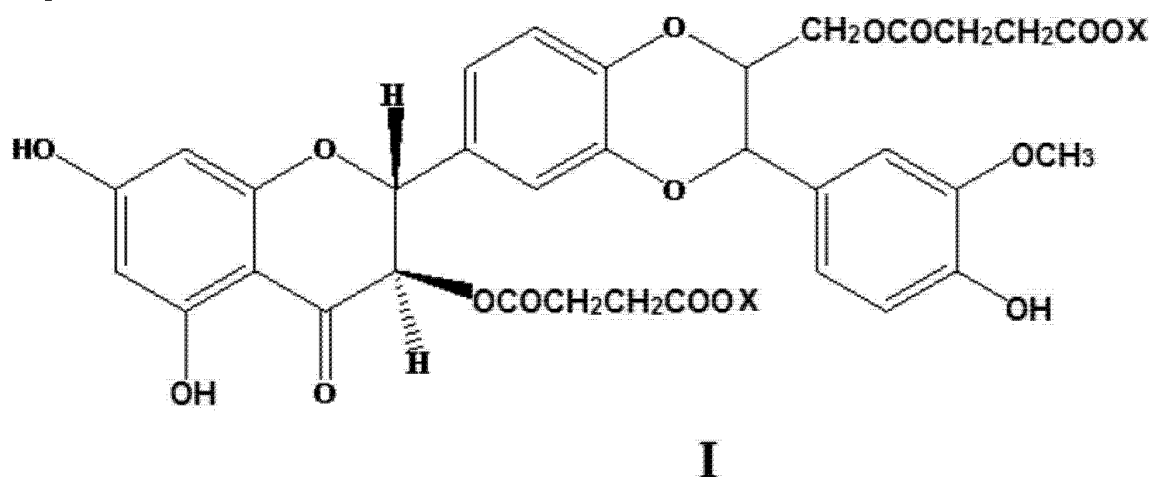
[0050] 所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的：

[0051] (i) 色谱条件与系统适用性试验：用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱，以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液（用磷酸调 pH 值至 4.0）—甲醇（50 : 50）为流动相，检测波长为 288nm，柱温为 30° C；取参比品水飞蓟宾适量，加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μ g 的溶液，作为参比品贮备液；另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μ g/ml 的溶液，作为系统适用性试验溶液，取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪，记录色谱图；该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰，调整 A 峰的保留时间在 6–9min 之间，并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0；

[0052] (iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定：取本发明化合物适量，加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液，作为供试品贮备液；精密量取供试品贮备液 1ml，置 10ml 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，制成包含本发明化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液，作为供试品测试溶液 I；另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml，置 10ml 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，制成包含本发明化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μ g/ml 的溶液，作为供试品测试溶液 II；精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II，注入液相色谱仪，记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍；记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明化合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间，用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间，用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间，用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间，用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

[0053] 根据本发明第一方面的化合物，其为下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体的组合：

[0054]



[0055] 其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子；

[0056] 所述四种异构体占该化合物总重量的 95% 以上，或者该化合物的色谱纯度大于 95%；

[0057] 该化合物照高效液相色谱法测定，在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰（其在本发明中可简称为 E 峰或 E）和第二色谱峰（其在本发明中可简称为 F 峰或 F）以及第三色谱峰（其在本发明中可简称为 G 峰或 G）和第四色谱峰（其在本发明中可简称为 H 峰或 H）的四个主要色谱峰；

[0058] 所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8, 并且其中所述第二色谱峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍; 所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于 1.0, 并且其中所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍, 所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;

[0059] 该化合物照高效液相色谱法测定, 以水飞蓟宾为参比品, 并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰, 该化合物的第一色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.7~2.4, 该化合物的第二色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.85~2.55, 该化合物的第三色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.4~3.2, 该化合物的第四色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.8~3.6;

[0060] 所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

[0061] (i) 色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50:50) 为流动相, 检测波长为 288nm, 柱温为 30°C; 取参比品水飞蓟宾适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μ g 的溶液, 作为参比品贮备液; 另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μ g/ml 的溶液, 作为系统适用性试验溶液, 取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰, 调整 A 峰的保留时间在 6~9min 之间, 并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0;

[0062] (ii) 色谱纯度和峰面积比测定法: 取本发明化合物适量, 加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取 1ml, 置 100ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液; 采用本发明所述 (i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法, 取对照溶液 20 μ l 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%; 精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ l, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍; 供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计; 记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积, E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数, 即为本发明化合物色谱纯度, 另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比;

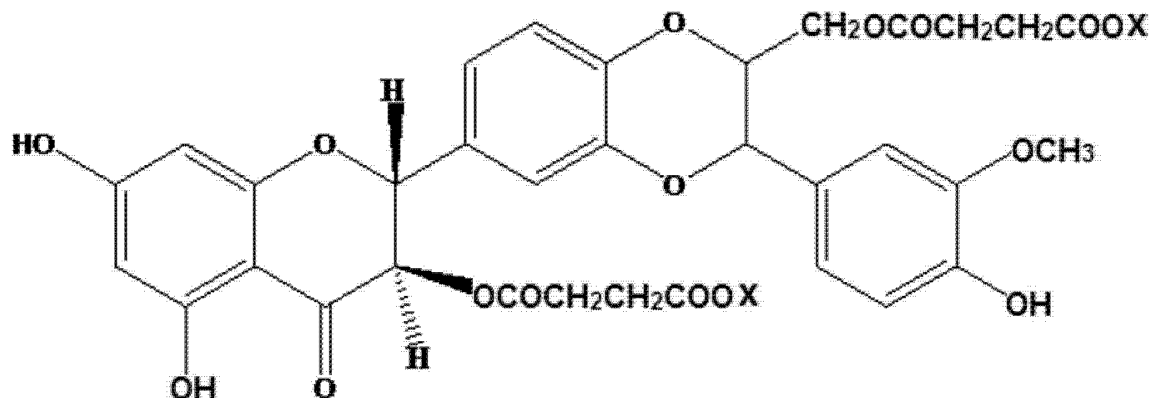
[0063] (iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定: 取本发明化合物适量, 加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品贮备液; 精密量取供试品贮备液 1ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 I; 另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 II; 精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍; 记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明化合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间, 用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间, 用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间, 用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间, 用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

[0064] 本发明第二方面提供了一种药物组合物, 其中包含本发明第一方面任一实施方案所述化合物以及任选的药用辅料。在一个实施方案中, 作为活性成分的所述化合物包含本

发明式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体。在一个实施方案中, 该药物组合物中四种异构体占该药物组合物总重量的 1-99%。

[0065] 根据本发明第二方面的药物组合物, 其中包含作为活性成分的下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体以及任选的药用辅料:

[0066]



I

[0067] 其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

[0068] 该药物组合物照高效液相色谱法测定, 不计辅料色谱峰, 在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰 (其在本发明中可简称为 E 峰或 E) 和第二色谱峰 (其在本发明中可简称为 F 峰或 F) 以及第三色谱峰 (其在本发明中可简称为 G 峰或 G) 和第四色谱峰 (其在本发明中可简称为 H 峰或 H) 的四个主要色谱峰,

[0069] 所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8, 并且其中所述第二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍; 所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于 1.0, 并且其中所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍, 所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;

[0070] 所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

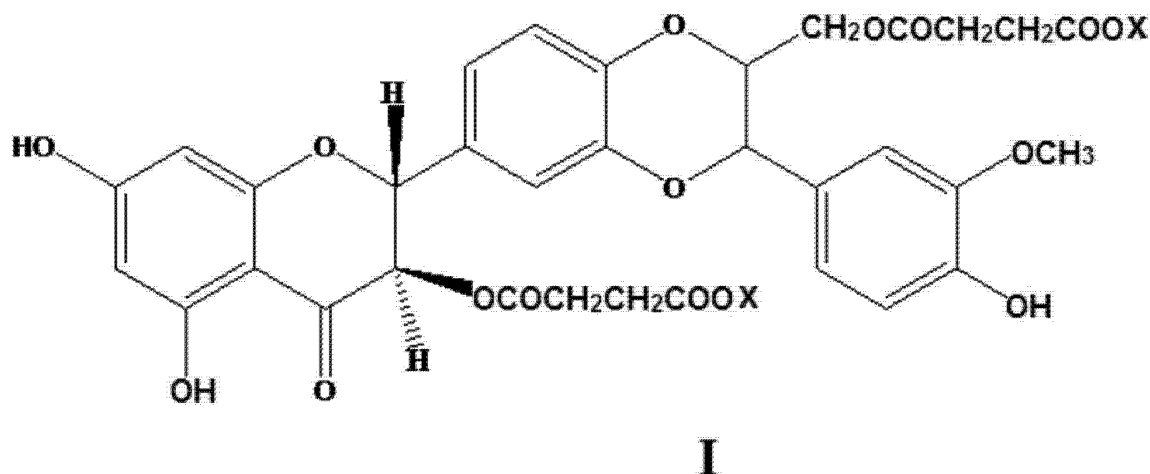
[0071] (i) 色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50:50) 为流动相, 检测波长为 288nm, 柱温为 30°C; 取参比品水飞蓟宾适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μg 的溶液, 作为参比品贮备液; 另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μg/ml 的溶液, 作为系统适用性试验溶液, 取该系统适用性试验溶液 20 μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰, 调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间, 并且 A 峰和 B 峰的分离度应大于 1.0;

[0072] (ii) 色谱纯度和峰面积比测定法: 取本发明药物组合物适量, 加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取 1ml, 置 100ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液; 采用本发明所述 (i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法, 取对照溶液 20 μl 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%; 精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μl, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍; 供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计, 辅料峰亦忽略不计; 记录供试品溶液色谱图中主峰

E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积, E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数, 即为本发明药物组合物色谱纯度, 另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比。

[0073] 根据本发明第二方面的药物组合物, 其中包含作为活性成分的下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体以及任选的药用辅料:

[0074]



