

新鱼腥草素钠缩合反应机制探讨及聚合物结构鉴定

许 瑞, 蒋玲敏, 贺玫明, 刘玉玲*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 为探讨新鱼腥草素钠缩合反应机制并鉴定稳定化缩合产物的化学结构, 制备了二聚物并进行转化反应, 采用 LC-DAD-MS/MS 联用技术分析转化产物的紫外吸收特征及质谱信息, 采用紫外分光光度法考察转化动力学及转化半衰期。经有机溶剂萃取及柱层析分离纯化, 制备了稳定化缩合产物对照品, 采用红外、高分辨质谱和核磁共振技术进行结构鉴定, 并将 LC-MS/MS 分析结果与二聚物转化产物进行比较。二聚物结构不稳定, 在水溶液中易解离生成游离的十二酰乙醛, 进而发生三分子环合加成-原位脱水缩合反应, 生成含六元环稳定结构的 1,3,5-三-(十二烷酰基)-苯(三聚物), 转化反应符合二级动力学方程, 25 °C (298 K) 和 100 °C (373 K) 条件下转化半衰期分别为 3.17 h 和 6.39 min。二聚物系缩合过程中的中间过渡状态, 推测新鱼腥草素钠注射液中的缩合产物主要以三聚物的形式存在。

关键词: 新鱼腥草素钠; 缩合反应; 二聚物; 三聚物; 结构鉴定

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0609-06

The condensation mechanism of sodium new houttuifonate and determination of the chemical structure of condensation products

XU Rui, JIANG Ling-min, HE Jiu-ming, LIU Yu-ling*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: To study the condensation mechanism of sodium new houttuifonate, and determinate the chemical structure of condensation products, dimer was prepared, and LC-DAD-MS/MS multiple techniques were employed to investigate the ultraviolet absorption feature and mass spectrum of transformation solution of dimer, and the transformation kinetics and half-life were studied by ultraviolet spectrophotometry. The pure substance of stable condensation product was obtained by extracting with organic solvent and purifying with column chromatography, the chemical structure of this substance was identified by assaying of IR, HR-ESI-MS and NMR, and the data of LC-MS/MS were compared with that of transformation products of dimer. The results indicated that the dimer is unstable, it will be rapidly dissociated in aqueous solution to form free new houttuifonate and then cycloaddition reaction will occur and followed by an *in situ* dehydration to generate 1, 3, 5-tri-(dodecanoyl) benzene (trimer) with a six-ring which is stable in aqueous solution. The transformation process may fit second-order kinetics, and the half-times were found to be 3.17 hours at 25 °C (298 K) and 6.39 min at 100 °C (373 K), separately. It suggests that dimer is an intermediate in condensation reaction, and the end condensation product of sodium new houttuifonate injection may exist as trimer.

Key words: sodium new houttuifonate; condensation reaction; dimer; trimer; structure determination

新鱼腥草素钠 (sodium new houttuifonate, I) 在

水溶液中可解离成十二酰乙醛 (新鱼腥草素, new houttuifonate, II), II 含有化学性质活泼的醛酮结构, 易发生聚合、氧化等多种降解反应^[1], 因此, 新鱼腥草素钠注射液在制备及贮存过程中质量极不稳定,

收稿日期: 2009-01-06.

*通讯作者 Tel: 86-10-63159373, Fax: 86-10-63017757,

E-mail: ylliu@imm.ac.cn

采用 HPLC 法测定, 主成分含量仅为 0.2%~6.1%^[2], 但降解产物结构、组成及具体的降解机制至今仍不十分清楚。蒋玲敏等^[3]考察了新鱼腥草素钠在水溶液中的降解行为, 结果显示, 主成分含量随时间的变化符合二级动力学方程, 在各 pH 缓冲溶液条件下药物的降解特征曲线为钟罩形, 中性条件下降解最快, 酸性和碱性条件下降解相对较慢, 提示存在双分子或多分子反应的控速步骤, 并非仅仅是简单的酸碱催化或氧化反应。课题组前期对新鱼腥草素钠缩合反应机制进行了初步研究^[4], 检测到二分子羟醛缩合产物(二聚物)的存在, 但随着温度的升高或贮存时间的延长, 二聚物含量逐渐减少甚至消失, 提示二聚物不稳定, 会进一步发生转化并生成新的产物。熊婧等^[2]采用 UPLC-MS 技术对新鱼腥草素钠注射液化学成分进行分析, 发现新鱼腥草素钠在水溶液中即刻发生二分子羟醛缩合, 初始时二聚物含量为 11%, 放置 1 个月达 17%, 经 100 °C 加热 3 h 后仅为 0.4%, 而多批市售注射剂中二聚物含量极低或几乎检测不到。

