

4',7-二乙基射干苷元合成产物中杂质的分离纯化及鉴定^Δ

袁崇均*,陈 维,陈 帅,罗 森,罗 恒,王 笏(四川省中医药科学院中药药学研究所,成都 610041)

中图分类号 R284.2;Q946.91 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)23-3208-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.23.09

摘要 目的:分离纯化并鉴定4',7-二乙基射干苷元合成产物中的杂质,为其质量控制提供依据。方法:采用液相色谱-串联质谱法分析4',7-二乙基射干苷元合成产物中的杂质,然后根据各杂质离子峰的质荷比[M+H]⁺推定其可能结构;采用硅胶柱层析,以氯仿-甲醇(梯度洗脱,20:1,10:1,8:1,6:1,5:1,3:1,2:1,1:1,0:1, V/V)分离纯化部分杂质,并采用紫外、红外、核磁共振波谱等技术鉴定其结构。结果:在4',7-二乙基射干苷元合成产物中共检出21个杂质,推定出17个杂质的可能结构;分离纯化得到4个杂质单体,分别鉴定为2-羟基-3-甲氧基-4,6,4'-三乙氧基脱氧安息香(1)、2,6-二羟基-3-甲氧基-4,4'-二乙氧基脱氧安息香(2)、射干苷元(3)和射干苷(4),其中杂质2为新化合物。结论:本结果可为4',7-二乙基射干苷元的合成工艺优化及质量控制提供重要依据。
关键词 4',7-二乙基射干苷元;杂质;液相色谱-串联质谱法;鉴定;纯化

Isolation, Purification and Identification of the Impurities in the Synthesis Products of 4', 7-Diethyl Tectorigenin

YUAN Chongjun, CHEN Chu, CHEN Shuai, LUO Sen, LUO Heng, WANG Jia (Institute of TCM Pharmacy, Sichuan Academy of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To isolate, purify and identify the impurities in the synthesis products of 4', 7-diethyl tectorigenin, and to provide reference for its quality control. METHODS: LC-MS/MS was adopted to analyze the impurities in the synthesis products of 4', 7-diethyl tectorigenin; the potential structure of each impurity was deduced according to mass-charge ratio [M+H]⁺ of ion peak. The major impurities were isolated by silica gel column chromatography using chloroform-methanol (gradient elution, 20:1, 10:1, 8:1, 6:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0:1, V/V). The structures of the impurities were identified by UV spectroscopy, IR spectroscopy and NMR. RESULTS: Totally 21 impurities were detected in the synthesis products of 4', 7-diethyl tectorigenin. The potential structures of 17 impurities were elucidated; 4 impurity monomers were isolated and purified. The impurities were identified as 2-hydroxy-3-methoxy-4, 6, 4'-triethoxy deoxybenzoin (1), 2, 6-dihydroxy-3-methoxy-4, 4'-diethoxy deoxybenzoin (2), tectorigenin (3) and tectoridin (4). impurity 2 was reported for the first time. CONCLUSIONS: The result can provide important evidence for the optimization of synthesis process and quality control of 4', 7-diethyl tectorigenin.

KEYWORDS 4', 7-diethyl tectorigenin; Impurity; LC-MS/MS; Identification; Purification

4',7-二乙基射干苷元(4', 7-diethyl tectorigenin)即5-羟基-6-甲氧基-4',7-二乙氧基异黄酮,是中药川射干(*Iris tectorum* Maxim.)中主要有效成分射干苷元经结构修饰后得到的新型抗病毒候选药物,具有较强的抗柯萨奇病毒作用,可用于治疗由柯萨奇病毒感染引起的心肌炎、小儿肺炎、无菌性脑膜炎、手足口病等^[1-3]。

4',7-二乙基射干苷元是由四川省中医药科学院自主研发,经川射干药材提取分离出射干苷,再水解得到射干苷元,然后在强碱性条件下与硫酸二乙酯反应得到4',7-二乙基射干苷元^[2]。由于在4',7-二乙基射干苷元的合成过程中不可避免地会产生杂质,为了控制其合成

