



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년11월24일
(11) 등록번호 10-1571409
(24) 등록일자 2015년11월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 493/10 (2006.01) C07D 493/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 493/10 (2013.01)
C07D 493/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7000697(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2007년12월04일
심사청구일자 2015년01월12일
- (85) 번역문제출일자 2015년01월12일
- (65) 공개번호 10-2015-0013356
- (43) 공개일자 2015년02월04일
- (62) 원출원 특허 10-2009-7013703
원출원일자(국제) 2007년12월04일
심사청구일자 2012년11월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2007/086390
- (87) 국제공개번호 WO 2008/073764
국제공개일자 2008년06월19일
- (30) 우선권주장
60/869,488 2006년12월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
US20060106234 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
알콘 리서치, 리미티드
미국 텍사스 포트 워스 사우쓰 프리웨이 6201(우: 76134)
- (72) 발명자
비들린스키 그레고리
캐나다 퀘벡 에이치8알 2비2 라살 에일리 스트리트 9321
해리스 그렉 로버트
미국 텍사스주 76134 포트 워스 웨스트클리프 로드 웨스트 3224
스콧 브릿 에스.
미국 텍사스주 76028 벌슨 오크릿지 코트 1025
- (74) 대리인
최규팔

전체 청구항 수 : 총 7 항

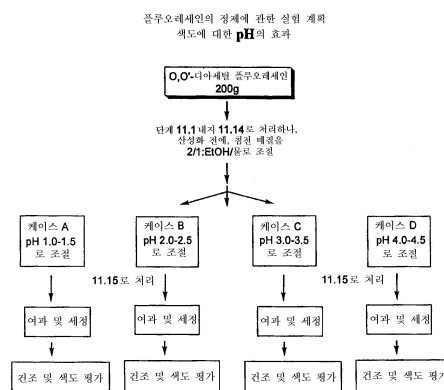
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 실질적으로 순수한 플루오레세인

(57) 요약

본 발명은 실질적으로 순수한 플루오레세인을 제조하기 위한 개선 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 실질적으로 순수한 플루오레세인 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 특히 혈관 조영에 사용되는 약제학적 조성물을 제공하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 제조되는 실질적으로 순수한 플루오레세인은 색도가 낮고, 염화나트륨 함량이 낮으며, 피리딘을 실질적으로 함유하지 않는다.

대표도 - 도2



명세서

청구범위

청구항 1

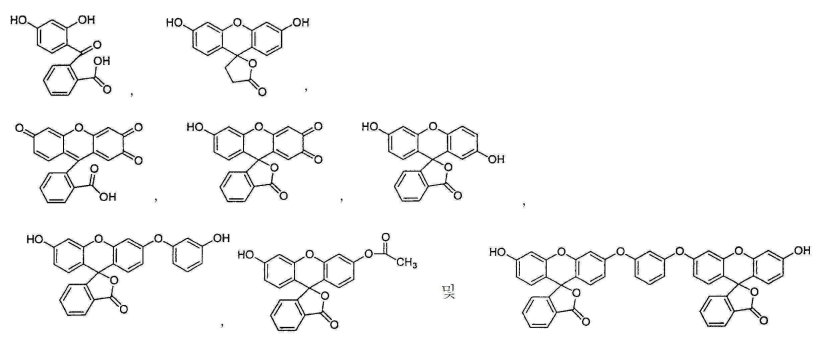
- (a) 상용 등급의 플루오레세인을 환류 온도에서 용매 및 시약으로서 무수 아세트산을 사용하여, 0,0'-디아세틸 플루오레세인으로 전환하는 단계;
- (b) 상용 등급의 플루오레세인으로부터 제조된 디아세틸플루오레세인을 물 중에서 소듐 하이드록사이드로 가수 분해하여 플루오레세인을 형성하는 단계;
- (c) 용액중의 플루오레세인에 색수 감소에 유효한 목탄을 첨가하여 플루오레세인/목탄 혼합물을 형성하는 단계;
- (d) 플루오레세인/목탄 혼합물을 여과하여 여액을 수득하는 단계;
- (e) 에탄올을 여액에 가하여 에탄올:물의 비율을 2:1로 하는 단계;
- (f) 2 내지 4시간 동안 냉각하면서, 염산 용액을 사용하여 pH를 1.0 내지 2.5로 조절하여 침전물을 형성하는 단계;
- (g) 용액을 여과하여 침전물을 보유하는 단계; 및
- (h) 침전물을 물 및 에탄올로 세정하는 단계를 포함하는, 정제된 플루오레세인의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 정제된 플루오레세인은 검출가능한 플루오레세인-관련 물질 불순물이 없거나, 0.1 중량% 이하의 단일 플루오레세인-관련 물질 불순물을 포함하거나, 또는 0.6 중량% 이하의 다수의 플루오레세인-관련 물질 불순물을 포함하는 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 정제된 플루오레세인은 하나 이상의 하기 식으로 표시되는 불순물을 0.06 중량% 미만으로 포함하는 제조 방법:



청구항 4

제 1 항에 있어서, 정제된 플루오레세인은 피리딘을 함유하지 않는 제조 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 정제된 플루오레세인은 불순물을 0.01 중량%를 초과하는 농도로 함유하지 않는 제조 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 정제된 플루오레세인은 색수가 0.015 내지 0.050 AUC인 제조 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 정제된 플루오레세인 내에 존재하는 잔류 염화물의 양이 0.25 중량% 미만인 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 실질적으로 순수한 플루오레세인을 포함하는 조성물, 실질적으로 순수한 플루오레세인을 제조하는 방법, 이러한 방법에 의해 제조되는 실질적으로 순수한 플루오레세인, 플루오레세인의 순도를 측정하기 위한 분석 방법, 및 혈관 조영에 사용되는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플루오레세인은 알칼리성 용액 중에서 강한 형광 발광을 나타내는 등적색 화합물, $C_{20}H_{12}O_5$ 이며, 해양학에서 트레이서 및 식물 염료로서 진단 목적용 약제와 같은 용도로서 사용된다.

[0003] 플루오레세인은 최초로 1871년에 석유 유도체 레소르시놀 (1,3-디하이드록시벤젠) 및 무수 프탈산으로부터 독일 화학자 아돌프 폰 바이어 (Adolf Von Baeyer)에 의해 합성되었다. 그 후에, 폴 에를리히 (Paul Erlich), 독일 세균학자는 안구의 수양액의 분비 경로를 추적하기 위해 "우라닌"으로 알려진 형광 염료 (나트륨염 플루오레세인으로서)를 사용하였다. 이는 생리학을 연구하기 위해 생체 내에 사용된 첫 번째 사례라고 할 수 있다.

[0004] 플루오레세인 혈관 조영은 안저혈관 상태를 조사할 수 있는 중요한 진단 수단이다. 이들 혈관은 망막을 포함하는 다수의 질환에 있어서의 인자이다. 혈관 조영은 대사의 암의 정맥으로 플루오레세인을 주입함으로써 행해진다. 단기간에 (즉, 통상 2, 3초 내지 수초), 염료는 안저혈관으로 이동되며, 특수 필터를 갖춘 카메라는 안구 혈관 내를 순환함에 따라, 염료를 이미지하는데 사용된다. 이렇게 하여 형성된 이미지의 조사를 통해, 순환 문제, 예를 들면, 혈관 누출, 팽창, 이상 또는 신생 혈관 등에 관하여 평가할 수 있다.

[0005] 플루오레세인은 465 내지 490 nm의 파장에서 일어나는 피크 흡수 및 여기를 갖는 청색광을 흡수한다. 형광 발광은 520 내지 530 nm의 황록색 파장에서 일어난다. 통상 플루오레세인으로 명명되지만, 혈관 조영에 사용된 염료는 플루오레세인 나트륨, 가용성 플루오레세인 이나트륨염이다.

[0006] 플루오레세인의 정상 성인 용량은 정맥 주사되는 500 mg이다. 통상 10% 용액 5 mL 또는 25% 용액 2 mL의 1회분으로 패키징된다. 순환계에 들어가자마자, 염료 분자의 약 80%가 혈청 단백질에 결합한다. 잔존하는 결합되어 있지 않거나 유리된 플루오레세인 분자는 적절한 파장의 빛으로 여기될 때에 형광을 발한다. 염료는 간에 의해 대사되어, 플루오레세인 모노글루쿠로나이드를 생성시켜, 결국 투여 후 24 내지 36 시간 이내에 제거된다.

[0007] 플루오레세인 제제 중의 플루오레세인의 순도가 부작용 및 주사 내성과 상호관련될 수 있는 것으로 보고되어 있다 ("Effective differences in the formulations of intravenous fluorescein and related side effects" by Yannuzi et al., in Am. J. Ophthalmol. 1974, 78(2) pages 217-221). 따라서, 혈관 조영에 이용되는 플루오레세인 조성물로부터 전체 또는 반응물 전체의 불순물을 제거하는 것이 본 발명의 주요 목적이다.

[0008] 하기 공보는 플루오레세인 조성물 및 플루오레세인을 제조하여 정제하는 방법에 관한 추가의 정보를 언급하고 있다.

[0009] 독일 특허 제136498호 (Friedrich et al.; 발명의 명칭: "Process for Preparing Highly Purified Fluorescein for Injection Purposes")는 피리딘을 이용한 플루오레세인의 제조 방법을 기재하고 있다.

[0010] 미국 특허 공개 제US2006/0106234A1호 (Tran-Guyon et al.; 발명의 명칭: "High Purity Phthalein Derivatives and Method for Preparing Same")는 무수 용매를 이용한 플루오레세인의 제조 방법을 기재하고 있다.

[0011] 하기 특허 또는 공보는 또한 추가의 배경에 대하여 참고로 할 수 있다: 미국 특허 제5,637,733호 (Sujeeth; "Synthesis of fluorescein compounds with Excess Resorcinol as a Solvent") 및 미국 특허 제1,965,842호 (Kranz; "Production of Hydroxybenzene-Phthaleins").

[0012] 고도로 정제된 플루오레세인은 주사용 용액의 제조에 필요하다. 사용된 정제된 플루오레세인은 이상적으로 (i) 독성을 나타내고/나타내거나 형광 발광이 결여될 수 있는 불순물을 함유하지 않고; (ii) 주사용 플루오레세인 제

품의 허용할 수 없을 정도로 높은 오스몰 농도 또는 고침투압을 유도할 수 있는 낮은 염; 및 저 색도를 나타내어야 한다. 특정 불순물은 강하게 착색된다. 따라서, 특정 주파수에서의 색도가 없으면 이러한 불순물이 없음을 나타낼 수 있다. 따라서, 플루오레세인 조성물의 색도 프로파일은 상당한 품질 특성 및 순도의 시각적 마커로서 고려된다.

[0013] 플루오레세인 조성물에 존재할 수 있는 매우 적은 레벨의 불순물을 확인하여 정량화하는 방법이 요구된다. 이러한 방법은 존재할 수 있는 이들 불순물을 분리, 확인 및 정량화할 수 있어야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서, 고도로 순수하고, 색도가 낮으며, 염화나트륨 함량이 낮은 플루오레세인 조성물, 및 피리딘 또는 다른 비수 (및 잠재적으로 유독한) 용매의 사용을 필요로 하지 않는 이러한 플루오레세인의 제조 방법 및 이러한 플루오레세인의 순도를 측정하는 방법이 필요하다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시키는 것에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] (발명의 요약)

[0016] 본 발명은 실질적으로 순수한 플루오레세인을 포함하는 조성물, 정제된 플루오레세인의 신규한 개선 방법, 및 이들 방법을 통해 제조된 플루오레세인 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 실질적으로 순수한 플루오레세인을 포함하는 혈관 조영에 사용되는 약제학적 조성물 및 플루오레세인 조성물의 순도를 측정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 제조된 고도로 정제된 플루오레세인은 종래의 플루오레세인 조성물보다 낮은 레벨의 관련 물질 불순물을 갖는다. 이들 신규 방법에 의해 제조된 플루오레세인은 또한 다른 공지의 조성물보다 색도가 낮으며 (590 nm에서), 이는 순도에 대한 분명히 보이는 마커를 제공한다. 본 발명의 플루오레세인은 염화나트륨 함량이 낮으므로, 다른 공지의 조성물보다 약제학적 용도를 위해 더욱더 용이하게 제형화된다. 본 발명의 방법은 정제 공정에서 피리딘의 사용을 제거하고, 무수 용매의 사용을 필요로 하지 않으며, 조제의 플루오레세인을 아세틸화하는데 필요한 무수 아세트산의 양을 감소시키고, 고도로 정제된 플루오레세인의 수율을 향상시킴으로써, 다른 공지의 방법을 개선한 것이다. 본 발명은 또한 플루오레세인 조성물 중의 관련 물질 불순물을 분리하여 정량화하므로, 플루오레세인 조성물의 순도를 측정하는 확실한 방법을 제공함으로써 최신 기술을 향상시킨 것이다.

[0017] 본 발명은 하기에 요약된 것을 포함하나 이들에 한정되지 않는 다양한 용도로 구체화될 수 있다:

[0018] 본 발명의 실시형태는 실질적으로 순수한 플루오레세인, 특히, 피리딘을 실질적으로 함유하지 않는 플루오레세인을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 실시형태는 약 0.1 중량%, 더욱 바람직하게는 0.01 중량%를 초과하는 농도로 관련 물질 불순물을 함유하지 않는 실질적으로 순수한 플루오레세인에 관한 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 실시형태는 색수 (color number)가 약 0.015 내지 약 0.050 AUC인 실질적으로 순수한 플루오레세인에 관한 것이다.

[0021] 본 발명의 다른 실시형태는 잔류 염화물 함량이 약 0.25 중량% 미만인 실질적으로 순수한 플루오레세인에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 다른 실시형태는 물질 관련 불순물의 전체량이 약 0.6 중량% 미만, 바람직하게는 0.06 중량% 미만이다.