目前尚无关于二聚物转化机制及稳定化缩合产物结构鉴定的研究报道。缩合产物的存在不仅影响疗效, 同时还可能与临床上出现的不良反应及毒性相关。为此, 本文对二聚物转化动力学及转化半衰期进行考察, 探讨新鱼腥草素钠缩合反应机制, 并对转化产物的化学结构进行鉴定, 为新鱼腥草素钠质量控制方法的建立及注射剂中缩合产物含量的测定奠定基础。

材料与amp;方法

仪器 Agilent 1100 液相色谱系统 (美国安捷伦公司), 配有双高压梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、内置柱切换阀的柱温箱、二极管阵列 (DAD) 检测器。QTRAP™ 型四级杆-线性离子阱串联质谱仪 (美国 ABI 公司), 配有大气压化学离子源 (APCI) 及 Analyst 1.4.2 数据处理系统。The ACCUTOFCS JMS-T100CS 型高分辨 (冷喷雾) 质谱仪 (日本 JEDL 公司)。MERCURY-plus-400 型 (400 MHz) 及 INONA-500 型 (500 MHz) 核磁共振仪 (美国瓦里安公司)。

材料 新鱼腥草素钠原料药 (市售, 含量 >99.0%)。吐温 80 (GFCO CHEMICAL SUPPLIES, HONGKANG 批号:56023-21); 甲醇 (天津市永大化学试剂开发中心, 色谱纯, 20080625); 乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 水为纯净水; 其他试剂均为分析纯。

二聚物的制备、结构鉴定及纯度考察

制备及结构鉴定 取新鱼腥草素钠原料药 2.0 g 置 100 mL 圆底烧瓶内, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠水溶液 50 mL 使其溶解。加入乙酸乙酯 20 mL 和乙醚 7 mL, 避光条件下密闭静置 3 d, 待片状结晶在油水界面析出, 减压抽滤, 弃去溶液, 结晶用水充分洗涤至洗涤液对石蕊试纸显中性, 再分别用少量乙酸乙酯和无水乙醚各洗涤 3 次, 减压抽干, 真空干燥 24 h, 得类白色片状结晶。取本品, 分别进行红外吸收光谱 (IR)、高分辨质谱 (HR-ESI-MS) 和核磁共振谱 (¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、H-H COSY、HMBC) 测定, 鉴定化学结构。

纯度及紫外特征考察 取本品适量, 加乙醇溶解并稀释至浓度约为 2 mg·mL⁻¹ 的溶液, 取 10 μL 进样, 以 Agilent XDB-C₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相甲醇 (A) - 水 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, A 为 10%~100%, 15~25 min, A 为 100%, 二极管阵列 (DAD) 检测, 扫描紫外特征吸收图, 归一化法计算化学纯度。

二聚物转化溶液的制备及其 LC-MS/MS 分析

液相色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (98 : 2); 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 进样量 20 μL, 检测波长 λ = 228 nm, 柱后分流 3 : 1; 色谱柱流出物依次经 DAD 检测器和质谱串联检测, DAD (200~400 nm) 全波长扫描。

质谱检测条件 大气压化学离子源 (APCI), 源温度 350 °C, 雾化气 (N₂) 5 MPa (相对单位), 干燥气 (N₂) 压力 4 MPa; DP 电压: 60 V; EP 电压: 10 V; CE: 55 V。正离子检测模式, 扫描方式为质谱全扫描和子离子扫描, 扫描范围 100~700 Da。