产物的质量,笔者采用液相色谱-串联质谱(MS)法分析4',7-二乙基射干苷元合成产物中的杂质;通过硅胶柱层析法分离部分杂质,并鉴定其化学结构,为4',7-二乙基射干苷元的合成工艺优化及质量控制提供重要依据。

1 材料

1.1 仪器

RRLC-6410液质联用仪(美国Agilent公司);AV II核磁共振波谱(NMR)仪(德国Bruker公司);UV-2401PC紫外(UV)分光光度仪、FTIR8300红外(IR)检测仪(日本Shimadzu公司);WRS-2微机熔点测定仪(上海易测仪器设备有限公司);CPA225D电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

川射干(四川省新荷花中药饮片股份有限公司,批号:20131125)由四川省中医药科学院中药种植与资源

Δ 基金项目:四川省科技计划项目(No.2016JY0009);四川省公益性科研院所基本科研业务项目(No.A-2017N-28)

* 主任中药师。研究方向:天然活性成分研究与开发。电话:028-85237395。E-mail:csdctcm@126.com

研究所舒光明研究员鉴定为真品;4',7-二乙基射干苷元对照品(自制,批号:20131001,纯度:99.48%);乙酸铵(批号:20140305)、氢氧化钠(NaOH,批号:20140801)、盐酸(批号:20140604)、硫酸二乙酯(批号:20140602)、氯仿(批号:20140708)、甲醇(批号:20131204)均购自成都市科龙化工试剂厂;二甲基亚砜(DMSO)、乙腈均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Agilent SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,1.8 μm);流动相为乙腈-10 mmol/L 乙酸胺水溶液(30:70, V/V);流速为0.3 mL/min;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(+),喷雾电压4 000 V,源温度为100 ℃,雾化气为氮气,雾化压力为15 psi,去溶剂气为氮气,温度为300 ℃,流速为10 L/min,碰撞气为高纯氮气,压力为0.1 MPa;采用全扫描模式对合成产物进行检测。

2.2 射干苷元的制备

将川射干药材粉碎过20目筛,加4倍药材量70%乙醇加热回流3次,每次1 h,趁热过滤,合并滤液;60 ℃减压回收乙醇后,得棕黄色浸膏。将所得浸膏加入适量95%乙醇搅拌均匀,静置沉淀,过滤得射干苷粗品。再取射干苷粗品,加95%乙醇加热回流1 h,静置过夜,析出淡黄色沉淀,过滤,沉淀再用95%乙醇加热回流1次,得射干苷。取射干苷100 g置于1 000 mL圆底烧瓶中,加500 mL 50%乙醇搅拌均匀,再加50 mL 盐酸,加热回流6 h,趁热过滤;将滤液静置过夜,析出淡黄色沉淀,过滤;用水洗涤沉淀至流出液pH=6~7时,60 ℃减压干燥得淡黄色射干苷元粉末,纯度为95.52%。

2.3 4',7-二乙基射干苷元的合成

取“2.2”项下制备的射干苷元10 g、NaOH 2 g及95%乙醇50 mL置于500 mL圆底烧瓶中,于水浴中加热沸腾5 min,再加入10 mL 硫酸二乙酯,反应20 min后,立即用盐酸调pH至6~7,加200 mL水搅拌,置冷,析出沉淀,过滤;沉淀经洗涤后,60 ℃减压干燥,即得4',7-二乙基射干苷元合成产物。

2.4 4',7-二乙基射干苷元合成产物中的杂质分析

2.4.1 对照品溶液的制备 取4',7-二乙基射干苷元对照品适量于100 mL量瓶中,加甲醇超声(功率:400 W,频率:58 kHz,下同)溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.2 供试品溶液的制备 取“2.3”项下4',7-二乙基射干苷元合成产物5 mg至100 mL量瓶中,加甲醇超声溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.3 杂质分析 分别取“2.4.1”“2.4.2”项下制备的对照品溶液和供试品溶液,根据“2.1”项下条件进样分析,记录总离子流图和质谱信息(保留时间和质荷比[M+H]⁺)。