[0023] 본 발명의 다른 실시형태는 실질적으로 순수한 플루오레세인의 제조 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 디아세틸플루오레세인을 가수분해하여 플루오레세인을 형성하고, 플루오레세인을 목탄으로 처리하여, 여과하고, 에탄올을 여액에 가해, 산성 용액을 사용하여 pH를 조정하여 침전물을 형성하고, 여과하여, 세정하는 것을 포함한다. 이러한 실시형태의 한 측면에 있어서, pH 레벨은 약 1.0 내지 약 2.5로 조절된다. 다른 측면에 있어서, 냉각 온도는 pH 레벨을 조절하면서, 약 20°C 내지 약 25°C로 유지되며, pH 레벨은 약 2 내지 약 4 시간 동안에 조절된다. 본 발명은 또한 이러한 방법에 의해 제조된 실질적으로 순수한 플루오레세인 조성물에 관한 것이다.

- [0024] 본 발명의 다른 실시형태는 플루오레세인 관련 물질 불순물의 레벨을 정량화하기 위한 HPLC법을 제공한다. 상기 방법은 조성물의 고압 액체 크로마토그램을 얻고; 관련 물질 불순물에 대응하는 크로마토그램의 피크를 확인하며; 피크 면적 측정을 행하여, 이의 상대 농도를 측정하는 것을 포함한다. 이러한 실시형태의 한 측면에 있어서, 피크는 상대 HPLC 체류 시간이 약 0.75, 1.19, 1.23, 1.68 및 1.71이다. 다른 실시형태는 플루오레세인 중의 관련 물질 불순물을 확인하기 위한 HPLC/MS법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 실시형태는 실질적으로 순수한 플루오레세인; 특히, 피리딘을 실질적으로 함유하지 않는 플루오레세인을 포함하는 혈관 조영에 사용되는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태는 물질 관련 불순물을 약 0.1 중량%, 더욱 바람직하게는 0.01 중량%를 초과하는 농도로 함유하지 않는 실질적으로 순수한 플루오레세인을 포함하는 혈관 조영에 사용되는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태는 조성물 중에 존재하는 관련 물질 불순물의 전체량이 약 0.6 중량% 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.06 중량% 미만인 실질적으로 순수한 플루오레세인을 포함하는 혈관 조영에 사용되는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태는 색수가 약 0.015 내지 약 0.050 AUC인 실질적으로 순수한 플루오레세인을 포함하는 혈관 조영에 사용되는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명의 다른 바람직한 실시형태는 잔류 염화물의 양이 약 0.25 중량% 미만인 혈관 조영에 사용되는 플루오레세인의 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명은 하기 도면 및 상세한 설명을 이용하여 더욱더 충분히 검토된다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 방법에 의해 제조된 고도로 정제된 플루오레세인은 종래의 플루오레세인 조성물보다 낮은 레벨의 관련 물질 불순물을 갖는다. 이들 신규 방법에 의해 제조된 플루오레세인은 또한 다른 공지의 조성물보다 색도가 낮으며 (590 nm에서), 이는 순도에 대한 분명히 보이는 마커를 제공한다. 본 발명의 플루오레세인은 염화나트륨 함량이 낮으므로, 다른 공지의 조성물보다 약제학적 용도를 위해 더욱더 용이하게 제형화된다. 본 발명의 방법은 정제 공정에서 피리딘의 사용을 제거하고, 무수 용매의 사용을 필요로 하지 않으며, 조제의 플루오레세인을 아세틸화하는데 필요한 무수 아세트산의 양을 감소시키고, 고도로 정제된 플루오레세인의 수율을 향상시킴으로써, 다른 공지의 방법을 개선한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 플루오레세인 세정 실험에 관한 실험 계획 도식이다.
- 도 2는 플루오레세인 pH/침전 실험에 관한 실험 계획 도식이다.
- 도 3는 실시예 3에 기재된 플루오레세인 약제 원료의 색 강도를 나타내는 자외선/가시광선 스펙트럼이다.
- 도 4는 실시예 5에 기재된 회색제 블랭크의 HPLC 크로마토그램이다.
- 도 5는 실시예 5에 기재된 1% USP 플루오레세인 표준물질의 HPLC 크로마토그램이다.
- 도 6는 실시예 5에 기재된 제조업자 A 플루오레세인 원료의 HPLC 크로마토그램이다.
- 도 7은 실시예 5에 기재된 0.8% 레소르시놀이 혼입된 새로운 방법의 플루오레세인 원료의 HPLC 크로마토그램이다.
- 도 8은 실시예 5 및 6에 기재된 플루오레세인 및 제안된 불순물의 구조의 다이어그램이다.
- 도 9는 플루오레사이트 주입량의 대표적인 HPLC 크로마토그램이다.
- 도 10 (a)는 자외선 검출을 이용한 플루오레사이트 주입량의 크로마토그램이다.
- 도 10 (b)는 13.65-14.45 분에서 샘플링된 플루오레세인의 HPLC 피크의 서머스프레이 (thermospray) 질량 스펙트럼이다.
- 도 11 (a)는 질량 분석계를 이용한 m/z 259에서의 질량 선택 검출에 의한 플루오레사이트 주입량 중의 불순물 A

의 크로마토그램이다.

도 11 (b)는 11.95-12.05 분에서 샘플링된 불순물 A의 HPLC 피크의 서머스프레이 질량 스펙트럼이다.

도 12 (a)는 질량 분석계를 이용한 m/z 285에서의 질량 선택 검출에 의한 플루오레사이트 주입량 중의 불순물 B의 크로마토그램이다.

도 12 (b)는 15.45-15.55 분에서 샘플링된 불순물 B의 HPLC 피크의 서머스프레이 질량 스펙트럼이다.

도 13 (a)는 질량 분석계를 이용한 m/z 347에서의 질량 선택 검출에 의한 플루오레사이트 주입량 중의 불순물 C의 크로마토그램이다.

도 13 (b)는 16.10-16.50 분에서 샘플링된 불순물 C의 HPLC 피크의 서머스프레이 질량 스펙트럼이다.

도 14 (a)는 질량 분석계를 이용한 m/z 347에서의 질량 선택 검출에 의한 플루오레사이트 주입량 중의 불순물 D의 크로마토그램이다.

도 14 (b)는 18.20-18.65 분에서 샘플링된 불순물 D의 HPLC 피크의 서머스프레이 질량 스펙트럼이다.

도 15 (a)는 질량 분석계를 이용한 m/z 333에서의 질량 선택 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 E의 크로마토그램이다.

도 15 (b)는 13.23-13.52 분에서 샘플링된 불순물 E의 HPLC 피크의 APCI 질량 스펙트럼이다.

도 15 (c)는 220-500 nm의 전체 흡광도 스캔에 의한 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 E의 크로마토그램이다.

도 15 (d)는 불순물 E 피크의 자외선-가시광선 스펙트럼이다.

도 16 (a)는 질량 분석계를 이용한 m/z 425에서의 질량 선택 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 F의 크로마토그램이다.

도 16 (b)는 19.10-19.32 분에서 샘플링된 불순물 F의 HPLC 피크의 APCI 질량 스펙트럼이다.

도 16 (c)는 220-500 nm의 전체 흡광도 스캔에 의한 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 F의 크로마토그램이다.

도 16 (d)는 불순물 F 피크의 자외선-가시광선 스펙트럼이다.

도 17 (a)는 질량 분석계를 이용한 m/z 375에서의 질량 선택 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 G의 크로마토그램이다.

도 17 (b)는 21.27-21.54 분에서 샘플링된 불순물 G의 HPLC 피크의 APCI 질량 스펙트럼이다.

도 17 (c)는 220-500 nm의 전체 흡광도 스캔에 의한 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 G의 크로마토그램이다.

도 17 (d)는 불순물 G 피크의 자외선-가시광선 스펙트럼이다.

도 18 (a)는 51.75-51.85 분에서 샘플링된 불순물 H-1의 HPLC 피크의 APCI 질량 스펙트럼이다.

도 18 (b)는 220-500 nm의 전체 흡광도 스캔에 의한 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 H-1의 크로마토그램이다.

도 19 (a)는 52.67-52.79 분에서 샘플링된 불순물 H-2의 HPLC 피크의 APCI 질량 스펙트럼이다.

도 19 (b)는 220-500 nm의 전체 흡광도 스캔에 의한 검출에 의한 플루오레세인 중의 불순물 H-2의 크로마토그램이다.

도 20은 불순물 H-2의 자외선-가시광선 흡광도 스캔이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 명세서에 사용된 하기 약어 및 용어는 달리 지시하지 않는 한, 하기 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다:

[0034] 약어 "APCI"는 대기압 화학 이온화를 의미한다.

- [0035] 약어 "M/S" 또는 "MS"는 질량 분석계를 의미한다.
- [0036] 약어 "HPLC"는 고속 액체 크로마토그래피를 의미한다.
- [0037] 약어 "UV-Vis"는 자외선-가시광선을 의미한다.
- [0038] 약어 "LC/MS"는 액체 크로마토그래피/질량 분석계를 의미한다.
- [0039] 용어 "목탄"은 색수를 감소시키는데 효과적인 활성화 탄소제를 포함한다. 전형적인 탄소제로는 제조업자 Univar USA (Dallas, Texas)에서 시판하는 Norit® SA Plus 및 Norit® SX Ultra를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0040] 색수를 감소시킬 수 있는 목탄의 형태는 일상적인 실험을 통해 결정될 수 있다 (예를 들면, 색수를 감소시키는데 효과적이지 않는 다른 시판용 목탄 형태, 즉, Darco® KB가 결정되었다).
- [0041] 용어 "색수"는 590 nm에서 측정되는 경우, pH 9.4에서 수산화나트륨 및 중탄산나트륨 수용액 중에서 제조된 플루오레세인 원료의 1.0% 용액의 흡광도이다.
- [0042] 용어 "플루오레세인 약제 원료" 및 "플루오레세인 원료"는 본 명세서에서 교호적으로 사용된다.
- [0043] 용어 "관련 물질 불순물"은 플루오레세인 및/또는 플루오레세인 반응물의 합성 불순물, 이성질체, 산화 생성물, 이합체화 생성물 및 분해 생성물을 포함한다. 이러한 관련 물질 불순물의 전형적인 구조는 도 8에 나타난다.
- [0044] 용어 "피리딘을 실질적으로 함유하지 않는"은 플루오레세인 조성물이 피리딘을 적어도 99% 함유하지 않는 것을 의미한다. 분석 순도가 적어도 99.9%인 것이 더욱 바람직하며; 플루오레세인 조성물이 피리딘을 전혀 함유하지 않는 것이 보다 더 바람직하다.
- [0045] 용어 "실질적으로 순수한 플루오레세인"은 불순물, 예컨대 관련 물질 불순물의 완전 부재, 또는 완전 부재에 가까운 것을 말한다. 예를 들면, 플루오레세인 조성물이 실질적으로 순수하다고 하면, 검출가능한 관련 물질 불순물이 없거나, 단일 관련 물질 불순물이 검출되는 경우에, 0.1 중량% 이하의 양으로 존재하거나, 다수의 관련 물질 불순물이 검출되는 경우에, 이들이 0.6 중량% 이하의 양으로 응집체로 존재한다.
- [0046] 본 발명의 방법은 낮은 관련 물질 불순물 프로파일을 갖는 플루오레세인 생성물을 제조한다. 통상적으로 더욱 더 정제된 플루오레세인 물질이 저 레벨의 특정 불순물, 예를 들면, 레소르시놀 및 2-(2',4'-디하이드록시벤조일)벤조산을 함유하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 시판용 샘플의 플루오레세인이 레소르시놀 및 2-(2',4'-디하이드록시벤조일)벤조산 이외에도, 다수의 불순물을 함유할 수 있음은 이전에 공지되지 않았다. 이들 잠재적인 불순물은 본 발명의 방법을 통해 실질적으로 감소된다. 이러한 불순물은 본 명세서에서 총괄하여 "관련 물질 불순물"로 명명된다.
- [0047] 이들 관련 물질 불순물의 분자량을 LC/MS로 측정하기 위해 실험을 행하여, 이론에 의해 뒷받침되어 있지 않더라도, 이들 불순물의 구조는 본 명세서에 제안되어 있다 (도 8 참조). 정제된 플루오레세인 조성물에도 존재할 수 있는 저 레벨의 관련 물질 불순물을 분해하여 정량화하는 방법이 발견되었으며, 하기에 상세히 기술되어 있다. 본 발명의 방법이 관련 물질 불순물의 레벨이 실질적으로 감소된 고도로 정제된 플루오레세인을 제공한다 는 것을 알아냈다. 표 2에 나타난 바와 같이, 여러 제조업자의 공급용 플루오레세인의 불순물 프로파일 및 표 3 내지 표 5에서 하기에 나타난 여러 제조업자의 플루오레세인 약제 원료의 불순물 프로파일과 비교하여, 표 1에서 하기에 나타난 본 발명의 정제된 플루오레세인 약제 원료의 불순물 프로파일에서 알 수 있다.
- [0048] 표 1:
- [0049] 본 발명의 방법의 플루오레세인 약제 원료^a의 검증 배치의 불순물 프로파일

검출 번호	불순물 A	RRT 1.10	불순물 C	불순물 D	불순물 E	불순물 F	불순물 G	불순물 H-1	불순물 H-2	RRT 1.74	합계 (%)
1	ND ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0
2	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ ^c	ND	< LOQ ^c	< LOQ ^c	ND	0.0
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ ^c	ND	0.0

^a 레소르시놀을 3개의 로트 각각에서 분리방법으로 분석하였다. 각 로트의 레소르시놀 농도는 0.05% 미만이었다.

^b ND = 미검출, < 0.01%^c

^c LOQ = 0.025%의 정량 한계값 미만, 0.01%로 평가됨.