样品分析 取二聚物适量, 加二甲基亚砜 (DMSO) 溶解制成约 5 mg·mL⁻¹ 溶液, 取 1 mL 加水稀释 10 倍, 100 °C 放置 3 h 使其完全转化, 冷却至室温, 加甲醇适量稀释后, 量取 20 μL, 进行 LC-MS/MS 检测, 记录色谱峰保留时间、紫外特征扫描图、一级质谱和二级质谱图。

二聚物转化动力学考察

25 °C (298 K) 转化半衰期 取二聚物适量, 加 DMSO 溶解制成约 5 mg·mL⁻¹ 溶液, 取 1 mL 加水稀释 10 倍, 于 25 °C 放置 0、1、2、4、6 h, 使其发生不同程度的转化, 加甲醇适量稀释后, 采用紫外分光光度法, 于 365 nm 处测定吸收度, 测定不同时间点二聚物的残留浓度 (c_n) 和 0 时初始浓度 (c₀), c_n/c₀ 即为

剩余百分率(c_t)。以 c_t 对时间 t (h)进行动力学拟合^[5,6],考察转化动力学方程,计算25℃转化半衰期($t_{1/2}^{298\text{K}}$)。

100℃(373K)转化半衰期 取二聚物适量,DMSO溶解制成5 mg·mL⁻¹溶液,取1 mL加水稀释10倍,于100℃加热0、10、20、30和40 min,取出后立即冷却,加甲醇适量稀释后,照上述方法依法测定 c_n 、 c_0 和 c_t ,考察转化动力学方程,计算100℃转化半衰期($t_{1/2}^{373\text{K}}$)。

稳定化缩合产物对照品的制备、结构鉴定及LC-MS/MS分析

制备及结构鉴定 将新鱼腥草素钠原料药适量溶解于氢氧化钠的水溶液中,上层加入乙酸乙酯及乙醚适量,加塞压盖密封后,40℃烘箱放置3 d,待溶液的有机层变为橙黄色,分离有机层,经硅胶柱及凝胶柱分离纯化,旋转蒸发去除有机溶剂,减压干燥24 h,得淡黄色蜡状物。取本品适量,分别进行IR、HR-ESI-MS、¹H NMR、¹³C NMR、DEPT和HMBC测定,鉴定化学结构。

LC-MS/MS分析 取淡黄色蜡状物适量,加乙酸乙酯溶解制成2 mg·mL⁻¹溶液,经甲醇适当稀释后,照上述“二聚物转化溶液的制备及其LC-MS/MS分析”项下的分析条件依法测定,记录色谱峰保留时间、紫外特征曲线及质谱和二级质谱图,推测可能的裂解途径,并将结果与二聚物转化溶液进行比较,分析两者化学结构的一致性,探讨二聚物转化反应机制。

结果

1 二聚物结构鉴定及纯度考察

结构鉴定 HR-ESI(-)-MS给出分子式C₂₈H₄₉O₃⁻([M]⁻实测值433.367 04,理论值433.368 17)。IR(KBr) cm⁻¹: 2 956, 2 917, 2 850, 1 650, 1 608, 1 573, 1 469, 1 394, 719。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 9.53(1H, s, H-1), 7.96(1H, d, J = 15.6 Hz, H-3), 7.60(1H, d, J = 15.6 Hz, H-4), 2.46(2H, t, H-2'), 2.29(2H, t, H-6), 1.45(4H, br s, H-3', H-7), 1.25(32H, m, H-4'~11', H-8~15), 0.83(6H, t, H-12', H-16)。¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 199.69(C-5), 195.24(C-1'), 184.31(C-1), 141.07(C-3), 113.63(C-4), 111.32(C-2), 22.12~37.61(C-2'~11', 6~15), 13.93(C-12', C-16)。上述信号归属是通过DEPT、H-H COSY、HMBC二维核磁共振谱完成。

根据上述图谱和元素分析结果,确定二聚物的结构为2-(1'-羰基十二烷基)-5-羟基-2,4-十六二烯醛钠盐,结构式见图1。

纯度及紫外特征 HPLC色谱图及色谱峰对应的紫外特征吸收曲线见图2。结果显示,二聚物最大吸收波长为 λ_{max} 304及365 nm,其中304 nm处为R带弱吸收($\epsilon < 10^3$),是杂原子不饱和基团C=O发色团的特征;365 nm有较强吸收($\epsilon > 10^3$),为K吸收带,共轭双键受羰基共轭效应及助色团-ONa的影响,向长波方向位移;二聚物的紫外特征显示了其醛酮类物质的特征吸收。归一化法计算,二聚物的化学纯度为93.7%。