[0075] 其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

[0076] 该药物组合物照高效液相色谱法测定, 不计辅料色谱峰, 在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰 (其在本发明中可简称为 E 峰或 E) 和第二色谱峰 (其在本发明中可简称为 F 峰或 F) 以及第三色谱峰 (其在本发明中可简称为 G 峰或 G) 和第四色谱峰 (其在本发明中可简称为 H 峰或 H) 的四个主要色谱峰;

[0077] 该药物组合物照高效液相色谱法测定, 以水飞蓟宾为参比品, 并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰, 该药物组合物的第一色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.7~2.4, 该药物组合物的第二色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.85~2.55, 该药物组合物的第三色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.4~3.2, 该药物组合物的第四色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.8~3.6;

[0078] 所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

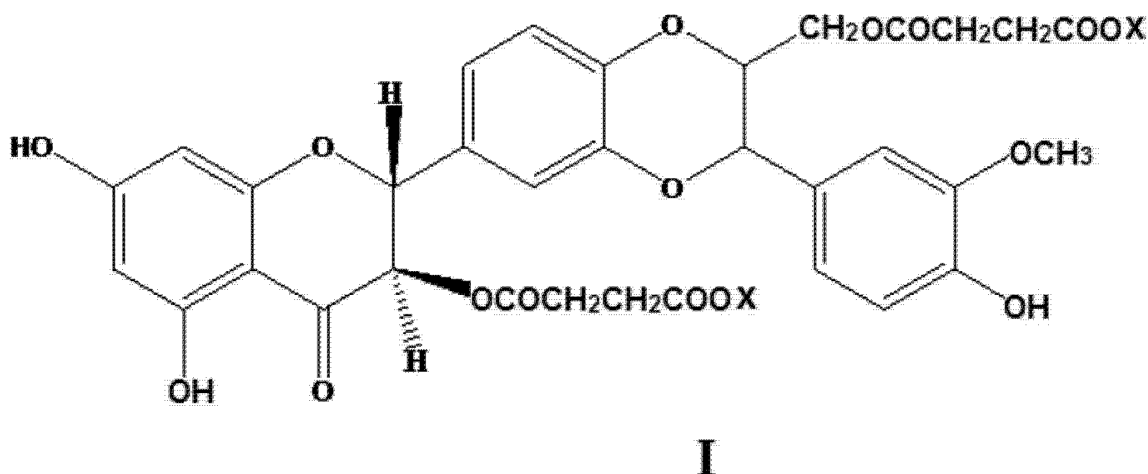
[0079] (i) 色谱条件与系统适用性试验: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50:50) 为流动相, 检测波长为 288nm, 柱温为 30°C; 取参比品水飞蓟宾适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μg 的溶液, 作为参比品贮备液; 另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μg/ml 的溶液, 作为系统适用性试验溶液, 取该系统适用性试验溶液 20 μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰, 调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间, 并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.0;

[0080] (iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定: 取本发明药物组合物适量, 加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液, 作为供试品贮备液; 精密量取供试品贮备液 1ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含含式 I 化合物浓度约为 50 μg/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 I; 另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含含式 I 化合物和参比品水飞蓟宾浓度分

别约为 $50 \mu\text{g/ml}$ 的溶液,作为供试品测试溶液 II;精密量取 $20 \mu\text{l}$ 的供试品测试溶液 II,注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明药物组合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间,用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间,用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间,用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间,用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

[0081] 根据本发明第二方面的药物组合物,其中包含作为活性成分的下述式 I 化合物中由 12- 位和 13- 位手性碳所形成的四种异构体以及任选的药用辅料:

[0082]



[0083] 其中各个 X 各自独立地表示氢或金属离子;

[0084] 该药物组合物照高效液相色谱法测定,不计辅料色谱峰,在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为 E 峰或 E)和第二色谱峰(其在本发明中可简称为 F 峰或 F)以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为 G 峰或 G)和第四色谱峰(其在本发明中可简称为 H 峰或 H)的四个主要色谱峰;

[0085] 所述第一色谱峰和第二色谱峰二者的分离度大于 0.8,并且其中所述第二色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 0.5~1.5 倍;所述第三色谱峰和第四色谱峰二者的分离度大于 1.0,并且其中所述第三色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍,所述第四色谱峰峰面积是所述第一色谱峰峰面积的 4.5~13.5 倍;

[0086] 该药物组合物照高效液相色谱法测定,以水飞蓟宾为参比品,并以水飞蓟宾的 A 峰作为计算相对保留时间的参比峰,该药物组合物的第一色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.7~2.4,该药物组合物的第二色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 1.85~2.55,该药物组合物的第三色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.4~3.2,该药物组合物的第四色谱峰的相对保留时间 (RRt) 为 2.8~3.6;

[0087] 所述高效液相色谱法测定是按如下步骤进行的:

[0088] (i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)—甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30°C ;取参比品水飞蓟宾适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 $200 \mu\text{g}$ 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 $20 \mu\text{g/}$

ml 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.0;

[0089] (ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取本发明药物组合物适量,加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用本发明所述 (i) 色谱条件与系统适用性试验中的方法,取对照溶液 20 μ l 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计,辅料峰亦忽略不计;记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积, E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数,即为本发明药物组合物色谱纯度,另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比;

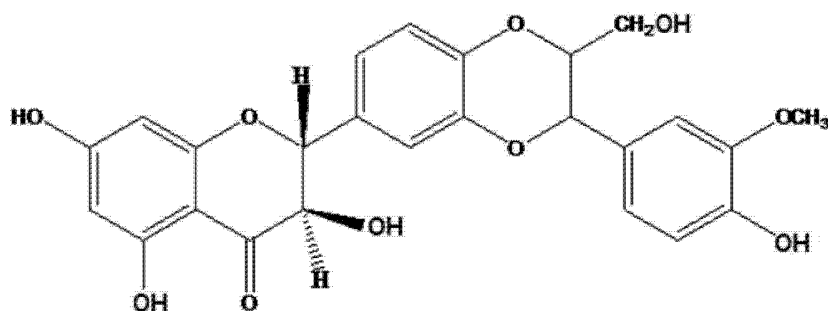
[0090] (iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定:取本发明药物组合物适量,加流动相溶解并制成含式 I 化合物浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品贮备液;精密量取供试品贮备液 1ml,置 10ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成包含含式 I 化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液,作为供试品测试溶液 I;另精密量取供试品贮备液 1ml 和参比品贮备液 2.5ml,置 10ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成包含含式 I 化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μ g/ml 的溶液,作为供试品测试溶液 II;精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II,注入液相色谱仪,记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明药物组合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间,用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间,用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间,用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间,用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

[0091] 根据本发明第二方面的药物组合物,其照高效液相色谱法测定,不计辅料色谱峰,在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为 E 峰或 E)和第二色谱峰(其在本发明中可简称为 F 峰或 F)以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为 G 峰或 G)和第四色谱峰(其在本发明中可简称为 H 峰或 H)的四个主要色谱峰,所述第一色谱峰、第二色谱峰、第三色谱峰和第四色谱峰四者的峰面积之和占总峰面积的 95% 以上。

[0092] 本发明第三方面提供制备本发明第一方面任一实施方案所述化合物的方法,其包括以下步骤:

[0093] (a) 酯化步骤:使下式所示水飞蓟宾:

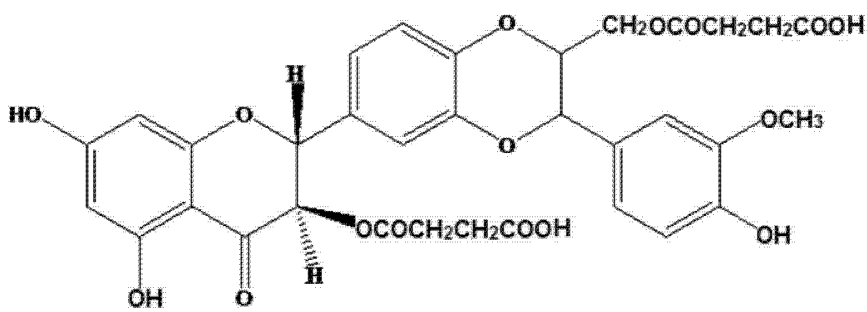
[0094]



[0095] 在适宜的有机溶剂中溶解,加入琥珀酸酐,在 30~80° C 温度(例如 35~50° C)下反应 5~50 小时(例如 10~40 小时,例如 15~30 小时);

[0096] (b) 水解步骤:向步骤(a)所得反应液中加入适量 50~90% 乙醇(例如 65~85% 乙醇),继续在 30~80° C 温度(例如 35~50° C)下搅拌反应至水解完全;降温至室温,加入 2~8mol/L 盐酸适量、以及乙酸乙酯适量,用 pH 试纸测该混合物呈酸性后,加水,搅拌 5~60min,静置分层后,弃去下层水层,有机层用水洗涤,直到水层显示呈中性,静置分层,有机层用活性炭脱色,过滤,收集滤液,除去溶剂,得到水飞蓟宾 3- 位羟基和 12- 位羟甲基分别与琥珀酸形成偏酯的下式所示水飞蓟宾二偏琥珀酸酯:

[0097]



[0098] (c) 分离步骤:使用制备型液相色谱法进行分离,将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱填料(例如填料粒径为 10 μm,例如可以是品牌为 Daiso SP-100-10-ODS-P 的 C18 色谱填料)装入动态轴向压缩柱制备型液相色谱系统中(例如可以是江苏汉邦科技有限公司的 DAC-HB80 动态轴向压缩柱系统),以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm;将步骤(b)所得产物用流动相溶解,用进样泵进样,洗脱并记录色谱图至全部色谱峰完全洗脱出来,以最后一个色谱峰的保留时间为基准,截取相对保留时间在 0.4~0.7 之间洗脱出来的两个色谱峰以及相对保留时间在 0.7~1.0 之间洗脱出来的两个色谱峰的共包含四个色谱峰的洗脱液;

[0099] (d) 提取步骤:量取 1 体积的步骤(c)所得洗脱液至分液漏斗中,再加入 0.5~2 体积的纯水,混合后,再加入 0.5~2 体积的乙酸乙酯,振摇萃取,静置分层,弃去下层废液;上层乙酸乙酯层加入 0.5~2 体积纯水,振摇萃取,静置分层,弃去下层水层,如此重复 2 次或以上,乙酸乙酯层于 30~50° C 除去溶剂(例如 35~50° C,例如约 40° C 旋转蒸发除溶剂),干燥(例如于 50~70° C 真空干燥),得到水飞蓟宾二偏琥珀酸酯;和任选的