[0050]

[0051]

표 2:

[0052]

여러 제조업자의 공업용급 플루오레세인의 불순물 프로파일

제조업자 참조 번호	불순물 A (%)	RRT 1.10 (%)	불순물 C (%)	불순물 D (%)	불순물 E (%)	불순물 F (%)	불순물 G (%)	불순물 H-1 (%)	불순물 H-2 (%)	RRT 1.74 (%)	합계 (%)
제조업자 B 4	0.3	---	---	0.1	---	0.7	---	0.3	0.3	---	4.4 ^a
제조업자 B 5	0.4	---	---	0.06	---	0.6	---	0.2	0.2	---	3.8 ^a
제조업자 B 6	0.2	---	---	0.01	---	0.5	---	0.2	0.2	---	1.5 ^a
제조업자 B 7	0.6	--	---	0.07	---	0.07	---	0.06	0.1	--	0.9
제조업자 B 8	0.7	--	---	0.07	---	0.08	---	0.06	0.1	--	1.0
제조업자 B 9	0.6	--	---	0.7	---	0.7	---	0.4	0.1	--	0.9
제조업자 B 10	0.45	---	---	0.59	---	0.15	---	0.21	0.22	---	4.21 ^b
제조업자 B 11	0.64	---	---	0.53	---	0.14	---	0.18	0.19	---	4.15 ^b

[0053]

[0054]

표 2 (계속):

제조업자 참조 번호	불순물 A (%)	RRT 1.10 (%)	불순물 C (%)	불순물 D (%)	불순물 E (%)	불순물 F (%)	불순물 G (%)	불순물 H-1 (%)	불순물 H-2 (%)	RRT 1.74 (%)	합계 (%)
제조업자 C 12	0.68	---	---	0.54	---	0.14	---	0.18	0.19	---	4.20 ^b
제조업자 C 13	---	---	---	1.22	---	0.11	---	0.97	0.98	0.11	5.57 ^c
제조업자 D 14	5.9	---	---	0.2	---	0.8	---	0.01	0.01	---	9.4 ^d
제조업자 D 15	5.6	---	---	0.1	---	0.9	---	0.01	0.02	---	9.6 ^d
제조업자 D 16	5.3	---	---	0.2	---	1.0	---	0.01	0.02	---	9.5 ^d
제조업자 D 17	5.3	---	---	0.2	---	1.0	---	0.01	0.03	---	9.7% ^d

^a 미지의 불순물도 0.06% 내지 0.9%의 농도 범위로 존재한다.

^b 미지의 불순물도 0.06% 내지 0.7%의 농도 범위로 존재한다.

^c 미지의 불순물도 0.05% 내지 0.5%의 농도 범위로 존재한다.

^d 미지의 불순물도 0.06% 내지 0.8%의 농도 범위로 존재한다.

[0055]

[0056]

표 3:

[0057]

제조업자 A에 의해 제조된 플루오레세인 약제 원료의 불순물 프로파일

제조업자 참조 번호	불순물 A (%)	RRT 1.10 (%)	불순물 C (%)	불순물 D (%)	불순물 E (%)	불순물 F (%)	불순물 G (%)	불순물 H-1 (%)	불순물 H-2 (%)	RRT 1.74 (%)	합계 (%)
제조업자 A 18	< 0.05	---	---	---	0.1	0.3	---	---	---	--	0.4
제조업자 A 19	< 0.05	--	---	---	< 0.05	0.09	---	---	---	--	0.09
제조업자 A 20	0.2	---	---	---	0.06	0.09	---	---	---	--	0.4

[0058]

[0059]

표 4:

[0060]

제조업자 E에 의해 제조된 플루오레세인 약제 원료의 불순물 프로파일

제조업자 참조 번호	불순물 A (%)	RRT 1.10 (%)	불순물 C (%)	불순물 D (%)	불순물 E (%)	불순물 F (%)	불순물 G (%)	불순물 H-1 (%)	불순물 H-2 (%)	RRT 1.74 (%)	합계 (%)
제조업자 E 21	< 0.05	--	< 0.05	---	< 0.05	< 0.05	0.08	--	--	--	0.08
제조업자 E 22	< 0.05	---	< 0.05	---	< 0.05	< 0.05	0.07	--	--	--	0.07
제조업자 E 23	< 0.05	---	< 0.05	---	< 0.05	< 0.05	0.1	--	--	--	0.1
제조업자 E 24	---	--	--	< 0.05	---	< 0.05	---	0.06	< 0.05	--	0.06
제조업자 E 25	0.07	---	---	0.05	---	0.2	< 0.05	0.1	0.2	--	0.6
제조업자 E 26	0.06	---	---	0.05	---	0.2	< 0.05	0.1	0.2	--	0.6
제조업자 E 27	0.07	---	---	0.05	---	0.2	< 0.05	0.1	0.2	---	0.6

[0061]

[0062]

표 5:

[0063]

제조업자 F에 의해 제조된 플루오레세인 약제 원료의 불순물 프로파일

제조업자 참조 번호	불순물 A (%)	RRT 1.10 (%)	불순물 C (%)	불순물 D (%)	불순물 E (%)	불순물 F (%)	불순물 G (%)	불순물 H-1 (%)	불순물 H-2 (%)	RRT 1.74 (%)	합계 (%)
제조업자 F 28	0.1	0.03	---	0.05	---	0.2	---	0.1	0.1	0.03	0.7
제조업자 F 29	0.03	< 0.025	---	0.03	---	0.05	---	0.05	0.06	< 0.025	0.2
제조업자 F 30	0.05	< 0.025	---	0.04	---	0.1	---	0.1	0.1	0.04	0.5
제조업자 F 31	0.04	< 0.025	---	0.04	---	0.07	---	0.09	0.1	0.03	0.4
제조업자 F 32	0.04	--	---	0.04	---	0.1	---	0.07	0.08	--	0.3
제조업자 F 33	0.03	--	---	0.04	---	0.09	---	0.07	0.07	--	0.3
제조업자 F 34	0.04	--	---	0.03	--	0.08	---	0.05	0.05	--	0.3
제조업자 F 35	0.03	--	---	0.04	---	0.08	---	0.07	0.08	--	0.3

[0064]

[0065]

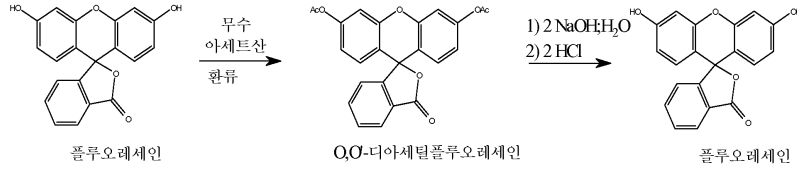
표 5 (계속):

제조업자 참조 번호	불순물 A (%)	RRT 1.10 (%)	불순물 C (%)	불순물 D (%)	불순물 E (%)	불순물 F (%)	불순물 G (%)	불순물 H-1 (%)	불순물 H-2 (%)	RRT 1.74 (%)	합계 (%)
제조업자 F 36	0.03	--	---	0.04	---	0.1	---	0.08	0.1	--	0.4
제조업자 F 37	0.03	--	---	0.04	---	0.08	---	0.07	0.09	--	0.3
제조업자 F 38	0.03	--	---	0.04	---	0.1	---	0.08	0.07	--	0.3
제조업자 F 39	0.03	--	---	0.0	---	0.1	---	0.09	0.07	--	0.3
제조업자 F 40	0.03	--	0.03	0.04	---	0.08	---	0.08	0.07	--	0.3
제조업자 F 41	0.03	---	0.03	0.04	---	0.07	---	0.07	0.07	---	0.3
제조업자 F 32	0.03	---	0.03	0.04	---	0.09	---	0.07	0.07	---	0.3
제조업자 F 43	0.04	---	---	0.03	---	0.09	---	0.07	0.09	---	0.3

[0066]

[0067]

본 발명에 포함된 일반적인 방법의 개요는 하기에 설명된다. 상용 등급 플루오레세인은 환류 온도에서 무수 아세트산과의 반응을 통해 디아세틸화된다. 이렇게 하여 제조된 디아세틸화 플루오레세인은 분리된 다음에, 염기와 반응하여, 탈아세틸화 플루오레세인이 제조된 다음에, 목탄으로 처리되어, 고순도 및 저 염화물 함량의 색도가 낮은 플루오레세인이 제조된다. 반응도식은 하기에 예시된다:



[0068]

[0069]

본 발명의 순수한 플루오레세인을 제조하는데 사용되는 특정 용매, 반응 시간 및 온도, 및 pH 값은 일련의 실험에 기초하여 결정되었다. 이들 실험의 목적은 이들 실험의 목적은 색도 및 염 함량이 낮은 고순도 의약 등급 플루오레세인을 얻고, 종래의 공지 방법에 사용된 유독한 용매, 즉 피리딘의 사용을 피하는 것이었다. 추가의 목적은 예를 들면, 최소량의 용매를 사용하거나, 필요한 단계의 반응 사이클 시간(들)을 줄임으로써 방법에 포함된 비용 및 시간을 최소화하는 것이었다.

[0070]

플루오레세인을 정제하는 방법은 플루오레세인을 0,0'-디아세틸플루오레세인으로 전환시키는 것으로 시작된다. 이를 위해, 무수 아세트산은 용매 및 시약으로서 사용되어, 종래기술의 방법에 사용되는 피리딘, 유독한 용매의 사용을 완전히 피한다. 따라서, 플루오레세인과 무수 아세트산의 혼합물은 환류하에 수시간 동안 교반되어, 얻어진 현탁액을 냉각시킨다. 빙점 또는 빙점 바로 아래로 냉각시키면, 충분한 결정화를 달성한다. 결정화 물질은 수집되어, 처음에 냉각 무수 아세트산, 그 다음에 냉각 아세톤으로 세정된다. 그 다음에, 이 물질은 교반 및 미온하에 아세톤에 재현탁된다. 냉각 후에, 백색 결정성 물질은 수집되어, 냉각 아세톤으로 세정되고, 공기 건조되어, 고순도 0,0'-디아세틸플루오레세인이 얻어진다.

[0071]

다음에, 0,0'-디아세틸플루오레세인은 나트륨염의 생성 및 최종 불순물의 제거와 함께 다시 플루오레세인으로 전환된다. 이러한 전환을 달성하기 위해, 0,0'-디아세틸플루오레세인의 아세틸기는 가성 용액을 사용하여 가수분해된다. 따라서, 0,0'-디아세틸플루오레세인 및 메탄올은 적절한 용기에 주입되고, 탈이온수 중의 제조된 수산화나트륨 용액이 가해지며, 혼합물은 교반하에 가열, 환류된다. 그 다음에, 혼합물은 냉각되고, 여과 조제를 사용하여 여과된 다음에, 메탄올로 세정된다. 그 다음에, 여액의 체적은 진공 증류에 의해 감소되고, 물이 가해져서, 반응 혼합물이 냉각된다. 그 다음에, 반응 혼합물의 pH는 8.5 내지 8.7로 조절된다. 적절한 목탄, 예를 들면, Norit® SX Ultra는 교반하에 1 시간 동안 가해진다. 필요에 따라, 목탄 단계는 반복된다. 다음에, 임계 침전 단계를 행한다. 처음에, 2:1 비율의 에탄올/물이 얻어지도록 에탄올을 여액에 가한다. 이 비율은 침전 절차에 있어서의 고 비율의 유기 용매/물이 플루오레세인 생성물에 저 염화물 함량을 가져온다는 예기치 않은 발견에 기초를 두고 있다. 이러한 결과를 인식하도록 행해진 실험은 하기에 설명된다. 다음에, 플루오레세인을 산성화하기 위해, 보정된 pH 범위가 확정되도록 희석된 염산 용액이 가해진다. 이 범위는 저 pH가 더욱 바람직한 색도를 갖는 생성물을 제공한다는 예기치 않은 발견에 기초하고 있다. 특히, 여액의 최적 pH 범위가 1.0 내지 2.5이어야 하고, 산성화가 서서히, 예를 들면 생성물의 응집을 피하도록 2 내지 4 시간의 기간에 걸쳐서 냉각하에 행해지는 실험을 통해 결정되었다. 추가의 교반 및 냉각 후에, 플루오레세인은 여과에 의해 분리된다. 생성물은 물과 에탄올의 용액으로 세정되고, 생성물은 건조되어, 매우 높은 품질의 플루오레세인의 80 내지 90% 수율을 제공한다. 고순도의 플루오레세인은 주사용 플루오레세인의 제조시에 사용될 수 있다. 이를 위해, 플루오레세인은 수산화나트륨을 사용하여 가용성 이나트륨염 형태로 전환되어, 후속 멸균을 위해 앰플에 채워진다.

[0072]

본 발명의 방법을 달성하기 위해 행해진 실험의 일례로는 플루오레세인 생성물이 침전되는 pH 범위의 보정이다. 이러한 pH 범위는 부분적으로는 생성된 생성물의 색 스펙트럼에 관한 실험적 관찰에 기초하여 높은 범위에서 낮은 범위로 조절되었다. 따라서, 플루오레세인 생성물이 색도가 낮은 생성물의 목적을 달성하기 위해 침전되는 최적 pH 범위가 약 pH 1.0 내지 약 pH 2.5인 것으로 측정되었다.

[0073]

또한 침전 절차에서 고 비율의 유기 용매/수성 용매가 플루오레세인 생성물 중에 저 염화물 함량을 나타낸다는 것을 예기치 않게 알아냈다. 저 유기/수성 용매 비가 염화나트륨 레벨을 감소시키는데 필요한 것으로 예기되는 바와 같이, 이러한 결과는 예기되지 않았다. 고 비율의 유기 용매의 사용은 여과 속도를 향상시키는 이익을 부가시켜, 물질을 처리하는데 필요한 시간을 줄인다.

[0074] 또한, 침전 실험은 본 발명의 방법을 전개하기 위해 행해지며, 하기에 설명되고, 도 1 및 2에 나타난다. 특히, 실험은 하기 표 6에 나타난 바와 같이, 침전 과정을 변경시켜 염화물 레벨을 감소시키도록 행해졌다.