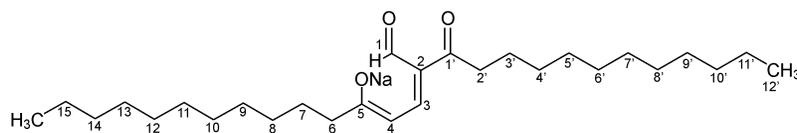


Figure 1 Chemical structure of dimer

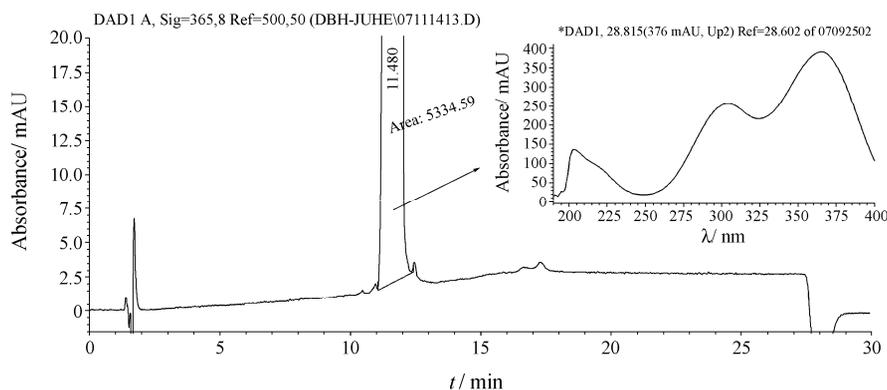


Figure 2 The HPLC chromatograms and UV spectra of dimer

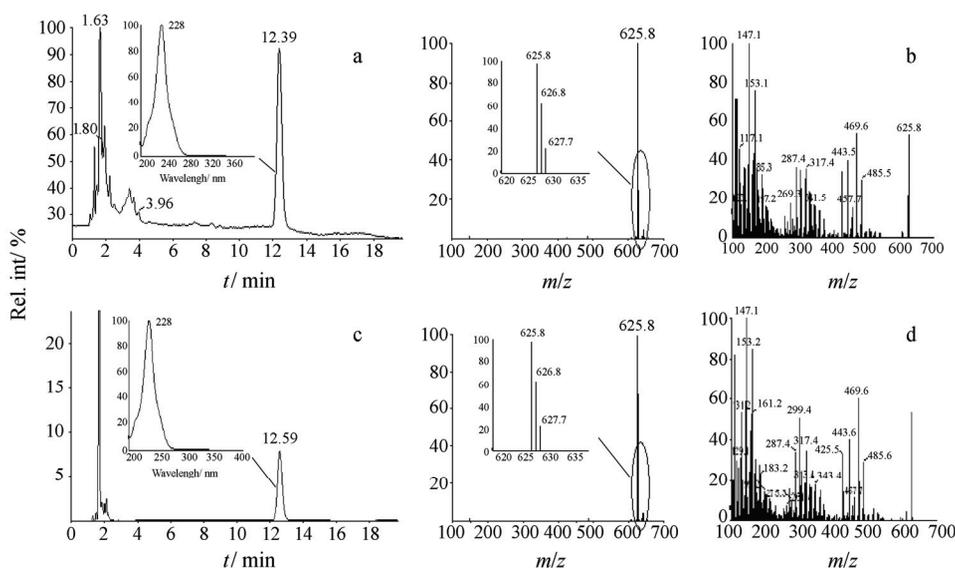


Figure 3 (a) The HPLC-DAD chromatograms of the transformation solution of dimer. (b) The (+)APCI-MS and MS/MS spectra of the transformation solution of dimer. (c) The HPLC-DAD chromatograms of stable condensation product (trimer). (d) The (+)APCI-MS/MS spectra of stable condensation product (trimer)

