

光动力治疗用福大赛因异构体的拆分及结构鉴定

杨蓓蓓¹, 么会生², 刘宏², 江舟², 王建², 贺文义¹,
王琰^{1*}, 陈耐生^{2*}, 黄金陵²

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 福州大学功能材料研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 光动力治疗用抗癌光敏剂“福大赛因”是 ZnPcS2P2 中 4 个异构体组成的取代酞菁化合物的混合物, 为了更好地对“福大赛因”进行质量研究和质量控制, 需要对这 4 个结构相似、化学性质相近的同分异构体进行拆分及结构鉴定。本研究以反相 C₁₈ 色谱柱, 乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 十六烷基三甲基溴化铵-0.01 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ (用 KOH 试液调至 pH 6.8) 为流动相进行梯度洗脱 (0 min 60%~30 min 65%), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 在 674 nm 波长处检测, 4 个同分异构体得到较好分离。采用反相 C₁₈ 半制备柱, 通过反复进样首次成功分离、制备了 4 个同分异构体纯品, 并进行了 ¹H NMR 谱、gCOSY、NOE1D 谱测定。通过已知的酞菁母核结构特征, 推断出了 4 个异构体的结构。同时对 FD-1、FD-2、FD-3、FD-4 四个异构体通过 HPLC/DAD 含量测定方法学研究, 4 个异构体在测定范围内呈良好的线性关系, 方法的精密度 (以 RSD%表示) 分别为 0.12%、0.66%、0.99%和 1.21%, 最低检出限分别为 15、20、12 和 25 ng。实现了以单一成分来控制福大赛因的质量, 并测定了 10 份不同批次的样品, 为完善“福大赛因”的质量标准提供了依据。

关键词: 舒他兰锌; 福大赛因; 抗癌光敏剂; 酞菁异构体; 拆分分析; 结构鉴定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 12-1545-05

Structural identification and quality study on isomers of a novel anticancer photosensitizer Photocyanine

YANG Bei-bei¹, YAO Hui-sheng², LIU Hong², JIANG Zhou², WANG Jian², HE Wen-yi¹, WANG Yan^{1*},
CHEN Nai-sheng^{2*}, HUANG Jin-ling²

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. Institute of Research on Functional Materials, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Our work focuses on the quality control and structural identification of Photocyanine as a cancer therapeutic photosensitizer. Photocyanine is a mixture which contains four ZnPcS2P2 type substituted Phthalocyanine isomers. In order to obtain the single component from Photocyanine, the mixture of four isomers possessing the similar structures and chemical property had been isolated and purified. An HPLC method with a mixture of methanol-acetonitrile-ion-pair buffer as the mobile phase was applied to isolate the four isomers by means of a semi-preparative C₁₈ column. To remove the salts which were mixed in the preparative product, a SPE C₁₈ column was used to separate the salts by elution with water and then the marker component was eluted by methanol. Subsequently, a column of Sephadex LH-20 gel was applied to elute the crudes with methanol to desalination. The purity of the isolated compound was measured by TLC and four different isomers of phthalocyanine were obtained. The chemical structures of them were elucidated by ¹H NMR spectra,

收稿日期: 2010-07-20.

基金项目: 国家科技重大专项综合平台资助项目 (2009ZX09301-003-7-1); 福建省教育厅科技资助项目 (JA09011, JA09016).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165238, E-mail: wangyan@imm.ac.cn

Tel / Fax: 86-591-87892632, E-mail: nschen@fzu.edu.cn

gCOSY and NOE1D. An HPLC-DAD method was developed for simultaneous determination of four major isomers in Photocyanine with a C_{18} column (Grace Smart, 150 mm $\times$ 4.6 mm ID, 5 μ m). The separation was carried out with a gradient program at a flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and ion-pair buffer (0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ hexadecyl trimethyl ammonium bromide and 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ potassium dihydrogen phosphate, adjusted the pH value to 6.8 with potassium hydroxide solution). The resolution values of four isomers were 2.5, 1.20, 1.33, and 1.8. Linear regression analysis for four compounds was performed by the external standard method. Four constituents were linear in the concentration range of 0.005 to 10 μ g. The values of relative standard deviation (RSD) of intra-day were 0.12%, 0.66%, 0.99%, and 1.21%, respectively. The limits of detection for four compounds were 15 ng, 20 ng, 12 ng, and 25 ng, respectively. This method was simple, accurate and reproducible. The developed method can be successfully applied to analyze isomers in Photocyanine.