[0075] 표 6: 침전 실험

실험 참조	물:에탄올 비	체적	세정* (Y 또는 N)	염화물 (% wt)	코멘트
A	1:1	10	N	0.91	황적색 고체
	1:1	15	N	0.87	황적색 고체
B	1:1	10	N	0.80	황적색 고체
	2:1	15	N	0.97	황적색 고체
C	1:1	10	N	0.76	황적색 고체
	1:2	15	N	0.65	암적색 고체
D	1:1	10	N	1.45	86% 수율 황적색 고체
E	1:2	15	N	0.45	92% 수율 암적색 고체
F	1:1	10	Y	0.10	87% 수율 황적색 고체
G	1:2	15	Y	0.0056	78% 수율 암적색 고체
H	1:1	10	N	1.05	황적색 고체
I	1:2	15	N	0.49	암적색 고체
J	1:1	10	Y	0.13	황적색 고체
K	1:2	15	Y	0.026	암적색 고체

*물:에탄올, 3:1, 2 x 1 체적 위시

[0076] 표 6는 침전 매질 중의 용매 비의 변화가 존재하는 염화물의 양에 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 특히, 침전 매질 중의 에탄올/물 비를 증가시키면, 저 염화물 함량을 얻는다. 실험 A는 물:에탄올 (1:1) 침전 매질의 체적이 10개의 체적 (기준)에서 15개의 체적으로 증가되는 경우에, 염화물 함량에 있어서 최저 감소량을 나타낸다 (표 6 참조). 실험 B는 물:에탄올 (1:1, 10개의 체적, 기준)의 침전을 물:에탄올 (2:1, 15개의 체적)의 침전과 비교한 것이다. 실험 결과는 저 수분 함량 및 저 체적을 갖는 참고 반응이 저 염화물 함량을 산출한다는 점에서 반직관적이다.

[0078] 실험 C는 물:에탄올 (1:1, 10개의 체적, 기준)의 침전을 물:에탄올 (1:2, 15개의 체적)의 침전과 비교한 것이다. 실험 C의 결과는 고 유기 함량의 침전 매질이 저 염화물 함량을 산출한다는 것을 나타낸다.

[0079] 침전 매질 중의 고 유기 함량이 저 염화물 함량을 산출하는 경향은 세정되지 않은 생성물 및 세정된 생성물에 대하여 실험 D, E, F 및 G, 및 실험 H, I, J 및 K에서 재현된다. 결과가 반직관적으로 나타나지만, 이론에 의해 뒷받침되지 않더라도, 높은 유기 함량에 의해 생성물 케이크를 신속하고도 효과적으로 위시할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0080] 다른 측면에서는 플루오레세인 색도가 침전 매질의 pH에 의존하는지가 고려되고, 하기 표 7를 참조하며, 2:1 비율의 에탄올:물의 침전 매질이 사용된다.

[0081] 표 7:

[0082] pH 함수로서의 플루오레세인 색도

[0083] [에탄올:물 (2:1)의 침전 매질]

실험 참조	pH 1.0-1.5	pH 2.0-2.5	pH 3.0-3.5	pH 4.0-4.5
L	적색 고체	적색 고체	적갈색 고체	갈색 고체

[0084] 그 결과는 플루오레세인 색도가 pH 변화에 민감하다는 것을 나타낸다. 예를 들면, 약 3.0의 pH에서, 생성물의 외관이 적갈색 색조를 나타내기 시작하므로, 바람직하지 않은 것으로 여겨진다.

[0086] 하기 실시예 1 내지 8은 본 발명의 특정한 실시형태를 예시하기 위해 주어진다. 실시예 5, 6, 7 및/또는 8에서 얻어진 대표적인 데이터는 도 9 내지 19에 나타난다.

[0087] 도 9 내지 14에 관한 데이터를 HPLC와 결합된 서머스프레이 질량 분석계를 사용하여 LC/MS로 얻었다. UV 검출

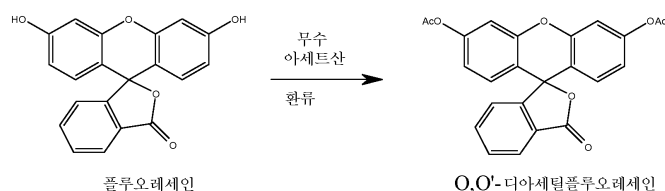
기 (280 nm) 및 서머스프레이 질량 분석계를 사용하여, 피크를 관찰하였다. 실험 조건: 기기 = Waters Model 600 MS HPLC 시스템 및 Waters Model 486 MS UV 검출기 (280 nm)와 결합된 Vestec Model 201B 서머스프레이 질량 분석계; 칼럼 = Waters Symmetry C-8, 5 μ , 3.9 x 150 mm; 이동상 = 25 분간에 걸쳐서 0% B에서 100% B로 프로그램된 선형 그래디언트; 이동상 A = 10:90 V:V 메탄올:물 중의 0.1 M 아세트산암모늄; 이동상 B = 메탄올 중의 0.1 M 아세트산암모늄; 유량 = 1.0 mL/min; 샘플 농도 = 닛트 (Neat); 및 주입량 = 20 μ L.

[0088] 도 15 내지 20에 관한 데이터는 HPLC와 결합된 질량 분석계를 사용하여 LC/MS로 얻었다. 질량 분석계를 대기압 화학 이온화 (APCI) 인터페이스와 함께 사용하고, 분광계를 양이온 검출 모드로 조작시켰다. 220 내지 500 nm의 전체 흡수도를 모니터링하는 자외선-가시광선 검출기 및 질량 분석계를 이용하여, 피크를 관찰하였다. Waters Symmetry C-8 칼럼 (3.9 x 150 mm)을 0.6 mL/min의 유량으로 사용하고, 30분간에 걸쳐서 0% 이동상 B에서 100% 이동상 B로 프로그램하였다. 이동상 B는 메탄올 중의 0.01 M 아세트산암모늄이고, 이동상 A는 10:90 메탄올:물 중의 0.01 M 아세트산암모늄이었다.

[0089] [실시예]

[0090] 실시예 1

[0091] 플루오레세인 디아세테이트의 생성

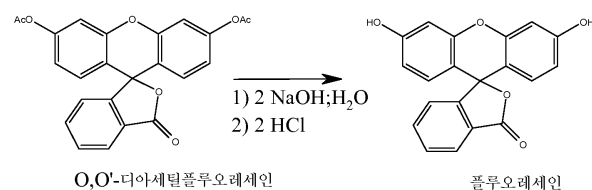


[0092]

[0093] 5 리터의 삼구 둥근 바닥 플라스크에 플루오레세인 (1000 g, 3.01 mol) 및 무수 아세트산 (1622 g, 15.9 mol)을 가하였다. 얻어진 혼합물을 환류하에 3 내지 5 시간 동안 교반하여, 얻어진 현탁액을 실온으로 냉각시켰다. 연속 교반하면서, 반응 혼합물을 추가로 -5 내지 3 $^{\circ}$ C로 냉각하여, 충분한 결정화를 행하였다. 결정화 물질을 부흐너 (Buchner) 필터에 수집하여, 냉각 무수 아세트산 (2 x 500 mL), 그 다음에 냉각 아세톤 (1 x 600 mL)으로 세정하였다. 물질을 부분적으로 건조시켜, 교반 및 미온하에 아세톤 (1000 mL)에 재현탁시켰다. 일단 냉각시킨 후에, 백색 결정성 물질을 필터에 수집하고, 냉각 아세톤 (2 x 700 mL)으로 세정하여, 공기 건조시켰다. 수율: ~75% 내지 85%; TLC를 통한 싱글 스팟; MP=203-205.5 $^{\circ}$ C; 및 순도 99.7%.

[0094] 실시예 2

[0095] 디아세틸 플루오레세인으로부터의 플루오레세인의 생성, 나트륨염의 생성 및 최종 불순물의 제거



[0096]

[0097] O,O'-디아세틸플루오레세인 (1000 g) 및 메탄올 (4000 mL)을 적절한 반응기에 주입하였다. 별도로, 탈이온수 (620 mL) 중의 수산화나트륨 용액 (480 g, 50% 가성)을 준비하였다. O,O'-디아세틸플루오레세인 및 메탄올을 포함하는 반응기에, 수산화나트륨 용액을 주입하였다. 혼합물을 가열, 환류시키고, 환류하에 90 분간 교반하였다. 반응 혼합물을 20 $^{\circ}$ C 내지 25 $^{\circ}$ C로 냉각시켰다. 혼합물을 여과 조제 (100 g)를 사용하여 여과한 다음에, 메탄올 (500 mL)로 세정하였다. 여액 (5000 mL)을 1400 mL 내지 1700 mL의 잔류량으로 진공하에 증류시킨 다음에, 반응 혼합물을 20 $^{\circ}$ C 내지 25 $^{\circ}$ C로 냉각시켰다. 탈이온수 (5000 mL)를 증류 농축물에 가하였다. 별도로, 탈이온수 (72 g) 중의 수산화나트륨 용액 (56 g, 50% 가성)을 준비하였다. 새로 준비된 수산화나트륨 용액 (100 mL)을 사용하여, 반응의 pH를 8.5 내지 8.7로 조절하였다. Norit SX Ultra (100 g), 여과 조제 (100 g) 및 탈이온수 (500 mL)를 실온에서 반응물에 주입하고, 이어서 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 배취를 여과하여, 추가의 Norit SX Ultra (100 g) 및 탈이온수 (500 mL)를 실온에서 여액에 주입한 다음에, 혼합물을 1 시간 동안 교반하였다. 배취를 여과하여, 탈이온수 (2000 mL)로 세정하였다. 메탄올 (10000 mL)을 여액에 주입하였다. 별도로, 탈이온수 (320 mL) 중에 염산 (32%, 820 g)을 용해시켜, 염산 용액을 제조하였다. 배

취의 온도를 20℃ 내지 25℃로 유지하면서, 희석된 산성 용액을 사용하여, 여액의 pH를 1.0 내지 2.5로 조절하였다. 배취를 20℃ 내지 25℃에서 1 시간 동안 교반한 다음에, 여과에 의해 분리하였다. 케이크를 (주사용 증류수:에탄올):(3:1) 용액 (2 x 1000 mL)으로 세정하였다. 생성물을 건조시켜, 전형적으로 매우 높은 품질을 갖는 플루오레세인을 80 내지 90%의 통상적인 수율을 얻었다.

[0098] 실시예 3

[0099] 플루오레세인 약제 원료 색 강도

[0100] 장치:

[0101] 1 cm 셀을 수용하고 660 nm 내지 570 nm를 스캔할 수 있는 분광광도계

[0102] 파장 660 nm 내지 570 nm에 적합한 물질, 예컨대 석영으로 된 분광광도계 셀 (1 cm 경로 길이)

[0103] 플루오레세인 약제 원료의 색 강도를 후술하는 바와 같이 측정하였다. 절차를 이용하여, 590 nm에서 흡광도를 측정함으로써, pH 9.4에서 수산화나트륨 및 중탄산나트륨 수용액 중에서 제조된 플루오레세인 원료 1.0% 용액의 색도를 측정하였다. 이 값은 "색수"로도 명명될 수도 있다. 590 nm에서의 흡수량 증가는 완성된 약제의 시각적인 색 강도 증가와 일치한다.

[0104] 플루오레세인 (250 mg ± 5 mg, 정확히 칭량함) 및 중탄산나트륨 (50 mg)을 25 mL 비이커로 칭량하였다. 수산화나트륨 (1%, 5 mL)을 가하였다. 용액을 교반하면서 서서히 가온시켰다. 모든 물질이 용해되어, 용액이 투명할 때까지 수산화나트륨 (1%, 1 mL 이하, 전체 6.0 mL)을 가하였다. 반응물을 실온으로 냉각하였다. 필요하다면, 1% 수산화나트륨을 적하하여, pH를 9.4로 조절하였다. pH가 9.4를 초과하는 경우에는, 용액을 폐기하고, 수산화나트륨을 덜 사용하여 다시 준비하였다. 용액을 정량적으로 용량 플라스크 (25 mL)에 옮겨, 25.0 mL가 될 때까지 정제수를 적량 가하였다. 최종 농도는 10 mg/mL 또는 1%이었다.

[0105] 방법:

[0106] 100 nm/min의 속도로 660 nm 내지 570 nm에서 스캔되는 샘플 및 기준 셀 큐벳의 블랭크 유저 베이스라인을 정제수로 설정함으로써 분광광도계를 제로로 맞추었다. 플루오레세인 용액 (1%)을 샘플 큐벳에 가하였다. 샘플 용액을 100 nm/min의 속도로 660 nm 내지 570 nm에서 스캔하였다. 흡광도 리딩을 590 nm에서 기록하였다. 분리된 샘플 일정분량에 대하여 반복 측정을 행하였다. 표 1은 이러한 방법을 이용한 여러가지의 플루오레세인 원료 샘플 테스트에 대한 전형적인 색수 결과를 나타낸다. 그 결과는 하기 색선에 나타난 방정식을 이용하여 보정하였다. 도 3는 플루오레세인 원료 샘플에서 얻어진 전형적인 스펙트럼을 나타낸다.

[0107] 계산:

[0108] 흡광도 리딩을 다음과 같이 샘플 농도에 대하여 보정하였다:

[0109]
$$\text{흡광도보정} = \text{흡광도} \times \frac{(\text{표본 중량})}{(\text{실 중량})}$$

[0110] 샘플 플루오레세인 로트에 대한 색 강도 측정값을 실시예 2에 기재된 바와 같이 얻어, 하기 표 8에 나타낸다.

[0111] 표 8:

1% 플루오레세인 용액에 대한 색 수	
샘플	색 수
1	0.028 A.U.
2	0.032 A.U.
3	0.018 A.U.
4	0.025 A.U.