2 二聚物转化溶液的 LC-MS/MS 分析

二聚物转化溶液的液相色谱图及色谱峰对应的紫外吸收曲线见图 3(a), 色谱峰对应的质谱和二级质谱结果见图 3(b)。

图 3(a) 结果表明, 在选定的液相色谱条件下, 二聚物转化产物保留时间为 12.39 min, 最大紫外吸收波长为 228 nm。

图 3(b) 结果表明, 质谱检测到分子离子 $[M+H]^+$ m/z 625, $[M+H]^+$ 二级质谱中主要子离子为 m/z 485、 m/z 469、 m/z 443、 m/z 425、 m/z 317、 m/z 287 和 m/z 147。

3 二聚物转化动力学

以 c_t 对时间 t 进行动力学拟合^[5,6], 经比较, 二聚物水溶液在不同温度下的转化反应均符合二级动力学方程, 其特征参数见表 1。

Table 1 The parameters of the second-order kinetics at different temperature

Temperature	25 °C (298 K)	100 °C (373 K)
Second-order kinetic equation	$1/c_t = 0.2924t + 1.0756$ $r = 0.9918$	$1/c_t = 0.2568t + 0.3585$ $r = 0.9875$
$T_{1/2}$	$t_{1/2}^{298K} = 3.17$ h	$t_{1/2}^{373K} = 6.39$ min

4 稳定化缩合产物对照品的结构鉴定及 LC-MS/MS 分析

结构鉴定 稳定化缩合产物对照品为淡黄色蜡状固体, mp 40~41 °C。紫外吸收光谱显示其在 λ 228 nm (石油醚, $\epsilon > 10^4$) 处有最强吸收, 为分子中共轭羰

基特征吸收。HR-ESI-MS 给出分子式 $C_{42}H_{73}O_3$ ($[M+H]^+$ 实测值 625.556 09, 理论值 625.555 97)。IR (KBr) cm^{-1} : 1 697 (C=O)。 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 0.885 (t, 9H, $J = 5.5$ Hz, CH_3), 1.270 (ca, 48H, $[CH_2]_n$), 1.767 (m, 6H, $\underline{CH_2}CH_2CO$), 3.056 (t, 6H, $J = 7$ Hz, $\underline{CH_2}CO$), 8.678 (s, 3H, CH)。 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ : 14.096 (CH_3); 22.667, 24.102, 29.245, 29.318, 29.479, 29.597 (CH_2); 31.897 ($\underline{CH_2}CH_2CO$); 38.900 ($\underline{CH_2}CO$); 131.100 (CH); 137.825 (C); 199.287 (CO)。上述信号归属是通过 DEPT、HMBC 二维核磁共振谱及有关文献^[7]完成。

综上所述, 确定二聚物进一步转化后的产物为三聚物, 化学结构为 1,3,5-三-(十二烷酰基)-苯, 结构式见图 4。

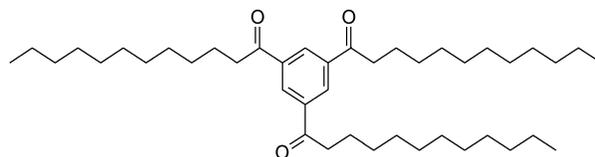


Figure 4 Chemical structure of trimer

LC-MS/MS 分析 稳定化缩合产物对照品的 HPLC 色谱图及紫外吸收曲线见图 3(c), 质谱和二级质谱图见图 3(d)。

结果表明, 在选定的色谱条件下, 三聚物保留时间为 12.59 min, 最大紫外吸收波长为 228 nm, 分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 625, $[M+H]^+$ 二级质谱中主要子离子为 m/z 485、 m/z 469、 m/z 443、 m/z 425、 m/z 317、

m/z 287 和 m/z 147, 结果与二聚物转化溶液测定结果完全一致。

根据以上结果, 推测三聚物的裂解途径见图 5。

讨论

二聚物转化规律及缩合机制探讨 二聚物系由二分子十二酰乙醛发生羟醛缩合脱去一分子水而成, 二聚物在水溶液中极不稳定, 快速转化生成六元环稳定结构的三聚物, 25 °C 条件下的转化半衰期为