[0100] (e) 成盐步骤:将步骤(d)所得水飞蓟宾二偏琥珀酸酯溶解于有机溶剂(例如甲醇、无水乙醇)中,再加入碱金属氢氧化物或者碱土金属氢氧化物的溶液(例如溶解于有机溶剂(例如甲醇、无水乙醇)中的溶液),搅拌使反应,析出白色固体,过滤,干燥,得到水飞蓟宾二偏琥珀酸酯的碱金属盐或者碱土金属盐。

[0101] 本发明第四方面提供了本发明第一方面任一实施方案所述化合物在制备用于治疗、改善或预防肝脏疾病的药物中的用途。

[0102] 根据本发明第四方面的用途,其中所述肝脏疾病选自:因鬼笔鹅膏引起的急性肝中毒,急慢性肝炎,初期肝硬化,中毒性肝损害,脂肪肝所致肝功能异常,酒精肝所致肝功能异常。

[0103] 本发明第五方面涉及一种在有需要的哺乳动物(包括人)中治疗、改善或预防肝脏疾病的方法,该方法包括给有需要的哺乳动物施用治疗有效量的本发明第一方面任一实施方案所述化合物。在一个实施方案中,所述肝脏疾病选自:因鬼笔鹅膏引起的急性肝中毒,急慢性肝炎,初期肝硬化,中毒性肝损害,脂肪肝所致肝功能异常,酒精肝所致肝功能异常。

[0104] 本发明第六方面涉及用于治疗、改善或预防哺乳动物(包括人)肝脏疾病的药物组合物,该药物组合物包含本发明第一方面任一实施方案所述化合物,以及任选的一种或多种药学可接受的载体或赋形剂。

[0105] 本发明第七方面涉及用于治疗、改善或预防哺乳动物(包括人)肝脏疾病的本发明第一方面任一实施方案所述化合物。

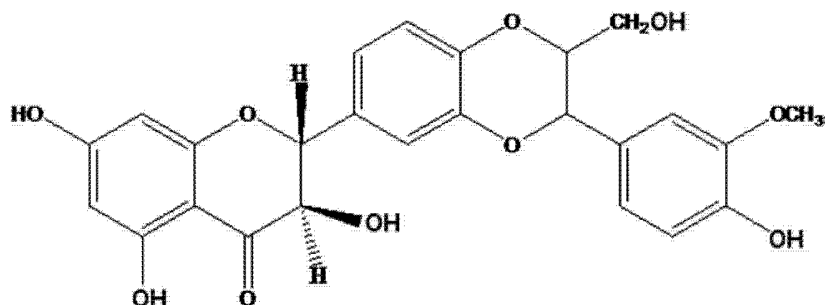
[0106] 本发明的任一方面的任一实施方案,可以与其它实施方案进行组合,只要它们不会出现矛盾。此外,在本发明任一方面的任一实施方案中,任一技术特征可以适用于其它实施方案中的该技术特征,只要它们不会出现矛盾。

[0107] 本发明任一方面或该任一方面的任一实施方案所具有的任一技术特征同样适用其它任一实施方案或其它任一方面的任一实施方案,只要它们不会相互矛盾,当然在相互之间适用时,必要的话可对相应特征作适当修饰。下面对本发明的各个方面和特点作进一步的描述。

[0108] 本发明所引述的所有文献,它们的全部内容通过引用并入本文,并且如果这些文献所表达的含义与本发明不一致时,以本发明的表述为准。此外,本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义,即便如此,本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释,提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。

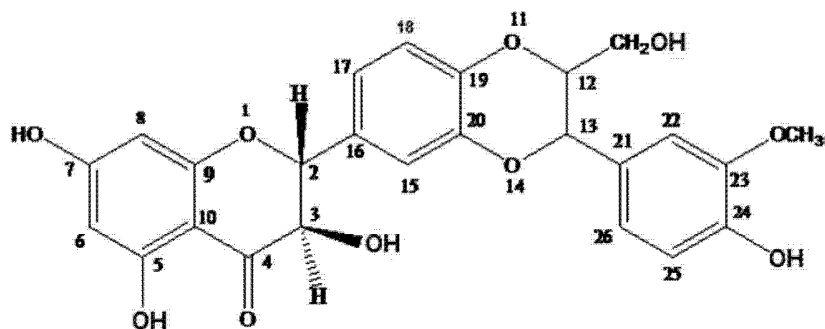
[0109] 众所周知,水飞蓟宾(C₂₅H₂₂O₁₀, M. W. 482.60)具有如下结构式:

[0110]



[0111] 其结构中的五个环的环原子编号如下:

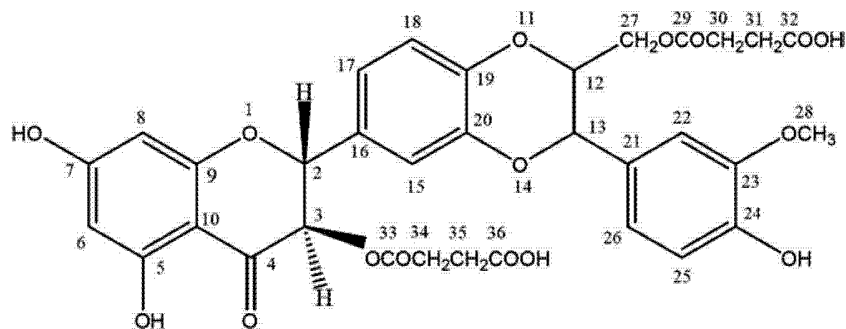
[0112]



[0113] 从菊科植物水飞蓟获取的水飞蓟素,人们已经能够确定其中的2-位和3-位均为R构型,但是对于12-位和13-位两处的构型却尚不清楚,即使有文献报道了12-位和13-位的可能构型,也仅仅是推测而已。在本发明中,如未另外说明,提及水飞蓟素或水飞蓟素二偏琥珀酸酯或其盐的12-位和13-位时,均分别如以上结构所标示的12-位和13-位两个环碳原子。

[0114] 水飞蓟素二偏琥珀酸酯的盐例如钠盐,亦可称为水飞蓟素二偏琥珀酸酯钠或水飞蓟素二偏琥珀酸酯二钠,其为水飞蓟素的苯并吡喃环3位上以琥珀酸取代,并在苯并二氧六环2位甲基上以琥珀酸取代,由此而形成的二钠盐,其化学名称为:琥珀酸单[[6-[3-(3-羧基-1-氧丙氧基)-3,4-二氢-5,7-二羟基-4-氧-2H-1-苯并吡喃-2-基]-2,3-二氢-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,4-苯并二氧六环-2-基]甲基]酯二钠,或者 Butanedioic acid, mono((6-(3-(3-carboxy-1-oxopropoxy)-3,4-dihydro-5,7-dihydroxy-4-oxo-2H-1-benzopyran-2-yl)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-benzodioxin-2-yl)methyl)ester, disodium salt。其分子式为: $C_{33}H_{28}O_{16}Na_2$,分子量为:726.48,即下式为水飞蓟素二偏琥珀酸酯上32-位羧基和36-位羧基所形成的钠盐。

[0115]



[0116] 本发明的药物组合物可用于急性、慢性肝损伤治疗,还可用于脂肪肝和酒精肝所造成的肝功能异常的恢复。本发明的药物组合物特别是呈注射给药的制剂在使用时,可以用0.9%氯化钠注射液或5%葡萄糖注射液稀释后静脉滴注,例如一次注射5mg/kg,例如可以在2小时内注完,例如一天注射1、2、3或4次。此外,本发明的药物组合物可以用于鹅膏菌引起的肝脏中毒时,在此情况下,应尽早开始使用本发明的药物组合物,直至中毒症状消失为止。

[0117] 本发明药物组合物中的活性成分式I化合物为水飞蓟素二偏琥珀酸酯或其盐(在本文中可缩写为SDH),其具有抗氧化活性,其对自由基所介导的肝脏微粒体和线粒体磷脂过氧化有抑制作用,具有膜稳定效应。大鼠静脉注射SDH可抑制苯肼介导的氧气过量消耗和磷脂的过氧化作用,减弱谷胱甘肽(GSH)的增加趋势,SDH还可将此效应降低为正常水

平。SDH 可减少乙醇在体内的代谢过程,尤其是微粒体乙醇氧化系统的影响,还可纠正由乙醇所导致的肝的磷脂代谢紊乱。式 I 化合物还具有抗肝毒性活性,大鼠腹腔注射 SDH 可增强肝的总磷脂、游离胆固醇、甘油三酯、总磷脂和磷脂酰基乙醇胺以及血清中甘油三酯的活性。SDH 具有降低大鼠线粒体后的脂肪酸的合成作用。此外,式 I 化合物还具有抗毒素作用,SDH 对毒性物质如盐酸 D- 半乳糖胺、金属锶以及其化合物 ($\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$)、苯肼、青蛙病毒 3 号、异腈酸 α 萘酯等对肝脏的损害亦有效果。再者式 I 化合物还对抗药源性肝损害具有保护作用,对扑热息痛和苯巴比妥等药导致的肝损害具有保护作用。

[0118] 在本发明中,提及“式 I 化合物”时,指式 I 所示水飞蓟宾二偏琥珀酸酯或其盐的任何可能的全部异构体,只要这些异构体符合本发明所述高效液相色谱法的相应特征;特别是 2- 位和 3- 位均为 R 构型,而 12- 位和 13- 位为任意构型的异构体。