Key words: suftalan zinc; Photocyanine; anticancer photosensitiser; phthalocyanine isomer; resolution; structural identification

根据世界卫生组织 WHO 的报告, 癌症死亡人数约占所有死亡人数的 13%^[1]。光动力治疗 (photo-dynamic therapy, PDT) 是一种新的癌症治疗方法^[2]。

“福大赛因” (舒他兰锌, suftalan zinc) 是一种全化学合成的抗癌光敏剂, 该化合物在光照下有较强的杀灭肿瘤细胞的能力^[3, 4]。

“福大赛因”注射剂原质量标准中, 由于 4 个同分异构体未能拆分, 所以采取了 4 个成分的总含量为质量控制标准^[5]。本研究分离了“福大赛因”的同分异构体, 为提高其质量控制标准奠定基础。

材料与方法

仪器与试剂 Agilent1200 液相色谱系统; 美国 SSI-1500 型半制备液相色谱系统; 核磁共振谱采用 VARIAN VNS-600MHz 型仪器测定。

甲醇、乙腈为色谱级, 水 (娃哈哈纯净水), KOH、KH₂PO₄、十六烷基三甲基溴化铵均为分析纯。“福大赛因”样品 (福州大学功能材料研究所研发, 福建省龙华药业有限公司试生产), FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4 对照品 (自制“福大赛因”4 个异构体, 归一化纯度 $\geq 95\%$)。

溶液的配制 精密称取“福大赛因”样品适量, 用甲醇定容, 使成 2.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 储备液, 用前加甲醇稀释至需要浓度。

对照品溶液的配制 精密称取 FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4 对照品适量, 用甲醇定容, 使成 2.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 储备液, 用前加甲醇稀释至需要浓度。

对照品的分析色谱条件 色谱柱: Grace Smart C₁₈ (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m, 美国 Alltech 公司); 柱温:

25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 674 nm; 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 十六烷基三甲基溴化铵 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ + KH₂PO₄ 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 用 KOH 试液调 pH 值到 6.8; 梯度洗脱程序为 0~30 min, A 为 60%~65%, 流速为 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 进样量为 5 μ L。

对照品的制备 采用液相色谱半制备方法制备化合物 FD-1+FD-2、FD-3 和 FD-4, 由于 FD-1 与 FD-2 性质太相近, 在半制备条件下无法完全分离, 所以需要将 FD-1+FD-2 再用半制备条件 2 进行二次制备。

半制备色谱条件 1 色谱柱: Grace Allsphere ODS-2 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m, Alltech 公司, 美国); 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 674 nm; 流动相 A: 甲醇; B: 十六烷基三甲基溴化铵 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ + KH₂PO₄ 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 用 KOH 试液调 pH 值到 6.8, 梯度洗脱程序为 0~30 min, A 为 85%~94%, 流速为 2.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 进样量为 20 μ L。制备化合物 FD-1+FD-2、FD-3 和 FD-4。

半制备色谱条件 2 色谱柱: Grace Smart C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Alltech 公司, 美国); 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 674 nm; 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 十六烷基三甲基溴化铵 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ + KH₂PO₄ 0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 用 KOH 试液调 pH 值到 6.8; 梯度洗脱程序为 0~30 min, A 为 60%~65%, 流速为 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 进样量为 5 μ L。此条件下制备化合物 FD-1 和 FD-2。

对照品的制备-制备样品脱盐处理 采用两步分离的方法对制备出的样品进行脱盐处理, 首先采用 SPE C₁₈ 反相固相萃取小柱, 用水溶解样品、上样, 以大量的水洗脱缓冲盐和离子对试剂, 用甲醇洗脱样品; 然后, 将除盐不完全部分经过 Sepherdex LH-20 凝胶柱进一步进行分离, 以甲醇溶解并作为洗脱剂分离纯化 4 个单体, 得到 4 个异构体的纯品。

结果

1 方法学确证

1.1 标准曲线的绘制 精密吸取适量对照品 FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4 储备液, 用甲醇稀释, 使成为含 FD-1 0.001、0.02、0.1、0.5 和 2.0 mg·mL⁻¹; FD-2 0.001、0.02、0.1、0.5 和 2.0 mg·mL⁻¹; FD-3 0.001、0.01、0.1、0.5 和 1.0 mg·mL⁻¹; FD-4 0.004、0.04、0.1、0.8 和 1.6 mg·mL⁻¹ 的试液。分别精密吸取 5 μ L, 按上述方法测定, 以进样量 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制各对照品样品的标准曲线。FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4 的标准曲线分别为: $Y = 2\,640.5X - 35.9$, $r = 0.999\,9$ (0.005~10.0 μ g); $Y = 2359.1X - 16.4$, $r = 0.999\,5$ (0.005~10.0 μ g); $Y = 2147.5X - 68.9$, $r = 0.999\,9$ (0.005~5.0 μ g); $Y = 2382.0X - 16.5$, $r = 0.999\,6$ (0.02~8.0 μ g)。