[0112] 실시예 4:

[0113] 전위차 적정을 이용한 플루오레세인 잔류 염화물 측정

- [0115] 장치:
- [0116] 브링크만 (Brinkman) 716 DMS 티트리노 (Titrino) 자동 적정 장치 또는 동등물
- [0117] 브링크만 730 샘플 체인저 (Changer) 및 759 스윙 헤드 오토샘플러 (Swing Head Autosampler) 또는 동등물
- [0118] Ag Titrode 전극
- [0119] 5-플레이스 분석용 저울 또는 동등물
- [0120] 소니케이터
- [0121] 핫 플레이트
- [0122] 3,000 rpm가능한 원심분리기
- [0123] 배양관, 16 x 125 mm, VWR Cat # 47729-578 또는 동등물
- [0124] 16 mm 배양관, VWR Cat # 60828-760용 화이트 캡 또는 동등물
- [0125] 혈청 필터, 6 x 16 mm, VWR Cat # 28295-556 또는 동등물
- [0126] 하기 방법을 이용하여, 전위차 질산은 적정, 자동 적정 장치 및 은 전극을 사용하여 플루오레세인의 잔류 염화물의 양을 정량하였다.
- [0127] (1) 시약 용액 제조, 수산화암모늄 (5 N)
- [0128] 정제수 (~600 mL)에, 진한 수산화암모늄 (~338 mL)을 가해, 정제수로 1000 mL로 희석하였다. 은 전극을 린스하여 보관하기 위해 자동 적정 장치에 이 용액을 사용하였다.
- [0129] (2) 표준 용액 제조, 질산은 0.10 N 수용액
- [0130] 분석증명서가 부착된 용액으로서 시판용으로 제조된 0.10 N 질산은을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 시판용으로 인증된 질산은 용액을 이용할 수 없는 경우, 질산은 (17.0 g)을 칭량하여 정제수 (1000 mL)에 용해시켜 표준화하였다. 염화칼륨 표준물질 (무수, 50 mg)을 칭량하여, 적정 컵에서 정제수 (~30 mL)에 용해시켰다. 질산 (1 mL)을 이 용액에 가하였다. 은 빌렛 전극을 사용하여, 용액을 전위차 적정을 하였다. 0.10 N 질산은 각 mL는 염화칼륨 7.455 mg에 상당하였다. 질산은의 노르말 농도를 하기 방정식을 이용하여 계산하였다: $N_{AgNO_3} = (mg\ KCl \times \text{순도 } KCl) / (mL\ AgNO_3 \times 74.55)$.
- [0131] (3) 샘플 제조 및 적정
- [0132] 플루오레세인 원료 (2 g)를 배양관 (16 x 125 mm)에 칭량하였다. 정제수 (고온, 10 mL)를 가하였다. 질산 (1 mL)을 가해, 모든 튜브를 캡핑하고, 2분간 진탕시켜, 15 분간 초음파 처리하였다. 모든 튜브를 30 분간 원심분리하였다 (~3,000 rpm). 혈청 필터를 사용하여, 침전제를 상청액과 분리하였다. 용액을 적정 컵에 디캔테이션하였다. 혈청을 정제수 (5 mL 부분)로 린스하여 여과시켰다. 린스를 적정 컵에 부었다. 혈청 필터를 제거하여 폐기하였다. 모든 튜브를 캡핑하여, 1 분간 진탕시키고, 모든 튜브를 20 분간 원심분리하는 (~3,000 rpm) 것을 제외하고는, 상기 절차를 2회 반복하였다. 제 1 및 제 2 추출물의 용액을 합하고, 혈청 필터를 정제수로 린스하였다. 합한 용액을 이의 전위차 종말점으로 0.10 N $AgNO_3$ 로 적정하였다. 적정 파라미터는 각 샘플 후에 워시 사이클 (5 N 수산화암모늄) 및 린스 사이클 (5 N 수산화암모늄)을 사용하는 것을 포함한다. 파라미터의 리스트는 하기에 나타낸다.
- [0133] (4) 계산
- $$\% \text{ 염화물} = \frac{(V) \times (N) \times 35.453 \times 100}{W}$$
- [0134] V = 적정된 0.10 N $AgNO_3$ 의 체적
 N = $AgNO_3$ 적정제의 노르말 농도
 35.453 = 염화물의 분자량
 W = 취해진 플루오레세인 샘플의 중량

잔류 염화물	
샘플	잔류 염화물
1	0.023%
2	0.018%
3	<0.01%
4	<0.01%

[0135]

[0136]

실시예 5:

[0137]

이 절차에 있어서, 플루오레세인 원료 용액을 메탄올에서 제조하여, 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템, 그라디언트 이동상 프로그래밍, 및 C-18 칼럼을 사용하여, 이의 관련 물질과 분리하였다. 관련 물질을 플루오레세인 표준물질 1% 용액에 대하여 정량화하였다. 자외선 HPLC 검출기를 사용하여, 280 nm의 파장에서 피크 응답을 측정하였다. 이동상 A는 0.01 M 아세트산암모늄, 10% 메탄올 / 90% 물, 및 0.5% 아세트산이었다. 이동상 B는 0.01 M 아세트산암모늄, 100% 메탄올, 및 0.5% 아세트산이었다. 표준물질은 메탄올 중의 0.005 mg/mL의 최종 농도로 희석된 메탄올 중의 플루오레세인 0.5 mg/mL 용액, 또는 유사하게 제조된 플루오레세인 0.5 mg/mL의 샘플 최종 이론 농도 1%이었다. 그라디언트 연산을 프로그램할 수 있는 고속 액체 크로마토그래피 시스템을 HPLC 자외선/가시광선 검출기 및 280 nm를 모니터링하는 능력과 함께 사용하였다. 칼럼: 플루오레세인에 대하여 적어도 20,000개의 플레이트/칼럼을 수용할 수 있는 3.9 X 150 mm Waters Symmetry C-18 칼럼, 5 μm (또는 동등물). 유량: 0.6 mL/min. 그라디언트 프로그램은 다음과 같았다:

시간 (분)	% 이동상 A	% 이동상 B
0	80%	20%
60	20%	80%
칼럼 워시:		
61	0%	100%
66	0%	100%
평형:		
67	80%	20%

[0138]

[0139]

피크 면적을 이용하여, 하기 계산 섹션에 나타난 바와 같이, 0.025% 이상의 기지 및 미지의 불순물의 %농도를 계산하였다. 이 방법에 대한 정량 한계값이 0.025%이지만, 불순물은 통상 $\geq 0.05\%$ 의 농도로 기록된다. 플루오레세인의 분석에서 9개의 불순물을 발견하여, 이들의 분자량을 LC/MS로 측정하였다. 이들의 제안된 구조를 도 8에 나타낸다. 불순물 H는 2개의 디아스테레오머, H-1 및 H-2로서 밝혀졌다. 크로마토그래프법을 이용하여 이러한 절차에 인용된 플루오레세인 로트에서 확인된 불순물에 관한 전형적인 상대 체류 시간 (RRT), 용량 인자 (k'), 및 용리 시의 그라디언트 조성 (%B)은 다음과 같다:

	RRT	k'	B(%)
불순물 A	0.75	11.1	43.0
불순물 D	1.19	18.2	56.5
불순물 F	1.23	18.8	57.7
불순물 H-1	1.68	26.0	71.0
불순물 H-2	1.71	26.5	72.0

[0140]

[0141]

플루오레세인 크로마토그램의 피크는 상대 체류 시간, 용량 인자 및 피크의 대략적인 이동상 조성이 상기에 리스트된 관련 물질과 일치하는 경우에는, 관련 물질 A, D, F, H-1 또는 H-2로서 확인될 수 있다. 그러나, 각각의 상대 체류 시간값은 크로마토그래프 시스템 간에 약 0.02로 변화할 수 있다. 크로마토그래프 시스템의 변형도 상술한 값에 큰 영향을 줄 있다. 불순물 B, C, E 및 G가 본 명세서에서 분석된 4개의 플루오레세인 로트에서 확인되지 않았지만, 제조업자 A 플루오레세인의 종래의 LC/MS 분석에 따르면, 불순물 B, C, E 및 G가 1.09, 1.11, 1.20, 및 1.44의 근사한 RRT를 갖는다는 것을 제시하고 있다. 각각 RRT가 1.10 및 1.74인 미지의 불순물은 본 서류에 기록된 플루오레세인 원료의 4개의 로트에 존재하였다. 이들의 농도는 0.025% 내지 0.05%이었

다. RRT = 1.10에서의 미지의 피크가 불순물 B 또는 C일 수 있다. 플루오레세인 원료 샘플의 크로마토그램은 도 6에 나타난다. 디아세틸플루오레세인은 플루오레세인 약제 원료에서 관찰되었으며, 플루오레세인에 대한 체류 시간이 1.35로 나타난다.

[0142] 레소르시놀은 플루오레세인의 공지된 통상적인 불순물이다. 레소르시놀은 플루오레세인 합성 시의 출발물질로서 사용되며, 잠재적인 분해 생성물이다. 레소르시놀은 상술한 바와 같이, 0.14의 RRT, 2.9의 k', 및 24.6의 %B에서 용리되는 것으로 밝혀졌다. 레소르시놀은 종종 미분해 이중선으로서 용리되는 것으로 관찰될 수 있다. 레소르시놀을 함유하는 플루오레세인 약제 원료의 크로마토그램은 도 7에 나타난다.

[0143] 레소르시놀 이외에, 비관련 피크 (즉, 용매 프런트, 시스템 피크)를 확인하였으며, 하기 계산에서 생략하였다. 레소르시놀을 약 0.14의 RRT에서 용리하였다 (도 7 참조). 각 관련 물질에 대한 %농도를 하기에 나타난 바와 같이 계산하였다.

$$\% \text{ 관련 물질} = \frac{\text{관련 물질 면적}}{\text{표준 물질 면적}} \times \frac{\text{표준 물질 농도}}{\text{샘플 농도}} \times 100$$

[0144] $\% \text{ 전체 관련 물질} = \sum (\text{개별 불순물} \geq 0.025\%)$

[0145] 0.025% 이상의 농도를 갖는 불순물을 합계하여, 전체 불순물을 계산한다.

[0146] 하기 식에 따라, 상대 체류 시간을 계산한다:

$$RRT = \frac{t_i}{t_f}$$

t_i = 불순물 피크의 체류시간

t_f = 플루오레세인 피크의 체류시간

[0147] [0148] 상기 방법에 대한 정량 한계값을 플루오레세인 0.127 $\mu\text{g/mL}$ 으로 규정하였다 (샘플 제제 농도 0.025%). 검출 한계값을 플루오레세인 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 으로 측정하였다 (샘플 제제 농도 0.01%).

[0149] 제조업자 A 플루오레세인 원료의 4개의 로트를 이 방법을 사용하여 분석하였다. 7개의 불순물을 검출하여, 5개의 불순물 (A, D, F, H-1 및 H-2)을 확인하였다. 기록가능한 불순물의 전체 퍼센트 ($\geq 0.025\%$)는 0.2% 내지 0.7%의 범위이었다. 그 결과를 하기 표 10에 나타난다.

[0150] 이러한 절차의 대체수단에 있어서, 샘플 및 표준 제제의 희석제를 변경하여, 레소르시놀 및 다른 관련 물질 불순물을 동시에 분석할 수 있다. 희석제를 제조하기 위해, 처음에 1000 mL에 아세트산암모늄 0.77 g을 용해시키고, 아세트산으로 pH를 3.9로 조절한 다음에, 동일 체적의 아세트산암모늄 완충액 및 메탄올을 가한다. 초기에 50 mg/15 mL의 비율로 메탄올에 플루오레세인을 용해시킨 후에, 실시예 5에 기재된 절차에서와 같이 표준물질 및 샘플을 희석시키도록 이 희석제를 메탄올 대신에 사용한다. 희석제로 희석한 후에, 플루오레세인 표준물질 및 샘플 제제를 빛으로부터 보호한다. 레소르시놀 및 프탈산에 대한 전형적인 상대 체류 시간 (RRT)은 다음과 같다:

	RRT	k'	B(%)
레소르시놀	0.13	1.21	24.2%
프탈산	0.16	1.53	24.9%

[0151]

[0152] RRF (상대 응답 인자)도 불순물의 계산에 부가될 수 있으며, RRF는 플루오레세인에 대한 응답을 나타낸다.

불순물	RRF ¹
레스르시놀	1.7
프탈산	2.6
불순물 A	0.43
불순물 D	1.0
불순물 F	1.0
불순물 H-1	1.0
불순물 H-2	1.0

¹ 불순물 D, F, H-1 및 H-2에 대한 상대 응답 인자는 측정되지 않았다. 이들의 상대 응답 인자는 1.0으로 가정한다.

[0153]

[0154] 각 관련 물질에 대한 %농도는 하기에 나타낸 바와 같이 계산될 수 있다:

$$\% \text{ 관련 물질} = \frac{\text{관련 물질 면적}}{\text{표준 물질 면적}} \times \frac{\text{표준 물질 농도}}{\text{샘플 농도}} \times \text{RRF} \times 100$$

[0155]

[0156] 표 10:

[0157] 제조업자 A 플루오레세인 원료에 대한 HPLC 분석 결과

로트 참조	불순물 A (%)	RRT 1.10* (%) 에서의 미지 물질	불순물 D (%)	불순물 F (%)	불순물 H-1 (%)	불순물 H-2 (%)	RRT 1.74에서의 미지 물질 (%)	전체 불순물 (%)
A	0.1	0.03	0.05	0.2	0.1	0.1	0.03	0.7
B	0.03	< 0.025	0.03	0.05	0.05	0.06	< 0.025	0.2
C	0.05	< 0.025	0.04	0.1	0.1	0.1	0.04	0.5
D	0.04	< 0.025	0.04	0.07	0.09	0.1	0.03	0.4

* RRT 1.10에서의 피크는 불순물 B 또는 C 일 것이다.

방법의 정량 한계값은 0.025%이다.

방법의 검출 한계값은 0.01%이다.

[0158]

[0159] 실시예 6:

[0160] 플루오레세인-관련 물질 불순물의 동일성을 측정하기 위해 조사를 행하였다. 플루오레세인 샘플을 불순물의 존재 및 농도에 관하여 분석하였다. 확인 분석을 고속 액체 크로마토그래피/질량 분석 (LC/MS)으로 행하였다.

[0161] LC/MS 시스템의 대표적인 HPLC 크로마토그램은 도 9에 재현된다. 플루오레세인은 크로마토그램에서 주요 피크를 산출하였다. 도 10(b)에 나타난 플루오레세인의 서머스프레이 질량 스펙트럼은 분자량 332와 일치하는 m/z 333에서 M+H 분자 이온을 산출하였다.

[0162] 도 11(b)에 도시된 불순물 A의 서머스프레이 질량 스펙트럼은 m/z 259에서 M+H 분자 이온을 산출하는데, 분자량 258을 나타낸다. 불순물 A, [2-(2',4'-디하이드록시벤조일)벤조산]에 관한 도 8에 제안된 구조는 이전에 플루오레세인 제제 중의 불순물로서 보고되어 있다.