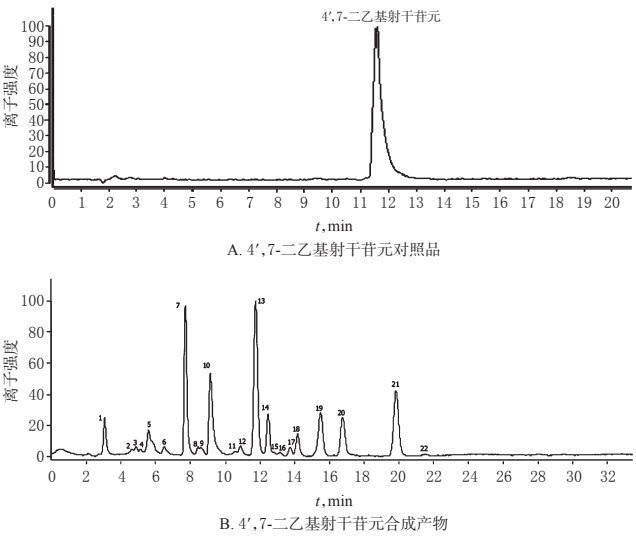
2.5 4',7-二乙基射干苷元合成产物中杂质的分离

取“2.3”项下4',7-二乙基射干苷元合成产物1.0 g,用20 mL 95%乙醇溶解,过滤,滤液60 ℃减压浓缩至5 mL,用5 g 80目硅胶拌匀吸附,干燥,研细,作为上柱样品。样品用200~300目硅胶柱层析,采用氯仿湿法装柱^[4],氯仿-甲醇梯度洗脱(20:1、10:1、8:1、6:1、5:1、3:1、2:1、1:1、0:1, V/V),收集洗脱液(每50 mL为一份)。根据薄层色谱[展开剂:氯仿-甲醇-甲酸(10:1:0.2, V/V/V)]的检测结果,合并比移值相等的流份,减压回收溶剂至干,再重结晶,即得部分杂质的单体化合物。测定各单体化合物的熔点(mp)、UV、IR、ESI-MS、¹H-NMR及¹³C-NMR等相关数据,并对其结构进行推定和鉴定。

3 结果

3.1 4',7-二乙基射干苷元合成产物中的杂质分析结果

4',7-二乙基射干苷元对照品溶液的离子流图见图1A;4',7-二乙基射干苷元合成产物的离子流图见图1B。



注:1~12、14~22为杂质;13为目标产物
Note: 1-12, 14-22 were impurity; 13 is target product

图1 总离子流图
Fig 1 TLC plots

由图1B可知,合成产物中有22个化合物(编号:1~22号)其中包括目标产物4',7-二乙基射干苷元(13号),其余为合成产物中的杂质。4',7-二乙基射干苷元合成产物的质谱信息见表1。

3.2 部分杂质的结构推定

4',7-二乙基射干苷元化学名为4',5,7-三羟基-6-甲氧基异黄酮,含有3个酚羟基;理论上,其与硫酸二乙酯进行乙基化反应时应有7个反应产物生成,即一乙基射干苷元类化合物3个,二乙基射干苷元类化合物3个,三

表1 4',7-二乙基射干苷元合成产物的质谱信息
Tab 1 Mass spectrum information of synthesis products of 4',7-diethyl tectorigenin

合成产物编号	保留时间,min	[M+H] ⁺ ,m/z
1	3.15	301.1
2	4.61	329.1
3	4.82	255.3
4	5.11	375.1
5	5.65	357.1
6	6.44	329.1
7	7.88	347.1
8	8.46	385.2
9	8.63	387.1
10	9.28	431.2
11	10.57	375.1
12	10.86	347.1
13	11.72	357.1
14	12.37	329.1
15	12.84	347.1
16	13.16	405.2
17	13.73	357.1
18	14.23	375.2
19	15.49	463.2
20	16.71	403.2
21	19.77	375.2
22	21.51	345.2

乙基射干苷元1个。相关文献报道^[5-6],异黄酮类化合物在强碱性条件下,可降解为脱氧安息香类化合物(即异黄酮C环开环衍生物,含有4个酚羟基)和苯乙酮类化合物等。根据各杂质离子峰的[M+H]⁺,推定各杂质的可能结构^[7]。合成产物中部分杂质的结构推定结果见表2。