3.17 h, 而 100 °C 时仅为 6.39 min。三聚物无醛酮类结构特征, 其紫外吸收与二聚物有本质区别, 在 365 nm 处无紫外吸收, 因此, 采用紫外分光光度法, 通过对 365 nm 处吸收度的测定, 可考察二聚物含量变化及转化动力学。

根据三聚物的结构特点, 推测二聚物进一步转化生成三聚物的可能转化路径如图 6 所示, 即二聚物在水溶液中解离成十二酰乙醛, 而十二酰乙醛在一定条件下, 发生三分子[2+2+2]环合加成-原位脱水缩

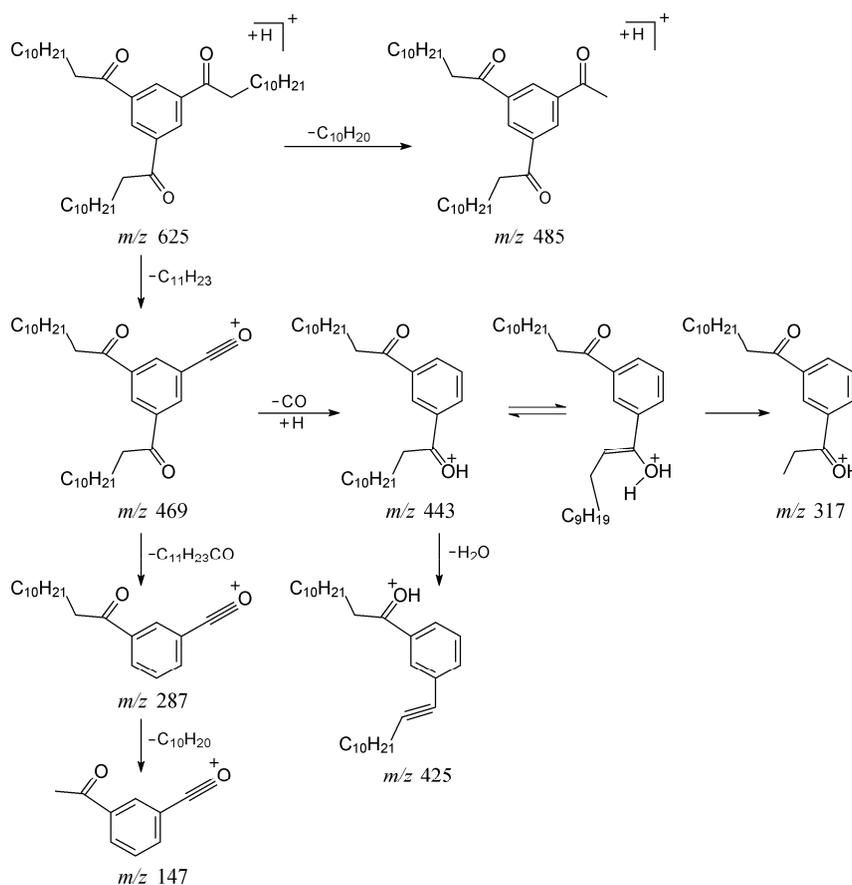


Figure 5 The proposed fragmentation pathway of trimer based on MS/MS spectrum

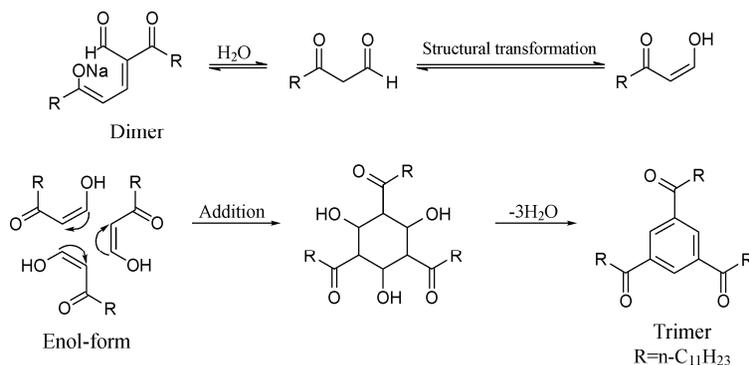


Figure 6 Chemical equation of trimer preparation from dimer

合反应^[8]。

缩合产物的制备方法 新鱼腥草素钠在氢氧化钠溶液中具有较高的溶解度和较快的降解速率^[3], 随着新鱼腥草素钠的降解, 不断生成二聚物并逐渐转化为稳定的三聚物。新鱼腥草素钠与二聚物和三聚物的极性依次为新鱼腥草素钠>二聚物>三聚物, 利用三者极性的差异, 在新鱼腥草素钠氢氧化钠溶液中加入由乙酸乙酯和乙醚组成的有机相, 生成的二聚物将于油水界面析出, 而三聚物则转移至有机溶剂中。根据二聚物转化规律, 通过对转化温度和时间的控制, 并收集不同的组分, 即可获得二聚物或三聚物。为提高对照品的化学纯度, 在二聚物制备时, 分别用水和有机溶剂洗涤, 以去除水溶性和脂溶性杂质; 在三聚物制备时, 分别用硅胶柱和凝胶柱纯化, 以去除脂溶性和小分子杂质。

缩合产物的液相色谱条件 目前文献报道的用于新鱼腥草素钠含量测定的 HPLC 方法大多采用 C₁₈ 柱, 且流动相极性较大。由于二聚物极性小, 在 C₁₈ 柱中强保留, 因此, 主成分含量测定方法难以对二聚物进行洗脱和检测。本实验通过大量优化, 选择 C₈ 色谱柱, 在建立的梯度洗脱条件下, 使二聚物获得良好洗脱, 保留时间 $t_R \approx 11.5 \text{ min}$ 。

三聚物结构对称, 且连有长脂肪链, 极性比二聚物更小, 主成分及二聚物含量测定的色谱条件均无法将三聚物洗脱。本文通过对色谱柱和流动相的进一步优化, 选择 C₈ 色谱柱, 以 98% 甲醇-水为流动相, 在 25 °C 条件下, 三聚物 $t_R \approx 12 \text{ min}$ 。

三聚物的结构特征及其对安全性的影响 三聚物化学名称为 1,3,5-三-(十二烷酰基)-苯, 系六元环稳定结构。根据缩合机制推测, 新鱼腥草素钠注射液中的缩合产物主要以三聚物的形式存在。因此, 三

聚物对注射液安全性的影响值得关注。后续研究将建立三聚物的质量控制方法, 并对注射液中三聚物的含量进行定量分析, 结合药理毒理试验结果, 评价缩合产物对新鱼腥草素钠安全性和有效性的影响, 在此基础上, 探讨提高新鱼腥草素钠质量可控性的药剂学方法。

References