[0163] 도 12(b)에 도시된 불순물 B의 서머스프레이 질량 스펙트럼은 m/z 285에서 M+H 분자 이온을 나타내는데, 분자량 284를 나타낸다. 분자량 284는 원소식 C₁₅H₈O₆, C₁₆H₁₂O₅, 또는 C₁₇H₁₈O₄와 일치할 수 있다. 도 8에서 불순물 B에 나타난 제안된 구조는 레소르시놀과 숙신산 (플루오레세인에 대한 프탈산 전구물질 중의 불순물로서)의 반응으로 형성될 수 있다.

[0164] 도 13(b)에 도시된 불순물 C의 서머스프레이 질량 스펙트럼은 m/z 347에서 M+H 분자 이온을 나타낸다. 이는 분자량 346을 나타내며, 플루오레세인에 대한 14개의 질량 단위의 계인에 상당한다.

[0165] 도 14(b)에 도시된 불순물 D의 서머스프레이 질량 스펙트럼도 m/z 347에서 M+H 분자 이온을 산출하며, 이는 불

순물 C의 이성질체일 것이다. 불순물 C 및 D에 제안된 구조는 서로 토토머이고, 플루오레세인의 퀴닌형 산화 생성물이다.

[0166] 도 15(b)에 도시된 불순물 E의 APCI는 m/z 333 M+H에서 M+H 분자 이온을 산출하며, 분자량 332 및 UV_{max} 492의 UV 스펙트럼을 나타낸다. 따라서, 불순물 E가 플루오레세인의 위치 이성질체일 수 있음을 나타낸다.

[0167] 도 16(b)에 도시된 불순물 F의 APCI는 m/z 425에서 M+H 분자 이온을 산출하며, 분자량 424 및 UV_{max} 400 nm 이상을 나타낸다. 스펙트럼은 모 화합물에 가해진 추가의 레소르시놀 분자와 일치하는 것으로 나타낸다. 따라서, 화합물 F는 3개의 레소르시놀로 형성될 수 있는 반면에, 모 화합물은 2개의 레소르시놀로 형성될 수 있다.

[0168] 도 17(b)에 도시된 불순물 G의 APCI는 m/z 375에서 M+H 분자 이온을 산출하며, 분자량 374 및 UV_{max} 484 nm를 나타낸다. 스펙트럼 및 친유성은 플루오레세인의 아세테이트 에스테르와 일치하는 것으로 나타났다.

[0169] 도 18(a) 및 19(a)에 도시된 불순물 H-1 및 H-2의 APCI는 두 화합물에 대하여 m/z 739에서 M+H 분자 이온을 산출하는데, 이는 각각에 대하여 분자량 738을 나타낸다. 두 화합물의 자외선/가시광선 흡광도 스펙트럼은 UV_{max} 233 nm로 동일하며, 462 및 488 nm에서 약한 흡광도 최대값을 나타내었다. 불순물 H-2의 흡광도 스펙트럼은 도 20에 나타낸다.

[0170] 실시예 7:

[0171] 주사용 플루오레세인, 또는 플루오레사이트 (Fluorescite) 25%

[0172] 배합 탱크의 필요한 주사용 증류수 60% 중에 필요량의 수산화나트륨을 용해시켜, 칭량하였다. 플루오레세인을 가해 용해시켰다. 필요에 따라, 추가의 주사용 증류수를 가해 용해시키나, 전체 체적의 90%를 초과하지 않게 하였다. 플루오레세인이 30 분간 교반한 후에 완전히 용해되지 않으면, pH를 조절하기 위해 다음 단계로 진행하였다. 수산화나트륨 3 N 및/또 염산 1 N를 사용하여, pH를 9.4로 조절하였다. 혼합물을 180 R.P.M.으로 30 분간 교반하였다. pH를 다시 체크하였다. 9.3 미만이거나 9.5를 초과하는 경우에는, 수산화나트륨 3 N 및/또 염산 1 N로 pH를 9.4로 다시 조절하였다. 추가의 주사용 증류수로 나트륨 플루오레세인 용액 체적을 증가시켜, 15 분간 교반하였다. pH를 상술한 바와 같이 다시 체크하였다. 질소 탱크를 사용하여, 세공 크기가 5 마이크론, 0.8 마이크론, 및 0.45 마이크론인 일련의 3개의 막 필터를 통해 멸균 충전 탱크로 가압 여과시켰다. 생성물의 pH를 상술한 절차를 이용하여 다시 체크하였다. 샘플을 실험실 시험을 위해 무균으로 회수하였다. 생성물을 미리 멸균된 앰플에 충전하였다. 각 앰플에 2.15 내지 2.25 mL를 가하였다. 충전 직후에, 샘플을 표준방법에 의해 팁 시일링 (tip-seal)하거나 풀 시일링 (pull-seal)하였다. 멸균 시에 각 앰플 시일을 시험하였다. 앰플을 배취 사이즈에 따라 121°C에서 20 분 이상 오토클레이브하여 멸균하였다. 누출을 위해 주의깊게 검사하였다. 각 앰플을 최적 점등 조건하에 입자상 물질에 대하여 개별적으로 검사하였다.

[0173] 실시예 8:

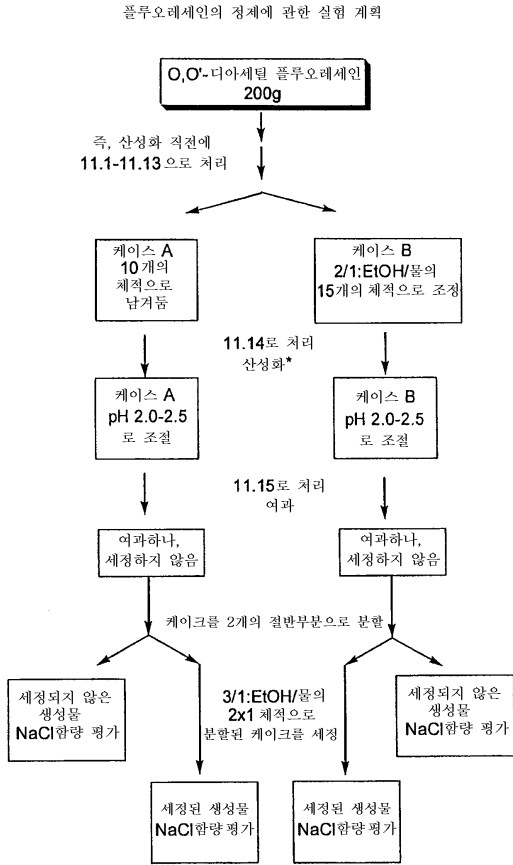
[0174] 주사용 플루오레세인, 또는 플루오레사이트 10%

[0175] 주사용 플루오레세인을 제조하기 위한 다른 절차로서, 적절한 스텐레스강 탱크에 냉각 주사용 증류수 (약 30 °C)의 배취량의 약 70% 내지 75%를 가하였다. 현탁액이 완성될 때까지 플루오레세인을 혼합하면서 가하였다. 초기 pH를 기록하였다. 충분한 양 (전체 체적의 약 7.5%)의 7 N 수산화나트륨을 가한 다음에, pH가 타겟 pH 9.4를 갖는 9.3 내지 9.5가 될 때까지, 첨가 사이에 약 15 분간을 대기한 후에 pH값을 다시 체크하면서 추가량의 7 N 수산화나트륨을 가하였다. pH가 9.5를 초과하는 경우에는, 9.3 내지 9.5의 pH 범위를 얻도록 1 N 염산을 가해 pH를 조절하였다. pH 범위가 도달된 후에, 15 분 이상 계속 혼합하였다. 배취를 주사용 증류수로 최종 증량이 되게 한 후에, 30 분 이상 혼합하였다. pH를 테스트하여, 필요에 따라 수산화나트륨 또는 염산으로 조절하였다. 추가로 표준 조작 절차에 따라 검사 및 시험과 함께, 생성물을 멸균으로 충전하였다.

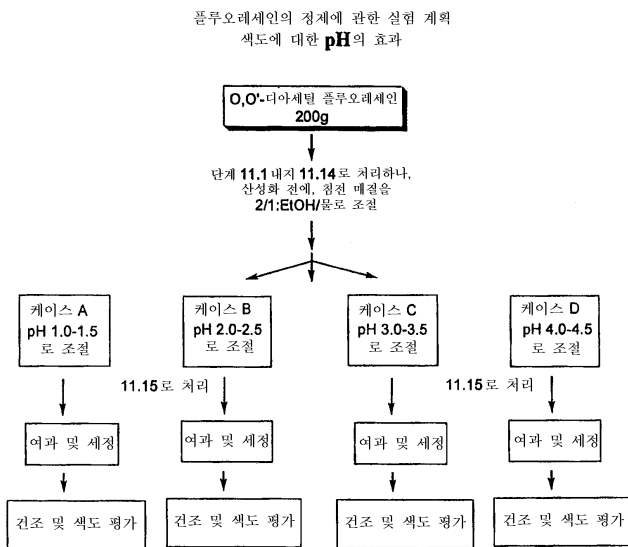
[0176] 본 명세서에 강조된 특정 실시예는 본 발명의 모든 실시형태의 카탈로그인 것으로 의도되지 않는다. 또한, 당업자는 단지 루틴한 실험을 이용하여, 다수의 본 발명의 실시형태의 동등물을 인지하거나 확인할 수 있다. 이러한 동등물은 하기 청구의 범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