从表2可知,4',7-二乙基射干苷元合成产物中的杂质,是由于射干苷元含有多个酚羟基造成取代基位置及个数的不同,以及射干苷元在强碱条件下C环发生开环而产生。推定出17个杂质的可能结构,而9、10、16、22号杂质,根据其离子峰的[M+H]⁺和文献资料,不足以确定其结构,故不作讨论。

3.3 部分杂质的结构鉴定

根据“2.5”项下方法分离得到4个杂质单体化合物,化合物1(20 mg)、7(80 mg)、19(20 mg)、21(40 mg)。

化合物1:淡黄色针晶(甲醇)。mp:214~216 ℃;电喷雾电离ESI-MS(*m/z*):299[M-H]⁻; ¹H-NMR(DMSO, 400 MHz)δ: 13.09(1H, s, 5-OH), 10.77(1H, s, 7-OH), 9.58(1H, s, 4'-OH), 8.34(1H, s, H-2), 7.37(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2', 6'), 6.82(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3', 5'), 6.50(1H, s, H-8), 3.74(3H, s, 6-OCH₃)。以上理化性质和光

表2 合成产物中部分杂质的结构推定
Tab 2 Probably structure of some impurity in synthesis products

合成产物编号	[M+H] ⁺ ,m/z	推定名	推定结构
1	301.1	射干苷元	
3	255.3	苯乙酮类化合物	
2,6,14	329.1	一乙基射干苷元类化合物	
5,17	357.1	二乙基射干苷元类化合物	
8	385.2	三乙基射干苷元	
7,12,15	347.1	二乙基射干苷元C环开环类化合物	

续表2
Continued tab 2

合成产物编号	[M+H] ⁺ , <i>m/z</i>	推定名	推定结构
4、11、18、21	375.1或375.2	三乙基射干苷元C环开环类化合物	
20	403.2	四乙基射干苷元C环开环类化合物	
19	463.2	射干苷	

谱数据与文献报道^[3]基本一致,因此,鉴定化合物为射干苷元。

化合物7:淡黄色结晶性粉末(无水乙醇)。mp: 137~138 ℃;UV_{λ_{max}}:288 nm;IR_{ν_{max}}:1 636,1 612,1 585,1 516,1 500,1 400,1 344,1 248,1 190,1 020;ESI-MS (*m/z*):347[M+H]⁺; ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ: 13.32 (1H, s, 6-OH), 7.17 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-2', H-6'), 6.87 (1H, s, 2-OH), 6.86 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-3', H-5'), 6.03 (1H, s, H-5), 4.36 (2H, s, -CH₂-), 4.10 (2H, q, 4-CH₂), 4.02 (2H, q, 4' -CH₂), 3.86 (3H, s, 6-OCH₃), 1.47 (3H, t, 4-CH₃), 1.40 (3H, t, 4' -CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 103.5 (C-1), 157.8 (C-2), 127.9 (C-3), 151.2 (C-4), 93.2 (C-5), 157.6 (C-6), 48.6 (C-7), 203.1 (C-8), 126.9 (C-1'), 130.8 (C-2', 6'), 114.4 (C-3', 5'), 162.1 (C-4'), 14.6, 63.4 (4' -OCH₂CH₃), 14.8, 64.4 (4-OCH₂CH₃)。以上理化性质和光谱数据与文献报道^[4]基本一致,因此,鉴定化合物为2,6-二羟基-3-甲氧基-4,4'-二乙氧基脱氧安息香。

化合物19:白色结晶性粉末(70%乙醇)。mp: 252~253 ℃;ESI-MS (*m/z*): 461[M-H]⁻; ¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ: 12.92 (1H, s, 5-OH), 9.58 (1H, s, 4' -OH), 8.44 (1H, s, H-2), 7.39 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3', 5'), 6.85 (1H, s, H-8), 5.07 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1'), 3.80 (3H, s, 6-OCH₃)。以上理化性质和光谱数据与文献报道^[3]基本一致,因此,鉴定化合物为射干苷。