[0119] 在本发明中,提及“化合物”或“本发明化合物”时,指式 I 所示水飞蓟宾二偏琥珀酸酯或其盐的任何可能的全部异构体在一起的混合物,只要这些异构体符合本发明所述高效液相色谱法的相应特征;特别是 2- 位和 3- 位均为 R 构型,而 12- 位和 13- 位为任意构型的异构体。由此,“本发明化合物”中存在四种异构体,这些异构体在式 I 所示水飞蓟宾二偏琥珀酸酯或其盐的 2- 位和 3- 位均为 R 构型,而在 12- 位和 13- 位为任意构型。另外,提及的“化合物”或“本发明化合物”基本上只含有本文定义的四种异构体,而基本上不包含其它物质,但是微少量的杂质是容许存在的,例如容许存在小于 5%、小于 4%、小于 3%、小于 2%、小于 1% 的异构体。

[0120] 在本发明的许多实施方案中,本发明化合物是由式 I 化合物的四种异构体组成,更具体地讲,这四种异构体在 2- 位和 3- 位均为 R 构型。上述“本发明化合物是由式 I 化合物的四种异构体组成”或类似的封闭式表述并不完全排斥具有式 I 结构的另一种异构体,特别是这些异构体含量极低而可以理解为杂质的情况下。另外,尽管本发明尚不清楚四种异构体在 12- 位和 13- 位的具体构型,然而本发明可以通过色谱行为来明确地确定本发明化合物。特别地,在本发明规定的 HPLC 条件下,例如在此可以使参比品水飞蓟宾的两色谱峰分离度达 0.8 以上并且先洗脱出的峰保留时间在约 6-9min 的条件下,本发明化合物中的四个异构体具有分离度大于 0.8 并且各个峰具有基本固定的相对保留时间,由此虽然本发明人尚不能确定本发明化合物中的四个异构体的具体构型,然而可以通过此方式唯一的确定本发明化合物的具体组成。

[0121] 在本发明中,符号 %, 根据其所使用的语境,可以具有本领域技术人员容易理解的含义。例如在提及固形物含量时,该符号表示重量 / 体积的百分数 (w/v, 例如 g/100ml); 又例如在提及冷冻干燥粉针剂中的“水含量”时,例如水含量在 8% 以下,此时该符号 % 表示重量 / 重量的百分数 (w/w, g/100g)。一般而言,在固体分散在液体中时, % 表示重量 / 体积百分数; 在固体分散在固体中或者液体分散在固体中 (例如粉针的含水量) 时, % 表示重量 / 重量百分数。在其它情况下,如无另外说明,符号 % 表示重量 / 重量百分数。

[0122] 在本发明中,使用到作为对照品 / 参考品 / 参比品或原料的水飞蓟宾均可从市场购得,或者采用现有技术公开的方法制备。

[0123] 在本发明中,进行色谱峰的计算时,均不考虑辅料形成的色谱峰,也不考虑测试溶液溶剂和 / 或流动相形成的色谱峰,在具体计算时,可能通过向色谱仪中注入溶剂、流动相、或辅料溶液,在计算每个试样时扣除这些溶剂、流动相、或辅料溶液所对应的色谱峰,这

种作法是本领域技术人员特别是药物分析领域技术人员公知的基本技能。

[0124] 在制备本发明物质的方法中,反应所用的各种原材料是本领域技术人员根据已有知识可以制备得到的,或者是可以通过文献公知的方法制得的,或者是可以通过商业购得的。以上反应方案中所用的中间体、原材料、试剂、反应条件等均可以根据本领域技术人员已有知识可以作适当改变的。

[0125] 本发明化合物可以与其它活性成分组合使用,只要它不产生其他不利作用,例如过敏反应。

[0126] 本发明化合物可作为唯一的活性药物使用,或者可以与一种或多种其他生理活性上与本发明物质具有协同和/或增效作用的药物联合使用。联合治疗可通过将各个治疗组分同时、顺序或隔开给药来实现。

[0127] 本文所用的术语“组合物”意指包括包含指定量的各指定成分的产品,以及直接或间接从指定量的各指定成分的组合产生的任何产品。在本发明中,术语“组合物”可以与“药物组合物”互换使用。

[0128] 可改变本发明药物组合物中各活性成分的实际剂量水平,以便所得的活性物质能有效针对具体患者、化合物和给药方式得到所需的治疗反应。剂量水平须根据具体活性物质的活性、给药途径、所治疗病况的严重程度以及待治疗患者的病况和既往病史来选定。但是,本领域的做法是,活性物质的剂量从低于为得到所需治疗效果而要求的水平开始,逐渐增加剂量,直到得到所需的效果。

[0129] 当用于上述治疗和/或预防或其他治疗和/或预防时,治疗和/或预防有效量的一种本发明化合物可以以纯形式应用,或者以药学可接受的酯或前药形式(在存在这些形式的情况下)应用。或者,所述化合物可以以含有该目的化合物与一种或多种药物可接受赋形剂的药物组合物给药。词语“治疗和/或预防有效量”的本发明化合物指以适用于任何医学治疗和/或预防的合理效果/风险比治疗障碍的足够量的化合物。但应认识到,本发明化合物和药物组合物的总日用量须由主诊医师在可靠的医学判断范围内作出决定。对于任何具体的患者,具体的治疗有效剂量水平须根据多种因素而定,所述因素包括所治疗的障碍和该障碍的严重程度;所采用的具体化合物的活性;所采用的具体药物组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所采用的具体药物组合物的给药时间、给药途径和排泄率;治疗持续时间;与所采用的药物组合物组合使用或同时使用的其它药物;及医疗领域公知的类似因素。例如,本领域的做法是,药物组合物的剂量从低于为得到所需治疗效果而要求的水平开始,逐渐增加剂量,直到得到所需的效果。一般说来,本发明化合物用于哺乳动物特别是人的剂量可以介于 0.001 ~ 1000mg/kg 体重/天,例如介于 0.01 ~ 100mg/kg 体重/天,例如介于 0.01 ~ 10mg/kg 体重/天。

[0130] 运用本领域技术人员熟悉的药物载体可以制备成含有效剂量的本发明化合物的药物组合物。因此本发明还提供包含与一种或多种无毒药物可接受载体配制在一起的本发明化合物的药物组合物。所述药物组合物可特别专门配制成为固体或液体形式供口服给药、供胃肠外注射或供直肠给药。

[0131] 所述的药物组合物可配制成许多剂型,便于给药,例如,口服制剂(如片剂、胶囊剂、溶液或混悬液);可注射的制剂(如可注射的溶液或混悬液,或者是可注射的干燥粉末,在注射前加入注射水可立即使用)。所述的药物组合物中载体包括:口服制剂使用的粘合

剂（如淀粉，通常是玉米、小麦或米淀粉、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和 / 或聚乙烯吡咯烷酮），稀释剂，润滑剂（如二氧化硅、滑石、硬脂酸或其盐，通常是硬脂酸镁或硬脂酸钙，和 / 或聚乙二醇），以及如果需要，还含有崩解剂，如淀粉、琼脂、海藻酸或其盐，通常是藻酸钠，和 / 或泡腾混合物，助溶剂、稳定剂、悬浮剂、着色剂、矫味剂等，可注射的制剂使用的防腐剂、增溶剂、稳定剂等；局部制剂用的基质、稀释剂、润滑剂等。药物制剂可以经口服或胃肠外方式（例如静脉内、皮下、腹膜内或局部）给药，如果某些药物在胃部条件下是不稳定的，可以将其配制成肠衣片剂。

[0132] 更具体地说，本发明的药物组合物可通过口服、直肠、胃肠外、池内、阴道内、腹膜内、局部（如通过散剂、软膏剂或滴剂）、口颊给予人类和其他哺乳动物，或者作为口腔喷雾剂或鼻腔喷雾剂给予。本文所用术语“胃肠外”指包括静脉内、肌肉内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节内注射和输液的给药方式。

[0133] 适合于胃肠外注射的药物组合物可包括生理上可接受的无菌含水或非水溶液剂、分散剂、混悬剂或乳剂，及供重构成无菌可注射溶液剂或分散剂的无菌散剂。合适的含水或非水载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇（丙二醇、聚乙二醇、甘油等）、植物油（如橄榄油）、可注射有机酯如油酸乙酯及它们的合适混合物。

[0134] 这些药物组合物也可含有辅料，如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过各种抗菌剂和抗真菌剂，例如尼泊金酯类、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等，可确保防止微生物的作用。还期望包括等渗剂，例如糖类、氯化钠等。通过使用能延迟吸收的物质，例如单硬脂酸铝和明胶，可达到可注射药物形式的延长吸收。

[0135] 混悬剂中除活性化合物外还可含有悬浮剂，例如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨醇和聚氧乙烯失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶或者这些物质的混合物等。

[0136] 在一些情况下，为延长药物的作用，期望减慢皮下或肌内注射药物的吸收。这可通过使用水溶性差的晶体或无定形物质的液体混悬剂来实现。这样，药物的吸收速度取决于其溶解速度，而溶解速度又可取决于晶体大小和晶型。或者，胃肠外给药的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解于或悬浮于油媒介物中来实现。

[0137] 可注射贮库制剂形式可通过在生物可降解聚合物如聚丙交酯 - 聚乙交酯中形成药物的微胶囊基质来制备。可根据药物与聚合物之比和所采用的具体聚合物的性质，对药物释放速度加以控制。其他生物可降解聚合物的实例包括聚原酸酯类和聚酞类。可注射贮库制剂也可通过将药物包埋于能与身体组织相容的脂质体或微乳中来制备。

[0138] 可注射制剂可例如通过用滤菌器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌，所述固体组合物可在临用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质。

[0139] 本发明化合物或其药物组合物可用口服方法或非胃肠道给药方式。口服给药可以是片剂、胶囊剂、包衣剂，肠道外用制剂有注射剂和栓剂等。这些制剂是按照本领域的技术人员所熟悉的方法制备的。为了制造片剂、胶囊剂、包衣剂所用的辅料是常规用的辅料，例如淀粉、明胶、阿拉伯胶，硅石，聚乙二醇，液体剂型所用的溶剂如水、乙醇、丙二醇、植物油（如玉米油、花生油、橄榄油等）。含有本发明化合物的制剂中还有其它辅料，例如表面活性剂，润滑剂，崩解剂，防腐剂，矫味剂和色素等。在片剂、胶囊剂、包衣剂、注射剂和栓剂中含有本发明式 I 化合物的剂量是以单元剂型中存在的化合物量计算的。在单元剂型中本发