1.2 最低检出限 精密吸取适量对照品 FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4 储备液, 用甲醇稀释, 按上述方法测定, 以基线噪音 3 倍计算, 最低检出限分别为 15、20、12 和 25 ng。

1.3 精密度 分别取 0.25 mg·mL⁻¹ 对照品溶液, 按上述方法, 进样 5 μ L, 连续进样 5 次, 以色谱峰面积计算, 其 FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4 精密度 (RSD) 分别为 0.12%、0.66%、0.99% 和 1.21%。

1.4 稳定性 分别取 4 个对照品的 0.25 mg·mL⁻¹ 甲醇溶液, 于制备后的 1、2、5、12 和 24 h 按上述方法, 各取 5 μ L 进样, 计算 FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4 的稳定性 RSD (以色谱峰面积计算) 分别为 0.25%、0.38%、0.90% 和 1.01%。

2 样品含量测定

精密称取待测样品, 加甲醇溶解使成 1.0 mg·mL⁻¹ 溶液。按上述方法取 5 μ L 进样, 以色谱峰峰面积归一化法计算 10 批“福大赛因”样品的含量及杂质的含量, 见表 1 和图 1。

研究中共测定了 10 个不同批次的样品, 含量测定结果显示, 以 4 个成分总和计算, 纯度均大于 95%。但 4 个有效成分比例不均为 1:1:1:1, 其 4 个成分比例在一定范围内波动。拟收集更多批次的样品并根据单一成分的药效学结果, 对 4 个异构体成分的含量比例进行限定, 列入质量标准。

本研究的主要研究对象“福大赛因”是二(磺酸钾基)二(邻苯二甲酰亚胺甲基)酞菁锌 ZnPcS2P2 光敏系列化合物中的一组, 这一系列化合物根据概

Table 1 Results of sample determination

Sample	Impurity amount/%	Content/%			
		FD-1	FD-2	FD-3	FD-4
8#	3.20	26.30	26.11	22.72	21.68
2#	2.98	26.43	25.96	22.83	21.82
2# Freeze-dry powder	4.64	25.54	26.27	23.72	19.83
080416	3.21	28.42	23.59	21.60	23.18
081008	3.07	26.17	28.65	27.08	15.04
080426	1.85	30.16	23.96	20.55	23.48
080403	3.52	27.26	24.47	23.66	21.09
0909	2.12	26.90	25.90	22.30	22.78
0910	2.39	26.84	26.12	23.88	20.77
0911	2.96	27.35	25.85	22.84	21.00

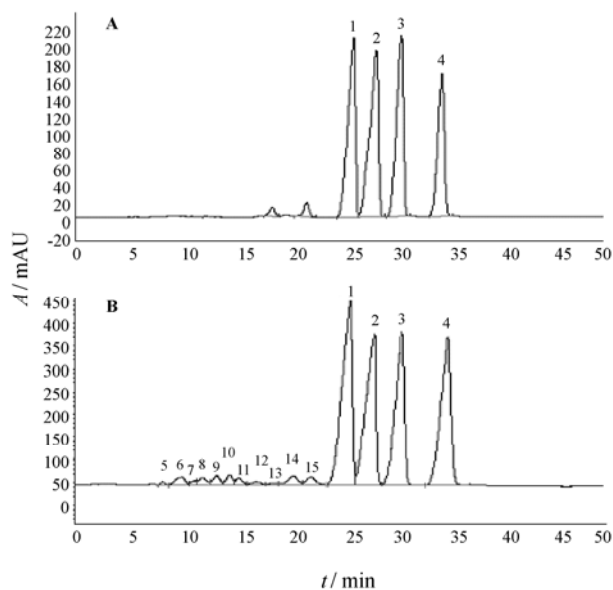


Figure 1 HPLC chromatograms. A: Phtotocyanine; B: Phtotocyanine and impurities (2# freeze-dry powder)

率推测合成产物可能存在异构体共有 15 种, 其中 5 种为反式异构体, 10 种为顺式异构体, “福大赛因”是截取了 10 种顺式异构体其中的 4 个作为一个新药进行申报的。本研究的主要对象为“福大赛因”, 故未对 15 种异构体均做研究, 但通过测定纯度较低的样品时发现, 其主要杂质峰的保留时间均在 4 个主成分峰之前。通过在线 DAD 检测, 杂质峰的紫外吸收与主成分峰的紫外吸收一致。根据合成工艺推测, 杂质主要成分为“福大赛因”的同分异构体^[6]。