化合物21:白色晶体(无水乙醇)。mp: 107~109 ℃;UV_{λ_{max}}:283 nm;ESI-MS (*m/z*):375[M+H]⁺;IR_{ν_{max}}:2 986,1 618,1 587,1 574,1 489,1 476,1 387,1 344,1 260,1 242,1 190,1 161; ¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ: 13.24 (1H, s, 2-OH), 7.14 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-2', 6'),

6.87 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-3', H-5'), 6.21 (1H, s, H-5), 4.36 (2H, s, 7-CH₂), 4.28 (2H, q, 4-CH₂), 4.10 (3H, t, 4' -CH₃), 4.09 (2H, q, 6-CH₂), 4.02 (2H, q, 4' -CH₂), 3.79 (3H, s, 3-OCH₃), 1.47 (3H, t, 4-CH₃), 1.45 (3H, t, 6-CH₃); ¹³C-NMR(CDCl₃, 600 MHz) δ: 111.0 (C-1), 158.9 (C-2), 131.3 (C-3), 152.8 (C-4), 97.2 (C-5), 157.7 (C-6), 48.9 (C-7), 203.1 (C-8), 127.4 (C-1'), 135.1 (C-2', 6'), 114.5 (C-3', 5'), 158.1 (C-4'), 14.9, 63.3 (4' - OCH₂CH₃), 15.1, 64.6 (4-OCH₂CH₃), 16.0, 70.1 (6- OCH₂CH₃)。鉴定此化合物为2-羟基-3-甲氧基-4,6,4'-三乙氧基脱氧安息香(新化合物)。

根据各化合物的mp、UV、IR、ESI-MS、¹H-NMR及¹³C-NMR等相关数据,确定其化学结构,各化合物结构式见图2。

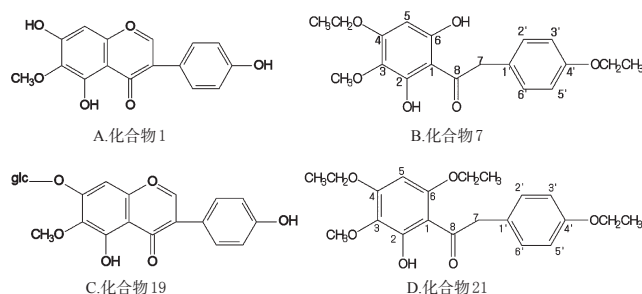


图2 部分杂质单体化合物的结构式

Fig 2 Structure of some impurity monomer compounds

4 讨论

在化合物的制备反应过程中会不可避免地产生杂质,故研究合成产物的杂质,有利于了解合成的原理、过程以及合成方法的合理性,以期对工艺进行评判及改进。从本研究的试验结果可知,4',7-二乙基射干苷元合成产物的杂质过多,射干苷元乙基化反应,可先后生成

HPLC-CAD法同时测定风湿定片中7种活性成分的含量

侯爱荣^{1*},邢晔忠²,吴雪松^{3#}(1.烟台市食品药品检验检测中心,山东烟台 264003;2.威海市食品药品检验检测中心,山东威海 264200;3.天津科伦药物研究有限公司,天津 300457)

中图分类号 R917;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)23-3212-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.23.10

摘要 目的:建立同时测定风湿定片中甘草酸、水杨苷、甘草次酸、毒藜碱、丹皮酚、欧前胡素及异欧前胡素含量的方法。方法:采用高效液相色谱-电雾式检测器(HPLC-CAD)法。色谱柱为Thermo Hypersil BDS C₁₈,流动相为乙腈-10 mmol/L 甲酸铵(甲酸调pH至4.5,梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为35℃,CAD雾化器温度为35℃,气压为(59.6±0.1) psi,检测频率为10 Hz,进样量为20 μL。结果:甘草酸、水杨苷、甘草次酸、毒藜碱、丹皮酚、欧前胡素及异欧前胡素检测质量浓度线性范围为0.42~16.80、0.28~11.20、0.16~6.20、0.98~39.40、1.02~41.00、0.11~4.40、0.10~3.80 μg/mL($r \geq 0.999 1$);检测限分别为0.03、0.02、0.02、0.03、0.03、0.02、0.02 μg/mL,定量限分别为0.11、0.06、0.06、0.10、0.11、0.08、0.07 μg/mL;精密密度、稳定性(48 h)、重复性试验的RSD均<2.0%($n=6$ 或 $n=7$);平均回收率为98.61%~99.76%,RSD为1.11%~1.51%($n=6$)。结论:建立的方法操作简便、灵敏度高、结果准确,可用于风湿定片中甘草酸、水杨苷、甘草次酸、毒藜碱、丹皮酚、欧前胡素及异欧前胡素含量的同时测定。
关键词 高效液相色谱-电雾式检测器法;风湿定片;水杨苷;毒藜碱;丹皮酚;欧前胡素;含量测定