明化合物一般含量为 0.01-5000mg, 优选的单元剂型含有 0.1-500mg, 更优选的单元剂型含有 1-300mg。具体地说, 本发明可以提供的供口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在此类固体剂型中, 活性化合物可与至少一种惰性的药物可接受赋形剂或载体如柠檬酸钠或磷酸二钙和 / 或以下物质混合 : a) 填充剂或增量剂 ; b) 粘合剂如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶 ; c) 保湿剂如甘油 ; d) 崩解剂如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠 ; e) 溶液阻滞剂如石蜡 ; f) 吸收加速剂如季铵化合物 ; g) 湿润剂如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯 ; h) 吸附剂如高岭土和膨润土以及 i) 润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠和它们的混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下, 所述剂型中也可包含缓冲剂。

[0140] 相似类型的固体组合物使用赋形剂例如乳糖及高分子量聚乙二醇等, 也可用作软胶囊和硬胶囊中的填充物。

[0141] 片剂、糖衣丸剂 (dragees)、胶囊剂、丸剂和颗粒剂的固体剂型可与包衣和壳料如肠溶衣材和医药制剂领域公知的其他衣材一起制备。这些固体剂型可任选含有遮光剂, 且其组成还可使其只是或优先地在肠道的某个部位任选以延迟方式释放活性成分。可以使用的包埋组合物的实例包括高分子物质和蜡类。如果适合, 活性化合物也可与一种或多种上述赋形剂配成微囊形式。

[0142] 供口服给药的液体剂型包括药学可接受的乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。液体剂型除含有活性化合物外还可含有本领域常用的惰性稀释剂, 例如水或其他溶剂, 增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类 (特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及它们的混合物。口服组合物除包含惰性稀释剂外还可包含辅料, 例如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香味剂。

[0143] 供直肠或阴道给药的组合物优选是栓剂。栓剂可通过将本发明化合物与合适的非刺激性赋形剂或载体例如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合来制备, 它们在室温下为固体, 但在体温下则为液体, 因此可在直肠腔或阴道腔内融化而释放出活性化合物。

[0144] 本发明化合物及其药物组合物还考虑用于局部给药。供局部给予本发明化合物的剂量形式包括散剂、喷雾剂、软膏剂和吸入剂。在无菌条件下将活性化合物与药学可接受的载体和任何所需的防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。眼用制剂、眼软膏剂、散剂和溶液剂也被考虑在本发明范围内。

[0145] 本发明化合物也可以脂质体形式给药。如本领域所公知, 脂质体通常用磷脂或其他脂类物质制得。脂质体由分散于含水介质中的单层或多层水化液晶所形成。任何能够形成脂质体的无毒、生理上可接受和可代谢的脂类均可使用。脂质体形式的本发明化合物除含有本发明化合物外, 还可含有稳定剂、防腐剂、赋形剂等。优选的脂类是天然和合成的磷脂和磷脂酰胆碱 (卵磷脂), 它们可单独或者一起使用。形成脂质体的方法是本领域公知的。参见例如 Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N. Y. (1976), p. 33。

[0146] 本发明人惊奇地发现, 本发明化合物在生物和 / 或物理和 / 或化学方面显示出令人鼓舞的有益效果。

附图说明

[0147] 图 1 是本发明制备例 1 的盐的典型液相色谱图。

[0148] 图 2 是本发明制备例 2 的钠盐与参比品水飞蓟宾经混合所得混合物的典型液相色谱图。

具体实施方式

[0149] 下面通过具体的制备实施例和生物学试验例进一步说明本发明,但是,应当理解为,这些实施例和试验例仅仅是用于更详细具体地说明之用,而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

[0150] 本发明对试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性和/或具体的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚,在下文中,如果未特别说明,本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

[0151] 一、化合物制备例部分

[0152] 制备例 1:制备本发明化合物,酯和钠盐

[0153] (a) 酯化步骤:使 1 摩尔份的水飞蓟宾(市售品,色谱纯度 >98.5%) 在 2 倍重量的吡啶中溶解,加入 3 摩尔份的琥珀酸酐,在 40° C 温度下搅拌反应 20 小时;

[0154] (b) 水解步骤:向步骤(a) 所得反应液中加入 2 倍体积量的 75% 乙醇,继续在 40° C 下搅拌反应至水解完全;降温至室温,加入反应液 1 倍体积量的 5M 盐酸、以及反应液 2 倍体积量的乙酸乙酯,用 pH 试纸测该混合物呈酸性后,加水,搅拌 15min,静置分层后,弃去下层水层,有机层用水洗涤,直到水层显示呈中性,静置分层,有机层用活性炭脱色,过滤,收集滤液,除去溶剂,得到水飞蓟宾 3- 位羟基和 12- 位羟甲基分别与琥珀酸形成偏酯的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯;

[0155] (c) 分离步骤:使用制备型液相色谱法进行分离,将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱填料(10 μ m, 品牌为 Daiso SP-100-10-ODS-P 的 C18 色谱填料) 装入动态轴向压缩柱制备型液相色谱系统中(江苏汉邦科技有限公司的 DAC-HB80 动态轴向压缩柱系统),以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇(50 :50) 为流动相,检测波长为 288nm;将步骤(b) 所得产物用流动相溶解,用进样泵进样,洗脱并记录色谱图至全部色谱峰完全洗脱出来,以最后一个色谱峰的保留时间为基准,截取相对保留时间在 0.4~0.7 之间洗脱出来的两个色谱峰以及相对保留时间在 0.7~1.0 之间洗脱出来的两个色谱峰的共包含四个色谱峰的洗脱液(即包括相对保留时间为 1.0 的色谱峰以及该峰前面三个色谱峰四者的洗脱液,在本发明上下文中有类似描述时,均具有相同含义);

[0156] (d) 提取步骤:量取 1 体积的步骤(c) 所得洗脱液至分液漏斗中,再加入 1 体积的纯水,混合后,再加入 1 体积的乙酸乙酯,振摇萃取,静置分层,弃去下层废液;上层乙酸乙酯层加入 1 体积纯水,振摇萃取,静置分层,弃去下层水层,如此重复 2 次或以上,乙酸乙酯层于 40° C 旋转蒸发除溶剂,60° C 真空干燥,得到本发明的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯(总收率 95.6%,摩尔收率,下同), $C_{33}H_{30}O_{16}$ (M. W. 682.60, 计算值: C=58.07%, H=4.43%, O=37.50%; 实测值 C=58.06%, H=4.49%, O=37.45%)。进一步地

[0157] (e) 成盐步骤:将步骤(d) 所得水飞蓟宾二偏琥珀酸酯溶解于无水乙醇中,再加入

氢氧化钠-无水乙醇溶液(水飞蓟宾二偏琥珀酸酯与氢氧化钠摩尔比为 1:2.2),在室温下搅拌使反应,等析出白色固体,过滤,干燥,得到本发明水飞蓟宾二偏琥珀酸酯二钠盐(总收率 94.2%)。

[0158] 以上步骤(e)所得盐与 1 倍量淀粉和 1 倍量乳糖混合,研磨成可通过 100 目筛的细粉,分装入硬胶囊中,每粒含所述的盐 50mg,得到作为胶囊剂的本发明药物组合物。另外,将以上步骤(e)所得盐与 2 倍量甘露醇混合,用适量水溶解以得到固含量为 20% 的溶液,无菌过滤,照注射用冷冻干燥粉针剂的制备方法制备成冻干粉针,每瓶含所述的盐 50mg,得到作为注射用冻干粉针剂的本发明药物组合物。

[0159] 制备例 2:制备本发明化合物,酯和钠盐

[0160] (a) 酯化步骤:使 1 摩尔份的水飞蓟宾(市售品)在 2 倍重量的吡啶中溶解,加入 4 摩尔份的琥珀酸酐,在 35° C 温度下搅拌反应 40 小时;

[0161] (b) 水解步骤:向步骤(a)所得反应液中加入 2 倍体积量的 65% 乙醇,继续在 35° C 下搅拌反应至水解完全;降温至室温,加入反应液 1 倍体积量的 2M 盐酸、以及反应液 2 倍体积量的乙酸乙酯,用 pH 试纸测该混合物至酸性后,加水,搅拌 60min,静置分层后,弃去下层水层,有机层用水洗涤,直到水层显示呈中性,静置分层,有机层用活性炭脱色,过滤,收集滤液,除去溶剂,得到水飞蓟宾 3- 位羟基和 12- 位羟甲基分别与琥珀酸形成偏酯的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯;

[0162] (c) 分离步骤:使用制备型液相色谱法进行分离,将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱填料(10 μ m, 品牌为 Daiso SP-100-10-ODS-P 的 C18 色谱填料)装入动态轴向压缩柱制备型液相色谱系统中(江苏汉邦科技有限公司的 DAC-HB80 动态轴向压缩柱系统),以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇(50 :50) 为流动相,检测波长为 288nm ;将步骤(b)所得产物用流动相溶解,用进样泵进样,洗脱并记录色谱图至全部色谱峰完全洗脱出来,以最后一个色谱峰的保留时间为基准,截取相对保留时间在 0.4~0.7 之间洗脱出来的两个色谱峰以及相对保留时间在 0.7~1.0 之间洗脱出来的两个色谱峰的共包含四个色谱峰的洗脱液;

[0163] (d) 提取步骤:量取 1 体积的步骤(c)所得洗脱液至分液漏斗中,再加入 0.5 体积的纯水,混合后,再加入 2 体积的乙酸乙酯,振摇萃取,静置分层,弃去下层废液;上层乙酸乙酯层加入 1 体积纯水,振摇萃取,静置分层,弃去下层水层,如此重复 2 次或以上,乙酸乙酯层于 35° C 旋转蒸发除溶剂,70° C 真空干燥,得到本发明的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯, $C_{33}H_{30}O_{16}$ (M. W. 682.60, 计算值 :C=58.07%, H=4.43%, O=37.50%; 实测值 C=58.01%, H=4.46%, O=37.53%)。进一步地