3 异构体结构鉴定

“福大赛因”是包含 4 个异构体的混合物, 其主体结构是 ZnPcS2P2 型顺式 β 位四取代酞菁金属配合物^[7]。根据合成工艺确定“福大赛因”中 4 个异构体是取代基均按照 SSPP 排列, 且 S 基 (磺酸钾) 位置

相同, P 基 (邻苯二甲酰亚胺甲基) 位置不同。

本研究首次将“福大赛因”经 HPLC 分离, 得到 4 个异构体 (FD-1、FD-2、FD-3 和 FD-4) 的纯品。通过测定 4 个样品的 ^1H NMR 谱、gCOSY 和 NOE1D 谱, 首先确定这 4 个化合物的主体结构均与 ZnPcS2P2 型顺式 β 位四取代酞菁金属配合物相同, 且 S 基团位置相对固定, 均位于 6, 5'' 位, P 基团位置不同。然后根据由 P 基团连接位置不同引起的 NMR 图谱化学位移及峰形裂分的变化, 推导指认 4 个样品对应的化合物结构, 结构见图 2。

首先根据 ^1H NMR 谱中 h 位氢信号区分 P 基团是否处于对称结构。当化合物分子中的两个 P 基团处于对称位置上时, 即 P 均在异吡啶环的 5 位或均在异吡啶环的 6 位时, h 位的两个氢由于所处化学环境很相似, 所以为单峰且化学位移相差较小。当两个 P 基团处于不对称位置上时, 即两个 P 基团分别在异吡啶环的 5 位和 6 位时, h 位的两个氢由于所处化学环境相差较大, 表现为单峰但化学位移相差较大。当两个 P 基团处于对称位置时, g 位的氢信号为明显的双峰, 当两个 P 基团不对称时, g 位氢信号变为宽单峰或变成三重峰。这样根据 ^1H NMR 谱可明显的把 4 个化合物分为两组, 即 P 基团为对称结构: FD-1 和 FD-2;

P 基团非对称结构 FD-3 和 FD-4。

FD-1 和 FD-2 同为 P 基团对称结构, h 位氢所处环境相同, 化学位移相差不大。但 g 位的氢处于 ABX 系统当中, 受到邻对位的氢的影响, 而呈现明显的双峰, 由于位置不同, 所以受到 S 基团强吸电子基团的作用不同, FD-1 的 g 位的氢在环外侧, 受到 S 吸电子作用明显, 化学位移向低场移动; FD-2 的 g 位的氢在环内侧, 很难受到 S 基团吸电子的作用, 化学位移向高场移动。

FD-3 和 FD-4 可根据 h 位氢判断为 P 基团处于不对称位置上。FD-3 上方的 g 离 S 基团稍近, 受到 S 基团的吸电子作用影响稍强, H 谱裂分为两个峰 δ 9.36, 9.39, 而 FD-4 两个 g 所处化学环境更相近, g 重合成一个 t 峰 δ 9.34。

讨论

在“福大赛因”注射剂原质量标准中, 由于 4 个同分异构体难拆分, 所以采取了 4 个成分总含量为质量控制标准。本研究在比较了正相及反相色谱系统、不同种类型号的色谱柱、不同组成及比例的流动相系统后, 确定了该色谱条件。在此条件下, 4 个异构体成分得到了很好的分离。