Simultaneous Determination of 7 Kinds of Active Components in Fengshiding Tablet by HPLC-CAD
HOU Airong¹, XING Yezhong², WU Xuesong³ (1.Yantai Center for Food and Drug Test, Shandong Yantai 264003, China; 2.Weihai Center for Food and Drug Test, Shandong Weihai 264200, China; 3.Tianjin Kelun Medicine Research Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

一乙基、二乙基、三乙基射干苷元类化合物;合成产物中检出大量的射干苷元C环开环类化合物,可能的原因是反应时间过长,氢氧化钠用量过多,本课题组在后续的合成工艺优化中也会进一步探究。已上市药物的制剂或原料药的杂质研究文献报道较多^[8-12],但不能直接反映化合物合成情况,且由于杂质含量较低(在原料药中多在1%以下),故杂质的分离纯化比较困难,对其结构大多只能推测。本研究将4',7-二乙基射干苷元合成产物直接进行LC-MS/MS测定,结果可直观地反映出合成的情况,且分离得到部分杂质并鉴定了其化学结构,可为4',7-二乙基射干苷元合成产物的杂质分析提供对照品,为其质量控制奠定基础。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:41-42.
[2] 徐学民,袁崇均,陈帅,等.一种异黄酮衍生物及其制备方法和用途:中国,CN101723926B[P]. 2013-02-22.
[3] 袁崇均,王箭,陈帅,等.川射干化学成分的研究[J].天然

产物研究与开发,2008,20(3):444-446.

[4] 李瑞玲,孙俊馥,杨森,等.白英正丁醇萃取部位的化学成分研究[J].中国药房,2016,27(30):4252-4254.
[5] 林启寿.中草药成分化学[M].北京:科学出版社,1977:326-328.
[6] 余亚纲,汪聪慧,刘岱,等.中药射干亲脂中性成分研究[J].药学学报,1983,18(12):969-972.
[7] 宋志军,张沛,梁健,等.川射干异黄酮成分的ESI-MS-MS快速分析[J].质谱学报,2009,30(11):69-70.
[8] 缪文玲,侯玉荣,孙晶,等.阿莫西林克拉维酸钾片的杂质谱研究[J].中国药理学杂志,2017,52(24):2202-2208.
[9] 张婷婷,金波,李彤,等. HPLC-MS/MS 鉴定创新药物艾托莫德的有关物质[J].中国药理学杂志,2017,52(1):68-71.
[10] 左文飞,潘娜,范雪平,等.泮托拉唑钠杂质校正因子的测定[J].中国药理学杂志,2012,47(24):2029-2031.
[11] 陈红,杨梅,张姮婕,等.二维超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术鉴定氯化琥珀胆碱原料药中的杂质[J].中国药房,2018,29(7):941-944.
[12] 仲婕,朱德领,李保山,等. HPLC法测定尼鲁米特原料药的含量和杂质[J].中国药房,2014,25(1):61-63.

* 副主任药师。研究方向:药品质量控制。电话:0535-6260839。E-mail:swqs1965@163.com
通信作者:中级工程师,硕士。研究方向:药品质量控制。电话:022-65378319。E-mail:wxs-1989@163.com

(收稿日期:2018-08-01 修回日期:2018-10-10)
(编辑:唐晓莲)