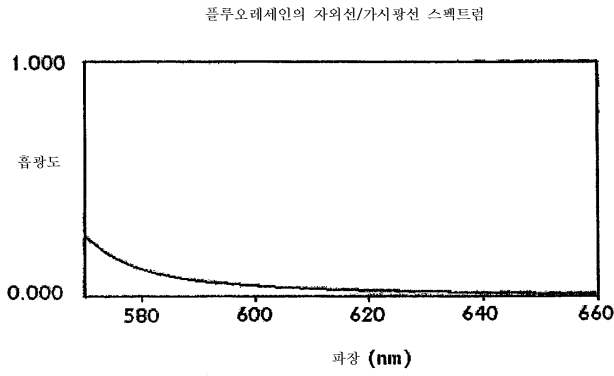
도면1



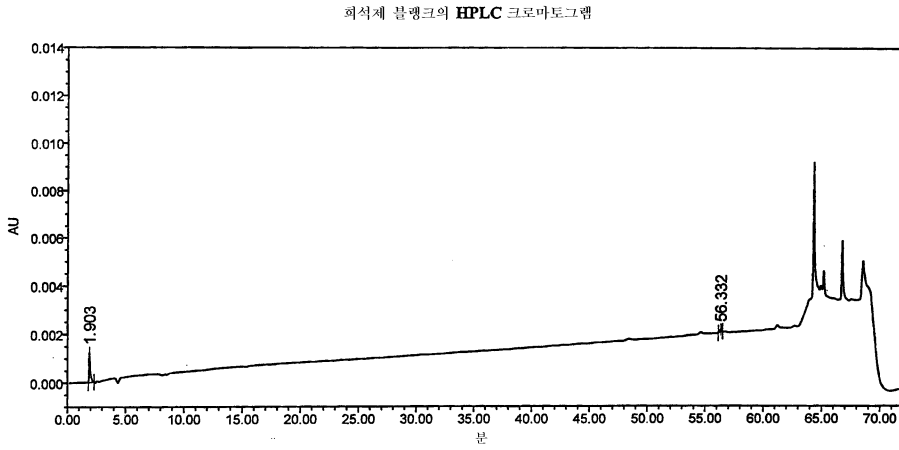
도면2



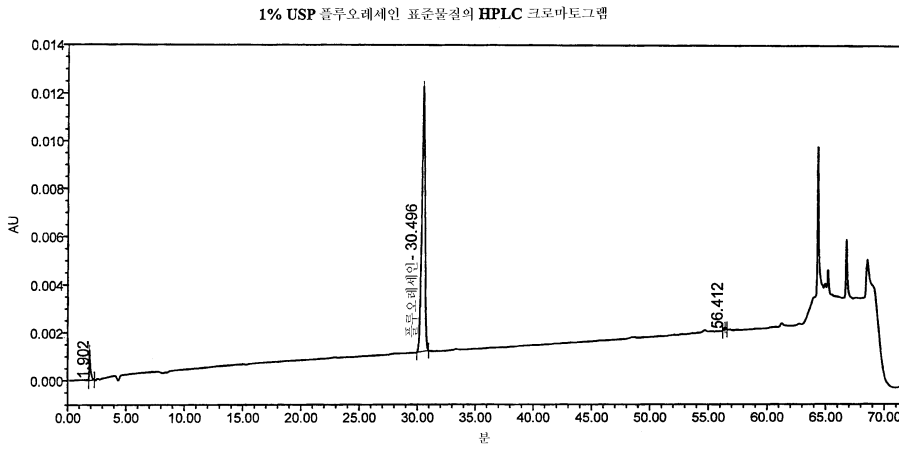
도면3



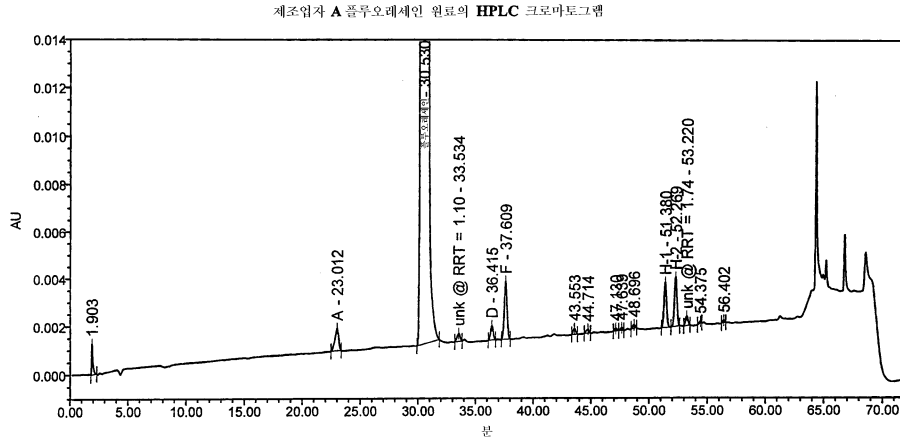
도면4



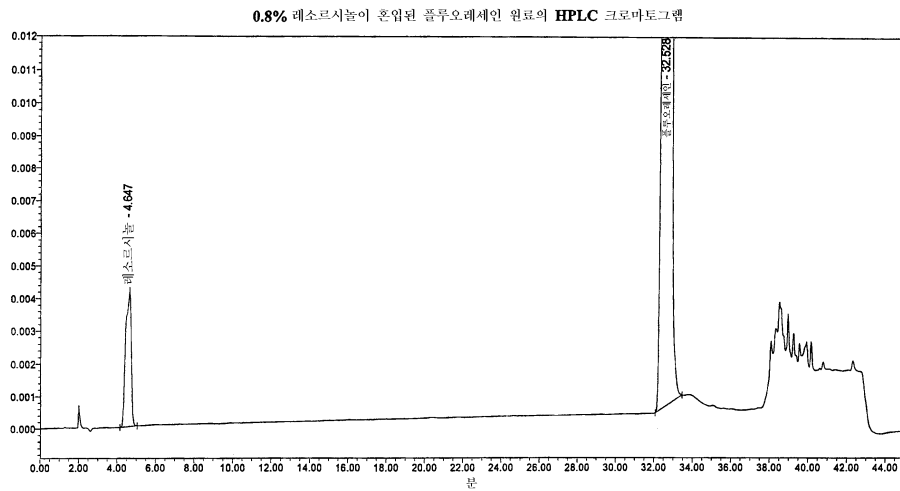
도면5



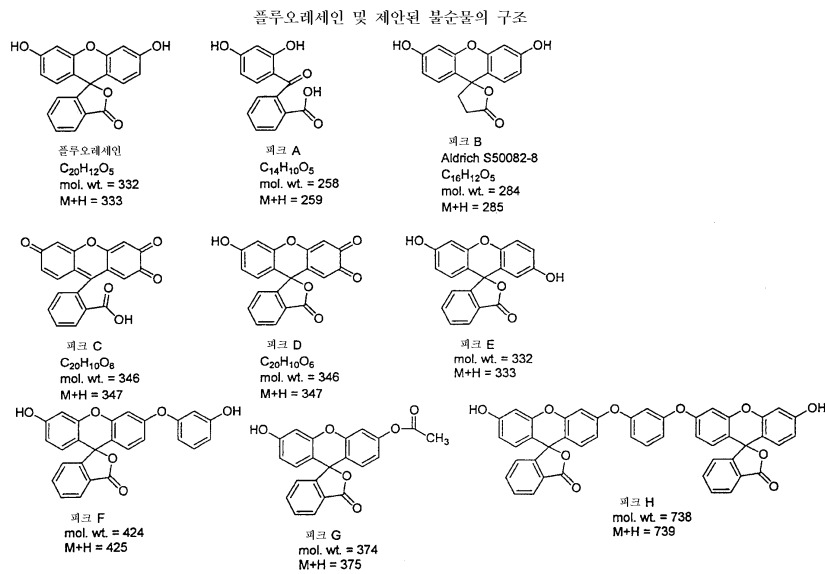
도면6



도면7

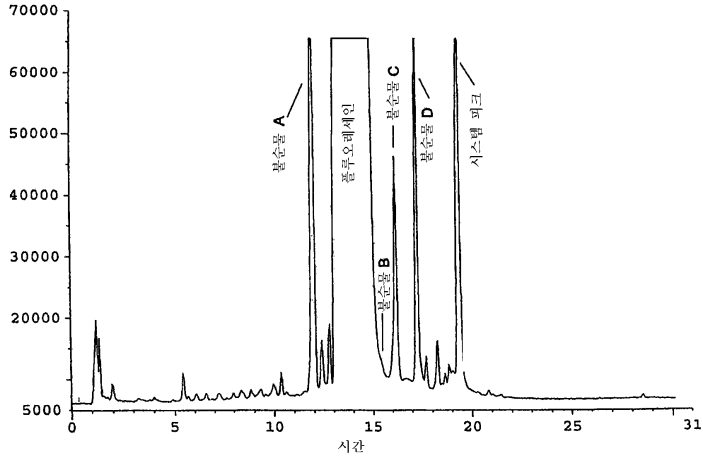


도면8



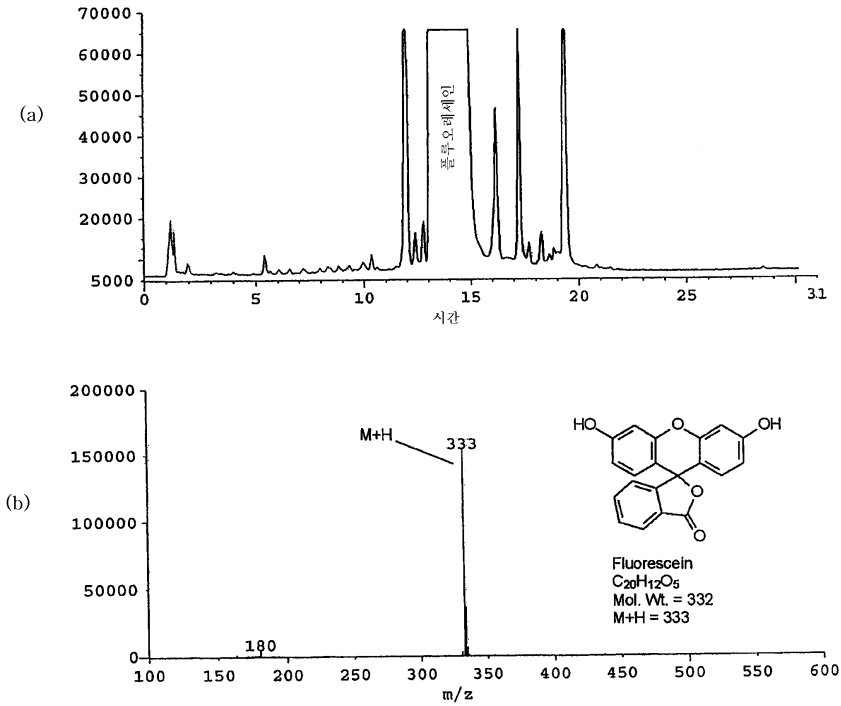
도면9

LC/MS 시스템의 플루오레세인의 HPLC 크로마토그램



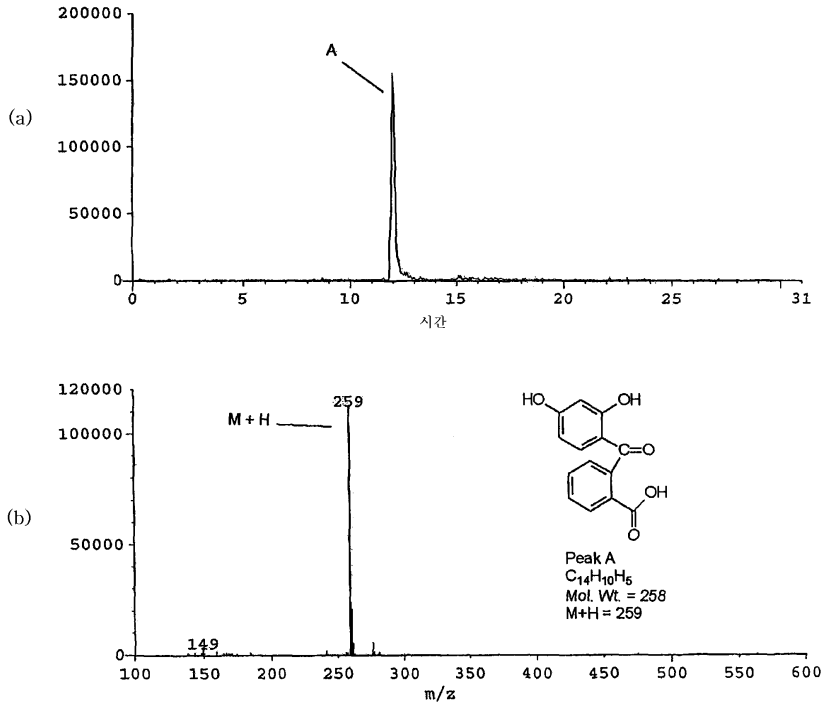
도면10

플루오레세인의 HPLC/MS



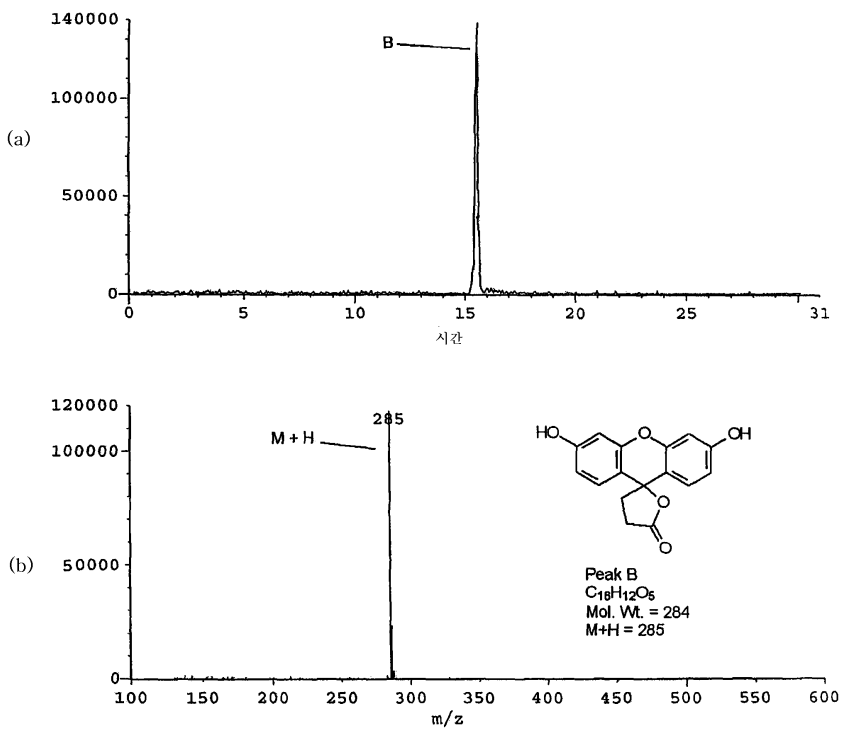
도면11

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 A의 HPLC/MS



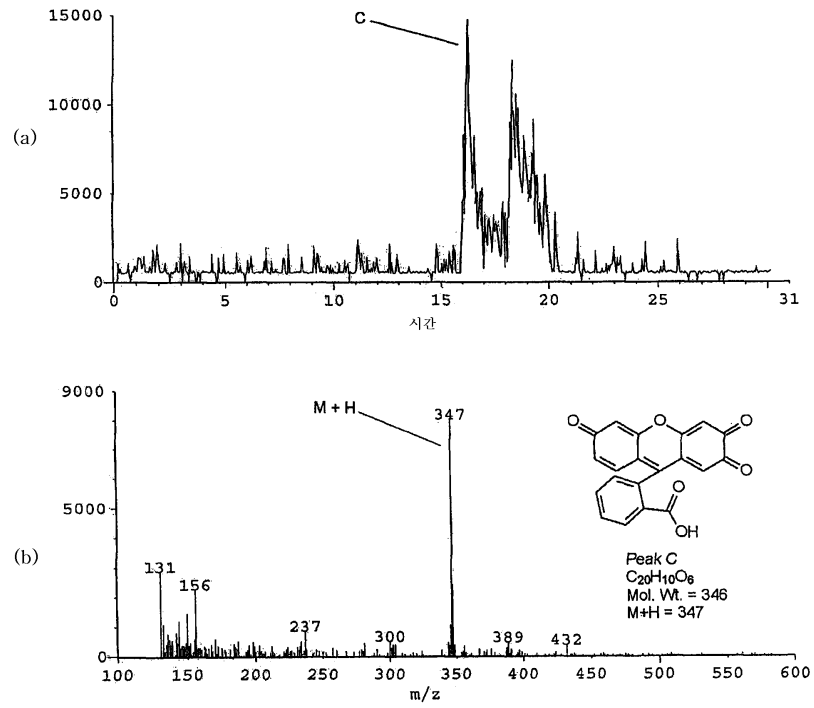
도면12

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 B의 HPLC/MS



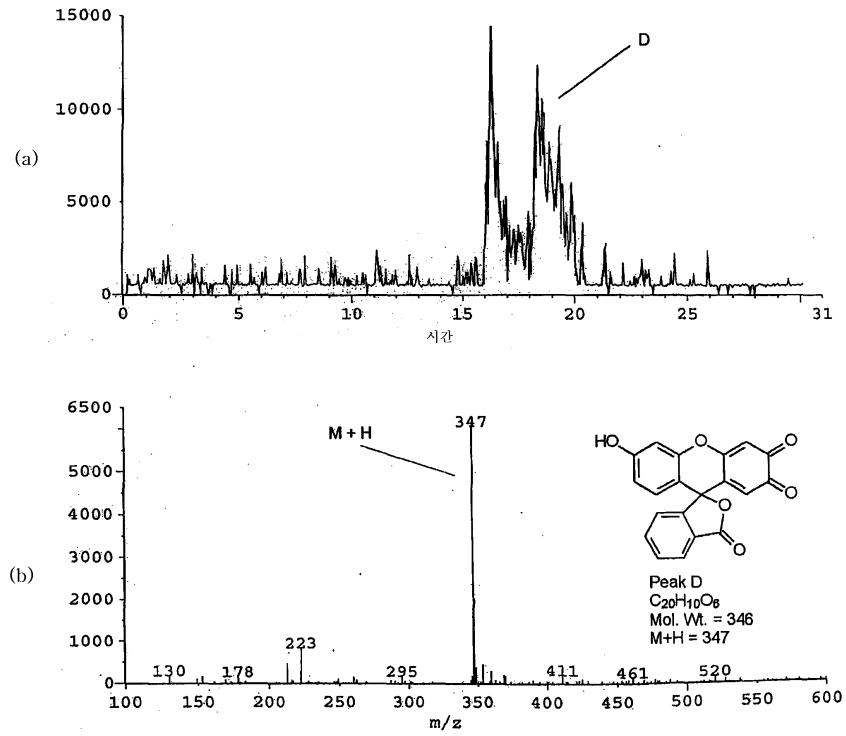