- [1] Zeng ZH, Shi JG, Zeng HP, et al. Application of organic mass spectrometry in studies on *Houttuynia cordata*, a traditional Chinese medicine [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2003, 31: 399-404.
- [2] Xiong J, Wu JM, Zhang QM, et al. Studies on chemical constituents of sodium new houttuynofate injection (I) [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2008, 43: 866-869.
- [3] Jiang LM, Xu R, Liu YL. Degradation kinetics of sodium lauroyl- α -hydroxyethyl sulfonate in aqueous solution [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2008, 39: 606-609.
- [4] Jiang LM. Study on the degradation mechanism of sodium new houttuynofate, and evaluate their safety and efficiency of the degradation products [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2008.
- [5] Rao CY. Studies on photodegradation kinetics of fleroxacin solution [J]. Pharm J Chin PLA (解放军药学报), 2003, 19: 385-388.
- [6] Ding WM, Li M, Li GL, et al. Studies on photodegradation kinetics of geldanamycin solution [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27: 867-869.
- [7] Addae-Mensah I, Waibel R, Achenbach H. Novel long-chain triacylbenzenes from *Cochlospermum planchonii* [J]. Liebigs Annalen Chemie, 1985, 1284-1287.
- [8] Valla A, Andriamialisoa Z, Giraud M. Facile synthesis of long-chain triacylbenzenes form *Cochlospermaceae* [J]. Nat Prod Lett, 1994, 4: 107-111.