[0164] (e) 成盐步骤:将步骤(d)所得水飞蓟宾二偏琥珀酸酯溶解于无水乙醇中,再加入氢氧化钠-无水乙醇溶液(水飞蓟宾二偏琥珀酸酯与氢氧化钠摩尔比为 1:2.2),在室温下搅拌使反应,等析出白色固体,过滤,干燥,得到本发明水飞蓟宾二偏琥珀酸酯二钠盐(总收率 95.4%)。

[0165] 制备例 3:制备本发明化合物,酯和钠盐

[0166] (a) 酯化步骤:使 1 摩尔份的水飞蓟宾(市售品)在 2 倍重量的吡啶中溶解,加入 2.5 摩尔份的琥珀酸酐,在 50° C 温度下搅拌反应 15 小时;

[0167] (b) 水解步骤:向步骤(a)所得反应液中加入 2 倍体积量的 85% 乙醇,继续在

50° C 下搅拌反应至水解完全 ; 降温至室温, 加入反应液 1 倍体积量的 8M 盐酸、以及反应液 2 倍体积量的乙酸乙酯, 用 pH 试纸测该混合物呈酸性后, 加水, 搅拌 5min, 静置分层后, 弃去下层水层, 有机层用水洗涤, 直到水层显示呈中性, 静置分层, 有机层用活性炭脱色, 过滤, 收集滤液, 除去溶剂, 得到水飞蓟宾 3- 位羟基和 12- 位羟甲基分别与琥珀酸形成偏酯的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯 ;

[0168] (c) 分离步骤 : 使用制备型液相色谱法进行分离, 将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱填料 (10 μ m, 品牌为 Daiso SP-100-10-ODS-P 的 C18 色谱填料) 装入动态轴向压缩柱制备型液相色谱系统中 (江苏汉邦科技有限公司的 DAC-HB80 动态轴向压缩柱系统), 以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液 (用磷酸调 pH 值至 4.0) — 甲醇 (50 : 50) 为流动相, 检测波长为 288nm ; 将步骤 (b) 所得产物用流动相溶解, 用进样泵进样, 洗脱并记录色谱图至全部色谱峰完全洗脱出来, 以最后一个色谱峰的保留时间为基准, 截取相对保留时间在 0.4~0.7 之间洗脱出来的两个色谱峰以及相对保留时间在 0.7~1.0 之间洗脱出来的两个色谱峰的共包含四个色谱峰的洗脱液 ;

[0169] (d) 提取步骤 : 量取 1 体积的步骤 (c) 所得洗脱液至分液漏斗中, 再加入 2 体积的纯水, 混合后, 再加入 0.5 体积的乙酸乙酯, 振摇萃取, 静置分层, 弃去下层废液 ; 上层乙酸乙酯层加入 1 体积纯水, 振摇萃取, 静置分层, 弃去下层水层, 如此重复 2 次或以上, 乙酸乙酯层于 50° C 旋转蒸发除溶剂, 50° C 真空干燥, 得到本发明的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯, $C_{33}H_{30}O_{16}$ (M. W. 682.60, 计算值 : C=58.07%, H=4.43%, O=37.50% ; 实测值 C=58.11%, H=4.43%, O=37.46%)。进一步地

[0170] (e) 成盐步骤 : 将步骤 (d) 所得水飞蓟宾二偏琥珀酸酯溶解于无水乙醇中, 再加入氢氧化钠 — 无水乙醇溶液 (水飞蓟宾二偏琥珀酸酯与氢氧化钠摩尔比为 1:2.2), 在室温下搅拌使反应, 等析出白色固体, 过滤, 干燥, 得到本发明式 I 化合物中两个 X 为钠离子的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯二钠盐 (总收率 94.8%)。

[0171] 制备例 4 : 制备本发明化合物, 钾盐

[0172] 参考制备例 1 的方法, 不同的是在步骤 (e) 中使用氢氧化钾进行成盐, 得到本发明式 I 化合物中两个 X 为钾离子的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯二钾盐 (总收率 94.1%)。

[0173] 对照例 1 : 制备参考品化合物, 酯和钠盐

[0174] 参考制备例 1 的方法, 不同的仅是在步骤 (c) 中截取相对保留时间在 0.4~0.7 之间洗脱出来的两个色谱峰中的前一色谱峰的洗脱液。在步骤 (d) 中得到的产物经测定分子量 M. W. =682.43 ; 在步骤 (e) 中得到钠盐产物 (在本发明中可简称为化合物 e)。

[0175] 对照例 2 : 制备参考品化合物, 酯和钠盐

[0176] 参考制备例 1 的方法, 不同的仅是在步骤 (c) 中截取相对保留时间在 0.4~0.7 之间洗脱出来的两个色谱峰中的后一色谱峰的洗脱液。在步骤 (d) 中得到的产物经测定分子量 M. W. =682.75 ; 在步骤 (e) 中得到钠盐产物 (在本发明中可简称为化合物 f)。

[0177] 对照例 3 : 制备参考品化合物, 酯和钠盐

[0178] 照 GB2167414A 实施例 1 方法得到水飞蓟宾二偏琥珀酸酯 (经测定分子量 M. W. =682.71), 接着照 GB2167414A 实施例 2 方法得到水飞蓟宾二偏琥珀酸酯二钠盐。

[0179] 对照例 4 : 制备参考品化合物, 钠盐

[0180] 照 CN101302212A 实施例 1 方法得到水飞蓟宾丁二酸酯二钠 (即水飞蓟宾二偏琥

珀酸酯二钠盐)。

[0181] 对照例 5:制备参考品化合物,酯和钠盐

[0182] 参考制备例 1 的方法,不同的仅是在步骤 (c) 中截取相对保留时间在 0.7~1.0 之间洗脱出来的两个色谱峰中的前一色谱峰的洗脱液。在步骤 (d) 中得到的产物经测定分子量 M.W.=682.43;在步骤 (e) 中得到钠盐产物(在本发明中可简称为化合物 g)。

[0183] 对照例 6:制备参考品化合物,酯和钠盐

[0184] 参考制备例 1 的方法,不同的仅是在步骤 (c) 中截取相对保留时间在 0.7~1.0 之间洗脱出来的两个色谱峰中的后一色谱峰的洗脱液。在步骤 (d) 中得到的产物经测定分子量 M.W.=682.75;在步骤 (e) 中得到钠盐产物(在本发明中可简称为化合物 h)。

[0185] 市售对照品:Legalon®SIL(批号:1000007,其在本发明中可简称为LS®),德国马博士大药厂(MADAUS AG)生产的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯二钠盐注射液,每瓶 Legalon®SIL 含有 528.5mg 的水飞蓟宾二偏琥珀酸酯二钠盐(SDH)(相当于 350mg 的水飞蓟宾)。

[0186] 以上各制备例和对照例所得酯经测定,均具有相同的红外光谱和 ¹H-NMR 谱,例如它们均具有部分典型的 IR 光谱数据(±2cm⁻¹)如下:

吸收峰 cm ⁻¹	振动类型	基团	吸收峰强度	备注
3270	v	O-H,	S 宽形成氢键	v 伸缩振动 S 强吸收 M 中等吸收 W 弱吸收
1739	v	C=O,	S	
1639, 1510, 1467	v	苯环 C=C	S, S, M	
1375	v	CO-OH	M	
1267	v	C-OH (酚)	S	
1159	vS	C-O-C (酯)	S	
1085	vAS	C-O-C (酯)	M	
1030	v	CO-CH ₃	M	

[0188] 又例如它们均具有部分典型的 ¹H-NMR 谱数据如下:

[0189]

化学 ppm	多重性	质子数	相应氢原子
2.3719 ~ 2.5803	m	8	琥珀酸-CH ₂ -
3.7775	S	3	OCH ₃
4.9048 ~ 4.9648	m	2	C27 上的质子
5.5022 ~ 5.5147	m	1	C12 上的质子
5.5313 ~ 5.5436	d	1	C13 上的质子
5.8926-5.9033	d	1	C2 上的质子

5.9218-5.9250	d	1	C3 上的质子
5.9301-7.1593	m	9	苯环质子
10.9711-12.1976	m	2	COOH

[0190]

[0191] 另外,将以上各制备例和对照例所得酯和盐,分别用甲醇作为溶剂配制成溶液(盐型化合物折算成它们的相应酯计,以酯计各试样浓度基本相同),在 200nm~400nm 的范围内进行紫外扫描,结果显示各试样均具有相同的紫外吸收光谱,都在 288nm 有最大吸收,并且吸光度大致相同(相互之间相差不超过 10%,不论是呈酯的形式还是呈钠盐或钾盐的形式)。以上结果表明以上各制备例和对照例所得酯具有相同的化学式。

[0192] 二、化合物检验例部分[0193] 检验例 1:高效液相色谱法(中国药典 2010 年版二部附录 VD)测定方法

[0194] (i) 色谱条件与系统适用性试验:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以 0.05mol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 值至 4.0)—甲醇(50:50)为流动相,检测波长为 288nm,柱温为 30°C;取参比品水飞蓟宾(对照品级,含量高于 99%)适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中含水飞蓟宾 200 μg 的溶液,作为参比品贮备液;另取该参比品贮备液用流动相稀释成 20 μg/ml 的溶液,作为系统适用性试验溶液,取该系统适用性试验溶液 20 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图;该色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为 A 峰和 B 峰的两个主要色谱峰,调整 A 峰的保留时间在 6-9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.0;在本发明中,使用 4.6×250mm,5 μm 的 C18 色谱柱,流速为 1.0ml/min 可以容易将 A 峰的保留时间调整在 6-9min 之间,并且 A 峰和 B 峰的分度应大于 1.5。在本发明中,所涉及的 HPLC 色谱条件与系统适用性试验中,理论塔板数按 A 峰计算不低于 3000。