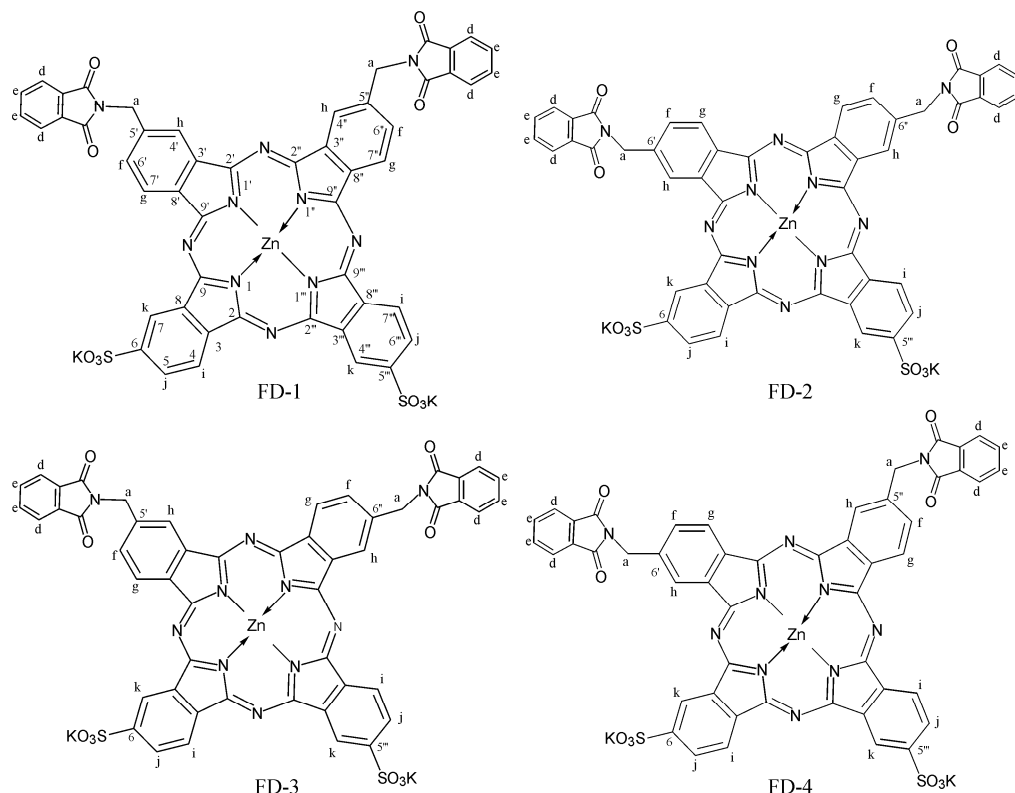


Figure 2 Structures of the four isomers of Photocyanine

研究中采用薄层直接显色法检测离子对试剂的残留,以不同浓度的离子对试剂甲醇溶液溶解配制含“福大赛因”样品 ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),用 $10 \mu\text{L}$ 手动进样器定量点样 $5 \mu\text{L}$,用碘化铊钾试液直接对点样点显色,得到一系列颜色深浅不同的斑点,肉眼观测能区别出的离子对试剂的最低检测浓度为 $0.001 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,相当于样品中离子对试剂含量 0.1% ,即离子对试剂最低检出量 $5 \mu\text{g}$ 。故将此方法做为样品中离子对试剂残留量限度检查法。

本研究首次分离了癌症治疗用光敏剂“福大赛因”中4个结构相近、性质相似的同分异构体主成分,并对其进行了结构鉴定及分析方法学的研究,为完善此类新药的质量控制标准提供了依据。

致谢: 感谢毋艳、林生和岳正刚在“福大赛因”结构解析中给予的帮助。

References

- [1] World Health Organization. The world health organization's fight against cancer: strategies that prevent, cure and care [R]. Switzerland: WHO, 2007.
- [2] Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 380–387.
- [3] Huang JL, Chen NS, Liu ES, et al. Preparation of phthalocyanine zinc and its application as anticancer drug: CN, 96117137.5 [P]. 2000-06-28.
- [4] Huang JL, Chen NS, Wang JD, et al. A novel synthetic strategy of metal phthalocyanine complex: CN, 200410013492.4 [P]. 2006-05-24.
- [5] Wang J, Liu H, Xue JP, et al. The constitutes and isomer distribution of di-(potassium sulfonate)-di-phthalimidomethyl phthalocyanine zinc [J]. Chin Sci Bull (科学通报), 2008, 53: 513–519.
- [6] Jiang Z, He WY, Wang J, et al. Identification of sulfonic phthalocyaninatozinc isomers [J]. Chem Lett, 2009, 38: 52–53.
- [7] Liu H, Tan SJ, Wang J, et al. Determination of suftalan zinc and its related substances by RP-HPLC assays [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志) 2009, 44: 59–62.

《药化学报》系列网络英文刊将在 2011 年正式出版

《药化学报》系列网络英文刊经过多年酝酿、近两年的准备 (见药化学报网站 www.yxxb.com.cn 英文网刊) 近日与荷兰 Elseviers 出版公司达成合作出版协议, 拟于 2011 年正式出版。出版周期为双月刊。论文将在 Elseviers 期刊数据库 ScienceDirect 平台以 OA 方式刊出, 便于广大读者免费阅读和下载。

《药化学报》系列网络英文刊是《药化学报》中文刊的延伸, 集中报道国内外药化学领域最新研究进展和成果, 其内容和形式与《药化学报》中文刊一致。栏目包括综述、研究论文和研究快报, 专业涉及药理、药物化学、天然药物化学、药物分析、药剂及生药等药化学学科。目前投稿方式和论文格式同《药化学报》中文刊, 但不收审稿费、版面费, 也不支付稿费。

欢迎国内外药化学研究工作者积极投稿。

《药化学报》编辑部

2010 年 10 月