도면13

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 C의 HPLC/MS



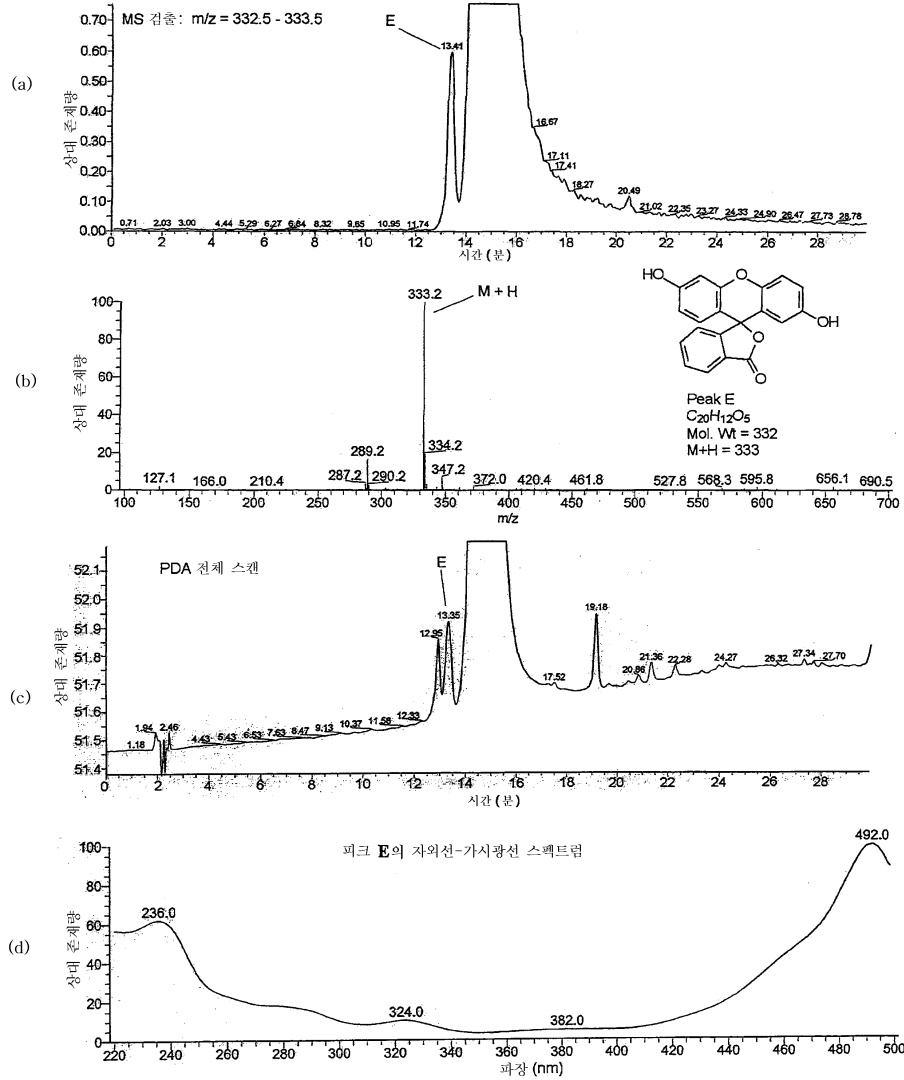
도면14

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 D의 HPLC/MS



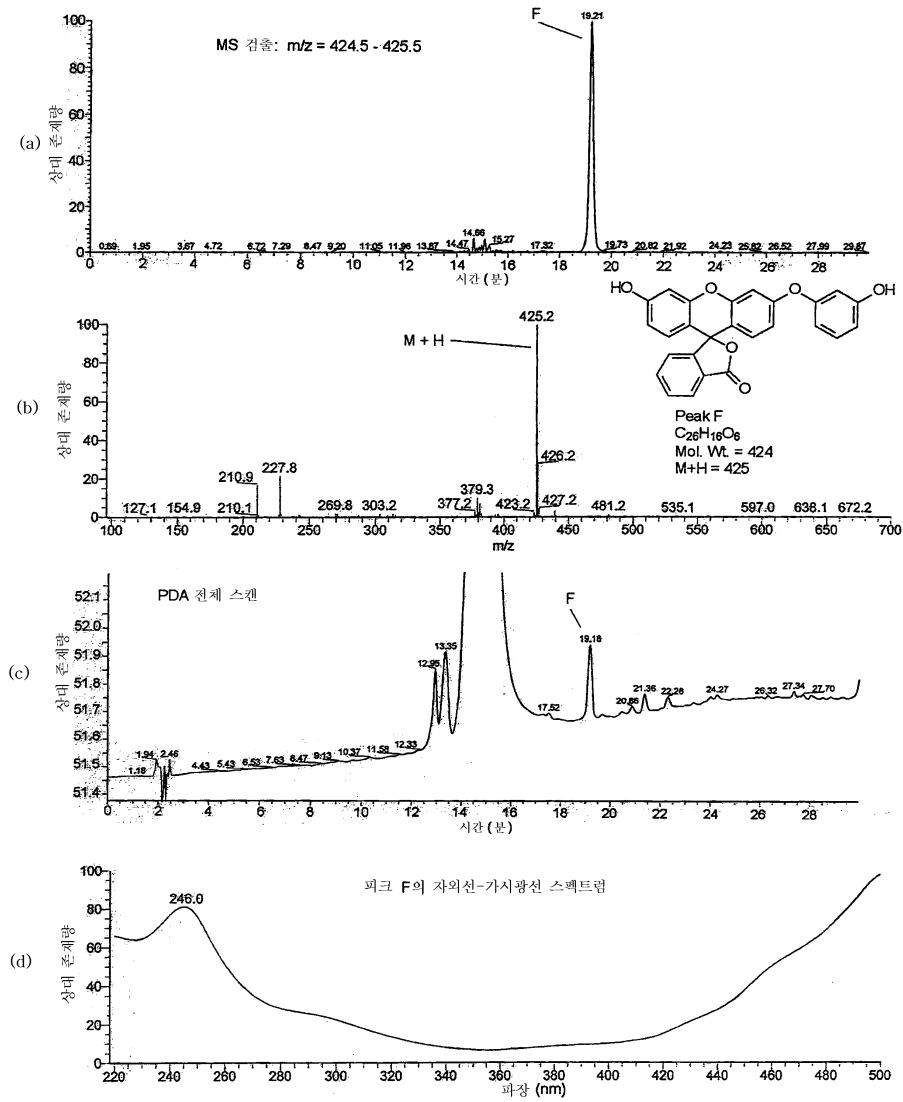
도면15

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 E의 HPLC/MS



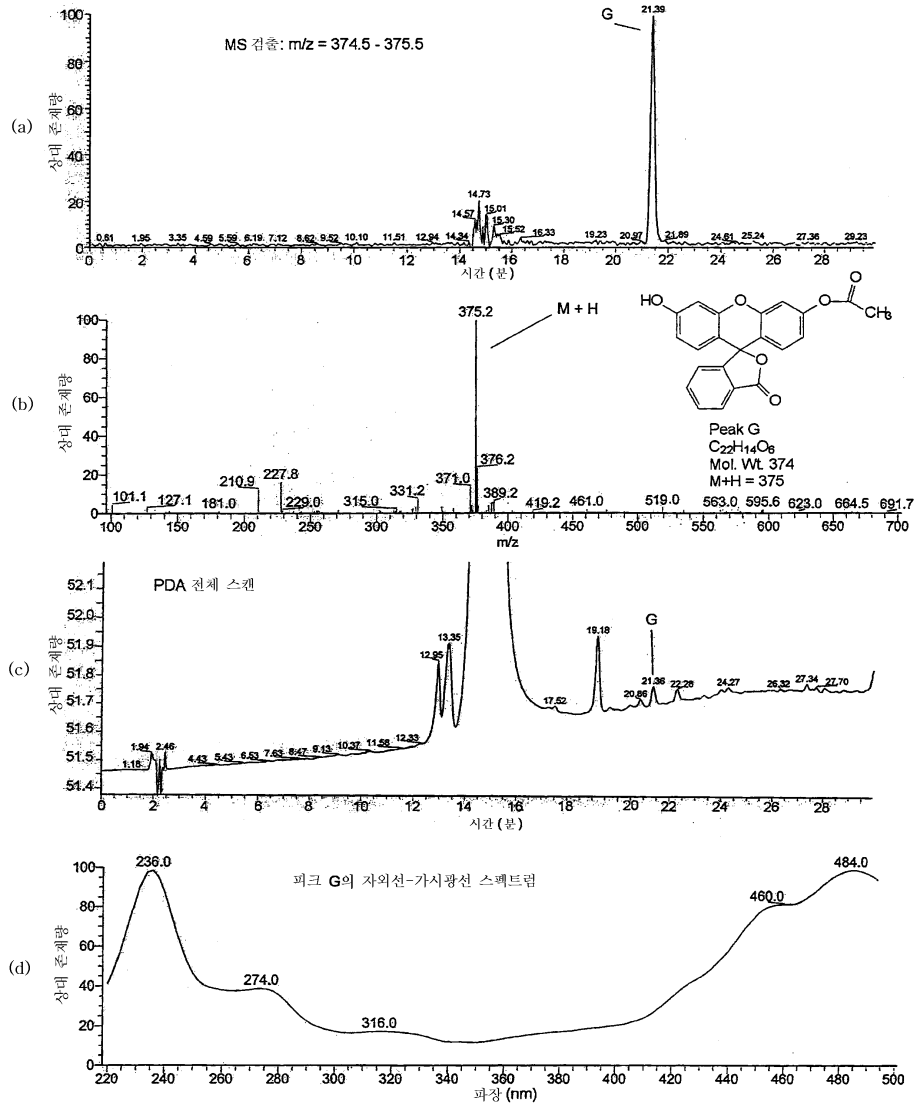
도면16

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 F의 HPLC/MS



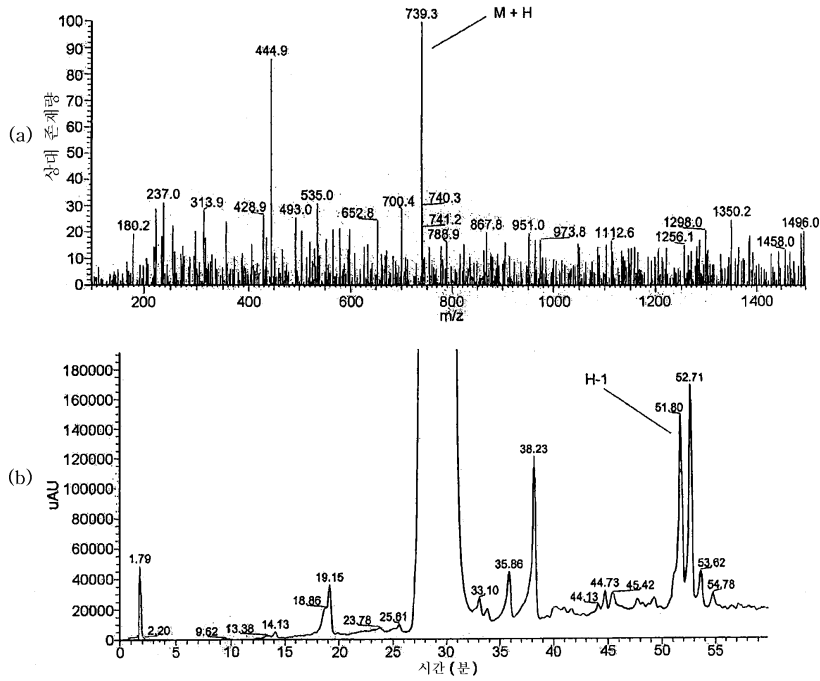
도면17

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 G의 HPLC/MS



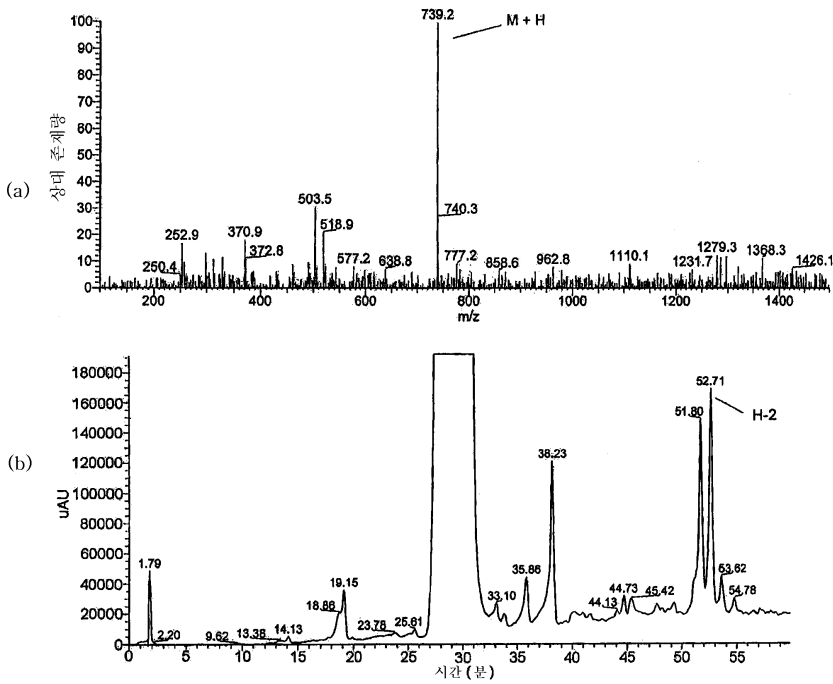
도면18

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 H-1의 HPLC/MS



도면19

플루오레세인 약제 원료 중의 불순물 H-2의 HPLC/MS



도면20

불순물 H-2의 자외선-가시광선 흡광도 스캔