[0195] (ii) 色谱纯度和峰面积比测定法:取供试样(上文本发明制备例得到的化合物,或者可以用这类化合物加入适量辅料例如淀粉配制成的药物组合物例如药物制剂)适量(在本发明中,不论测试的是酯还是盐,具体操作时,均可以折算成式量式 $C_{33}H_{30}O_{16}$ (M. W. 682.60) 计算),加流动相溶解并制成浓度为 0.5mg/ml 的溶液,作为供试品溶液;精密量取供试品溶液 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液;采用上面“(i) 色谱条件与系统适用性试验”中的方法,取对照溶液 20 μl 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分 H 色谱峰的峰高约为满量程的 20%;精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,在色谱图中按出峰先后顺序依次出现称之为第一色谱峰(其在本发明中可简称为 E 峰或 E)和第二色谱峰(其在本发明中可简称为 F 峰或 F)以及第三色谱峰(其在本发明中可简称为 G 峰或 G)和第四色谱峰(其在本发明中可简称为 H 峰或 H)的四个主要色谱峰;记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍;供试品溶液色谱图中任何小于对照溶液色谱图中 H 色谱峰面积 0.05 倍的色谱峰忽略不计;记录供试品溶液色谱图中主峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积以及各杂质峰面积, E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的峰面积之和除以全部峰面积之和的百分数,即为本发明化合物色谱纯度,另外分别以 F 峰、G 峰、H 峰的峰面积除以 E 峰峰面积可以分别算得 F 峰、G 峰和 H 峰与 E 峰之间的峰面积比;

[0196] (iii) 相对保留时间 (RRt) 的测定 :取供试样 (上文本发明制备例得到的化合物, 或者可以用这类化合物加入适量辅料例如淀粉配制成的药物组合物例如药物制剂) 适量 (在本发明中, 不论测试的是酯还是盐, 具体操作时, 均可以折算成式量式 $C_{33}H_{30}O_{16}$ (M. W. 682. 60) 计算), 加流动相溶解并制成浓度为 0. 5mg/ml 的溶液, 作为供试品贮备液 ;精密量取供试品贮备液 1ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物浓度约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 I ;另精密量取供试品贮备液 1ml 和 (i) 中配制的参比品贮备液 2. 5ml, 置 10ml 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成包含本发明化合物和参比品水飞蓟宾浓度分别约为 50 μ g/ml 的溶液, 作为供试品测试溶液 II ;精密量取 20 μ l 的供试品测试溶液 II, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至 H 色谱峰保留时间的 2 倍 ;记录色谱图中由水飞蓟宾产生的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰以及由本发明化合物产生的四个主要色谱峰 E 峰、F 峰、G 峰和 H 峰的保留时间, 用 E 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 E 峰的相对保留时间, 用 F 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 F 峰的相对保留时间, 用 G 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 G 峰的相对保留时间, 用 H 峰的保留时间除以 A 峰的保留时间即为 H 峰的相对保留时间。

[0197] 已经发现, 针对本发明制备例 1 中所得胶囊剂或冻干粉针剂, 在色谱图中辅料不会影响测试结果。

[0198] 检验例 2 :HPLC 检验结果

[0199] 在以上检验例 1 的 (i)、(ii)、(iii) 中, A 峰的保留时间可以容易地调整到 6-9min 之间, 且 A 峰和 B 峰的分离度大于 1. 2 ;具体试验中使 A 峰保留时间调整到约 7. 5~8min 之间出峰, A 峰和 B 峰的分离度约 1. 6~2。

[0200] 使用以上方法得到本发明各制备例产物和对照例产物的一些性能如下表所示 :

[0201]

样品	色谱纯度,%	分离度		RRt				峰面积比		
		E-F	G-H	E 峰	F 峰	G 峰	H 峰	F 峰	G 峰	H 峰
制备例 1-酯	99.41	1.93	2.63	2.017	2.277	2.637	3.042	1.01	8.81	9.13
制备例 1-盐	99.25	2.01	2.76	2.141	2.293	2.794	3.286	1.04	7.29	8.07
制备例 2-酯	99.32	1.76	2.45	1.963	2.113	2.894	3.393	0.83	10.71	10.02

[0202]

制备例 2-盐	98.98	1.89	2.49	2.034	2.248	2.747	3.215	0.95	9.31	9.17
制备例 3-酯	99.32	2.09	2.54	1.988	2.213	2.822	3.282	1.15	9.04	9.33
制备例 3-盐	99.21	2.02	2.53	2.024	2.282	2.706	3.167	1.10	8.68	8.90
制备例 4-盐	99.53	2.16	2.44	2.096	2.287	2.803	3.231	1.03	9.11	8.92
对照例 1-酯	99.28(e)	×	×	2.032	×	×	×	1	0	0
对照例 1-盐	99.03(e)	×	×	2.083	×	×	×	1	0	0
对照例 2-酯	98.93(f)	×	×	×	2.188	×	×	∞	0	0
对照例 2-盐	99.03(f)	×	×	×	2.213	×	×	∞	0	0
对照例 3-酯	94.22	1.95	2.41	2.003	2.137	2.808	3.237	0.69	5.72	12.17
对照例 3-盐	93.73	1.82	2.62	2.107	2.242	2.827	3.147	0.67	6.21	14.79
对照例 4-盐	94.01	1.97	2.56	2.073	2.202	2.778	3.221	1.47	13.72	8.37
对照例 5-酯	99.13(g)	×	×	×	×	2.812	×	0	∞	0
对照例 5-盐	99.37(g)	×	×	×	×	2.831	×	0	∞	0
对照例 6-酯	98.91(h)	×	×	×	×	×	3.238	0	0	∞
对照例 6-盐	99.12(h)	×	×	×	×	×	3.202	0	0	∞
LS®-钠盐	94.18	1.94	2.57	2.022	2.217	2.821	3.218	1.534	5.47	6.83

[0203] 表中,“×”表示因仅有 E、F、G 或 H 单个峰而无法计算峰之间的分离度,或者无法计算相对保留时间;“∞”表示无穷大,因 E 峰不存在而进行除式计算而造成的。另外,对于对照例 3 和 4 所得酯和 / 或盐,与其它试样相同配液浓度下,G 和 H 峰的峰面积显著小于各制备例的对应峰的峰面积(约在各制备例对应峰的 75-85%,各制剂例的各对照峰基本相同,相互之间相关不超过 5%)。表中“色谱纯度,%”栏表示主峰(涉及峰 E、F、G、H 四者或者其中之一)的色谱纯度;“峰面积比”表示各峰的面积相对于 E 峰面积的倍数。LS®在色谱图中辅料对色谱分离及检测无影响。

[0204] 图 1 是本发明制备例 1 的盐的典型液相色谱图,图中显示其色谱纯度非常高,并且色谱分离效果令人满意。

[0205] 图 2 是本发明制备例 2 的钠盐与参比品水飞蓟宾经混合所得混合物的典型液相色谱图,图中水飞蓟宾形成的两个主要色谱峰 A 峰和 B 峰,A 峰保留时间在 6-9min 之间,A 峰和 B 峰分离度大于 1.5。各色谱参数见上表。此外,制备例 3 和制备例 4 得到的本发明化合物(酯和 / 或盐)同样基本上具有如图 1 和图 2 所示的典型图谱。

[0206] 三、生物学试验例部分

[0207] 生物学试验例 1:本发明化合物对 α -鹅膏毒肽所致肝损伤的保护作用

[0208] 1、实验目的:

[0209] 用改良寇氏法求得 α -鹅膏毒肽对昆明小鼠的半致死剂量 (LD_{50}),用半致死剂量注射小鼠,使其中毒,研究灵芝、水飞蓟宾、不同剂量本发明化合物对中毒小鼠的解毒功能。

[0210] 2、实验材料:

[0211] α -鹅膏毒肽,湖南师范大学真菌研究室分离纯化得到,纯度 95% 以上;本发明各制备例获得的化合物;上文各对照例获得的化合物或市售品;水飞蓟宾, Sigma 公司,纯度

98% 以上;灵芝,湖南常德药用真菌研究所;昆明种小白鼠,湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2009-0004;AST、ALT 测定试剂盒(赖氏法),上海荣盛生物技术有限公司。

[0212] 3、改良寇氏法测定 LD_{50} 的方法:

[0213] 预实验:取健康小鼠,均重 20g 左右,随机分为 3 组,每组 3 只,按不同剂量组的相应剂量腹腔注射,每组 0.4ml。观察五天,记录小鼠死亡情况。

[0214] LD_{50} 测定:参考预实验结果,根据一定剂距,计算得到梯度给毒剂量。取健康小鼠,实验前禁食不禁水 12 小时,随机分为 4 组,每组 10 只,按不同剂量组的相应剂量分别腹腔注射给毒,每组 0.4ml。给毒后连续观察五天,记录小鼠的反应及死亡情况。

[0215] 4、几种药物对鹅膏毒肽中毒小鼠的保护作用研究

[0216] 药物治疗实验:取健康小鼠若干,雌雄各半,室内观察 3 天,室温 20-25℃。实验前禁食不禁水 12 小时。根据下文给药方案组别设置随机分组,每组 10 只,均雌雄各半。每次注射容量为 0.4ml。给药组在注毒后 5 小时给药,以后每隔 6 小时给药一次,一天四次。同时,正常组每天注射生理盐水四次,中毒组第一次给毒,以后每次注射生理盐水,注毒 48 小时后处死。

[0217] 血清生化指标 ALT,AST 活性的测定:按 ALT,AST 检测试剂盒的要求测定小鼠血清中 ALT 和 AST 活性。

[0218] 统计学分析:应用 excel 软件进行统计学处理,计量资料均采用 $\bar{X} \pm S$ 表示,多组均数采用方差分析,组间差异的显著性采用 T 检验。 $P=0.05$ 为显著性检验标准。

[0219] 5、实验过程、结果与分析

[0220] (1) α -鹅膏毒肽 LD_{50} 的测定

[0221] 鹅膏毒肽溶液的制备:用双蒸水溶解鹅膏毒肽制备成 1mg/ml 母液备用。

[0222] LD_{50} 的测定,依《药理学实验方法》的急性毒性实验方法(改良寇氏法)进行。

[0223] 预实验:按照上述方法分组给毒,观察五天,记录小鼠死亡情况,最高剂量在 5 小时后有死亡,第二高剂量在 21 小时有首例死亡。结果如下:

[0224] 腹腔注射鹅膏毒肽测定 LD_{50} 预试验结果 ($n=3$)

[0225]	给药方式(容积)	注射剂量(mg/kg 体重)	死亡动物数(n)
	腹腔(0.4ml)	0.02	0
		0.10	0
		0.50	2
		2.50	3
[0226]		5.00	3

[0227] LD_{50} 测定:根据预实验结果,在 0.1mg/kg-2.5mg/kg 之间设置剂量,在此范围内按等比数列设计六组,公比(r)由下列公式求出:

$$[0228] \quad r = \sqrt[n-1]{b/a}$$

[0229] 式中, a= 零死亡率时剂量, b=100% 死亡率时剂量, n= 动物组数。

[0230] 求得 $r=1.90$

[0231] 则六组的剂量分别为 2.50, 1.31, 0.69, 0.36, 0.19, 0.10mg/kg, 取中间四组每组十只小鼠, 腹腔注射鹅膏毒肽, 依上述方法操作。最高剂量组在 24 小时后有死亡, 0.36 组在 65 小时出现首例死亡。个别小鼠死亡过程持续时间长, 甚至达 12 小时以上。中毒较深者, 反应迟钝, 毛发蓬松, 行动缓慢, 蜷缩在一团。死亡前半小时左右小鼠开始兴奋, 有原地打转, 摇头, 抽搐等症状, 最后全身痉挛死亡。结果如下表:

[0232] 表: 腹腔注射鹅膏毒肽测定 LD_{50} 实验结果 (n=10)

[0233]

注射剂量 (mg/kg)	$\log d(X)$	死亡动物数 (N)	死亡率 (P)
0.19	-0.721	0	0
0.36	-0.444	3	0.3
0.69	-0.161	10	1.0
1.31	0.117	10	1.0

[0234] 致命鹅膏的半致死量 LD_{50} 计算结果如下:

[0235] X_k = 最大剂量的对数, P 为各组死亡率, 用小数表示。

[0236] N 为每组动物数, 为 10。

[0237] 则 $i = X_k - X_{k-1} = \log_{10} d_4 - \log_{10} d_3 = 0.278$

[0238] $X_{50} = X_k - i / 2 \sum (P_n + P_{n+1}) = -0.3556$

[0239] 所以 $LD_{50} = \log_{10}^{-1}(X_{50}) = 0.45\text{mg/kg}$ 。

[0240] (2) 鹅膏毒肽 (在本发明中可简称为“鹅膏”) 注毒剂量的确定: 依据文献和 LD_{50} 数据以及本室预备试验的结果, 选择 $600 \mu\text{g/kg}$ 进行实验。

[0241] (3) 动物分组及受试药物的配制

[0242] 动物分为以下各给药组:

[0243] 正常组 (正常对照, 腹腔注射 0.9% 生理盐水),

[0244] 中毒组 (腹腔注射鹅膏毒肽, 剂量 $600 \mu\text{g/kg}$, 亦可称为“鹅膏组”),

[0245] 灵芝组 (腹腔注射, 剂量 500mg/kg/天),

[0246] 水飞蓟宾组 (腹腔注射, 剂量 24.1mg/kg/天 , 即相当于 0.05mmol/kg/天),

[0247] 制备例 1 酯组 (腹腔注射, 34.1mg/kg/天),

[0248] 制备例 1 盐组 (腹腔注射, 36.3mg/kg/天),

[0249] 制备例 2 酯组 (腹腔注射, 34.1mg/kg/天),

[0250] 制备例 2 盐组 (腹腔注射, 36.3mg/kg/天),

[0251] 制备例 3 盐组 (腹腔注射, 36.3mg/kg/天),

[0252] 制备例 4 盐组 (腹腔注射, 37.9mg/kg/天),

[0253] 对照例 1 盐组 (腹腔注射, 36.3mg/kg/天),

[0254] 对照例 2 盐组 (腹腔注射, 36.3mg/kg/天),

[0255] 对照例 3 盐组 (腹腔注射, 36.3mg/kg/天),

[0256] 对照例 4 盐组 (腹腔注射, 36.3mg/kg/天),

[0257] 对照例 5 盐组（腹腔注射,36.3mg/kg/天），

[0258] 对照例 6 盐组（腹腔注射,36.3mg/kg/天），

[0259] 市售品组（腹腔注射,36.3mg/kg/天）。

[0260] 以上各给药组剂量均以其中所含活性成分计算。

[0261] 受试药物的配制：各药物均用 0.9% 氯化钠注射液溶解（均呈溶解状态），灵芝处理后呈乳状悬浮液，但不影响注射，每次注射之前超声 10 分钟，各药物配制成适宜的浓度使得每只小鼠每次注射的体积为 1.5ml。

[0262] （4）实验过程：按照实验方法中的方法，每次注射时按顺序进行，即如果第一次注射时，正常组是第一个注射，以后各次也是第一个注射，其它组依次类推，保证时间差一致。在试验过程中发现注毒小鼠有拉稀情况出现，可能跟鹅膏毒肽影响胃肠系统有关；后逐渐减少，可能小鼠自身有一定的自我调节能力。注毒后 48 小时眼球取血，处死小鼠。

[0263] （5）酶指标检测：用眼球手术镊子摘取小鼠眼球，血液于 4000rpm 离心 10 分钟，取上清，按试剂盒说明首先求得 ALT 和 AST 标准曲线，分别是 $y=0.0025x$ ($R^2=0.9969$) 和 $y=0.002x$ ($R^2=0.9616$) (x 为酶活力， y 为吸光度)。再根据标准曲线和测得的吸光值求得酶活性。实验结果（以均值提供）如下表：

[0264] 表：不同试药治疗鹅膏毒肽中毒后 ALT 和 AST 活性比较

组别	ALT (卡门氏)	AST (卡门氏)	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)	CAT (U/gprot)
正常组	23.50	129.13	2.74	315.7	223.3
[0265] 中毒组	224.20	233.88	11.31	136.9	71.9
	灵芝	51.73	147.33	5.39	204.3
	水飞蓟宾	62.00	162.63	5.93	191.8
	制备例 1 酯	22.66	126.34	2.74	313.4
	制备例 1 盐	21.57	121.23	3.12	293.7
	制备例 2 酯	18.46	131.12	3.02	301.2
[0266]	制备例 2 盐	22.43	127.56	2.74	292.4
	制备例 3 盐	23.62	130.15	2.83	285.4
	制备例 4 盐	20.11	126.33	2.94	291.3
	对照例 1 盐	113.41	188.39	6.33	173.5
	对照例 2 盐	130.53	197.38	6.95	159.8
	对照例 3 盐	45.66	157.41	7.21	187.3
	对照例 4 盐	39.41	153.59	6.86	180.4
	对照例 5 盐	95.33	167.22	5.66	188.2
	对照例 6 盐	102.54	159.31	6.32	194.3
	市售品	46.3	148.23	6.42	203.2

[0267] 动物中毒后 ALT 和 AST 会明显升高，具有改善中毒症状作用的灵芝和水飞蓟宾对 ALT 和 AST 两个指标具有明显的改善，出人意料的是本发明各制备例试药具有改善 ALT 和

AST 指标的良好效果 ;盐与酯结果基本相同 ;然而各对照例对 ALT 和 AST 两个指标的改善效果明显不及本发明提供的化合物。另外还测定了 SOD (U/mgprot)、CAT (U/gprot)、MDA (nmol/mgprot) 三个参数,结果显示本发明化合物在这些指标方面同样具有出人意料的良好效果。

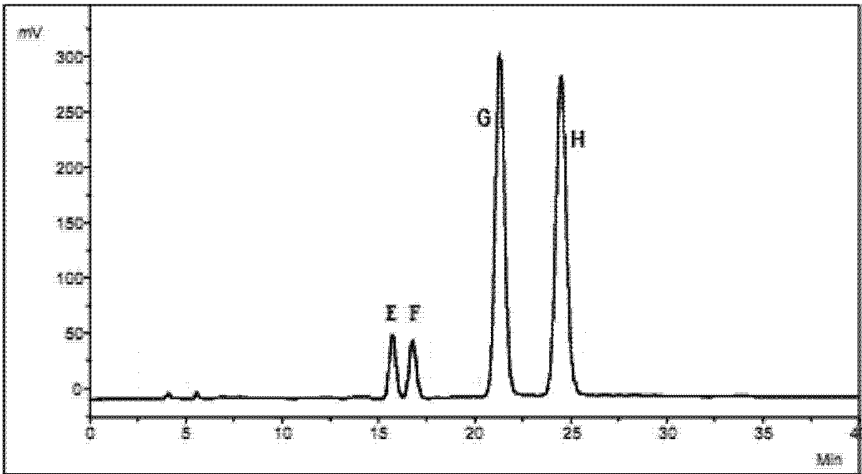


图 1

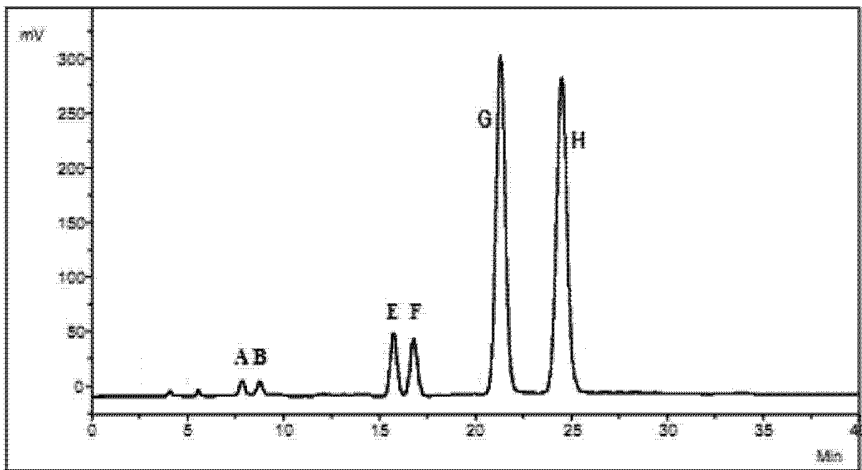


图 2