

# 创新药物二乙基射干昔元的杂质研究

袁崇均,陈 维,陈 帅\*,罗 森,罗 恒,余梦瑶,王 笏

四川省中医药科学院,成都 610041

**摘要:**对抗病毒新药 MJJ 原料药中杂质进行研究。利用液-质联用技术检测杂质的结构,结合文献推测杂质来源。利用碱破坏 MJJ 制备杂质,并通过 NMR 等光谱技术确定结构。利用杂质反向合成 MJJ,合成的杂质可作为 MJJ 质量控制的杂质对照品。生物活性测试结果表明,该杂质具有一定的抗肿瘤活性。该方法新颖,为原料药的杂质研究提供了良好的思路,并为创新药物 MJJ 的有关物质及质量控制等研究提供了有意义的试验数据和参考依据。

**关键词:**二乙基射干昔元;MJJ;杂质;LC-MS;质量检测

中图分类号:R285;069

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.019

## Study on Impurity of Innovative Drug Diethyl Tectoridingenin

YUAN Chong-jun, CHEN Chu, CHEN Shuai\*, LUO Sen, LUO Hen, YU Meng-yao, WANG Jia

Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China

**Abstract:** The main impurity of the new antiviral drug candidate MJJ was studied. The structure was elucidated by LC-MS and comparison with literature data. Impurity was prepared by alkali-destroying MJJ and its structure was determined by NMR spectroscopy. The synthesized impurity was used as reference compound in quality control of MJJ. The result of biological activity test showed that the impurity had certain antitumor activity. It was believed that this is a new strategy for related substances in bulk drug, and the experimental data were valuable for the determination of the impurity and quality control of MJJ.

**Key words:** diethyl tectoridingenin; MJJ; impurity; LC-MS; quality control

二乙基射干昔元(Diethyl tectoridingenin, 商品名 MJJ)的化学名为5-羟基-6-甲氧基-7,4'-二乙氧基异黄酮,是对中药川射干 *Iris tectorum* Maxim. 中主要有效成分射干昔元进行结构修饰而得到的新型抗病毒药物<sup>[1-3]</sup>,为创新候选药物,其有较强的抗柯萨奇病毒作用,用于治疗由柯萨奇病毒感染引起的心肌炎、小儿肺炎或无细菌性脑膜炎等,已获国家发明专利,为我院具有自主知识产权的抗病毒新药。

在对 MJJ 的有关物质检查试验中发现, MJJ 原料药中主要存在一个含量较高(1%左右)的杂质(其余均在 0.1%以下),超出了人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)准则<sup>[4]</sup>及我国 2005 年颁布的《化学药物杂质研究的技术指导原则》<sup>[5]</sup>规定的杂质鉴定限度。为了有效控制药物的质量,完善创新药物的有关物质检查,确保其安全性和有效性,特

对该杂质进行了研究。首先对该杂质进行 LC-MS 分析,初步推测其结构为 2,6-二羟基-3-甲氧基-4,4'-二乙氧基脱氧安息香;结合 MJJ 合成的过程和参考有关文献<sup>[6]</sup>,推测该杂质为 MJJ 在强碱(NaOH)作用下的降解产物;利用该降解反应成功地制备了该杂质,并进行了 NMR 光谱测定以确定其结构,并由该杂质参照文献方法合成了 MJJ,该杂质为一新化合物,未见文献报道。初步体外生物活性筛选结果表明,该杂质具有一定的抗肿瘤活性。

## 1 仪器与试剂

美国 Agilent RRLC-6410 triple quadrupole 液质联用仪,使用 MassHunter 软件控制系统及数据处理,直接进样。NMR 光谱测定用 Bruker AV II-400 MHz 核磁共振波谱仪;MS 测定用 TSQ 液质联用仪;含量测定用美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪(DAD 检测器);CPA225D 型电子天平(德国赛多利斯),KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),二乙基射干昔元(MJJ)原料药(自制,纯

收稿日期:2017-08-02 接受日期:2017-10-09

基金项目:科技部重大专项“十一五”重大新药创制项目(2009ZX09102-153);四川省应用基础计划(2016JY0009)

\*通信作者 Tel:86-28-85237395;E-mail:csdctcm@126.com

度 98.23%, 批号 20140501)。

## 2 方法与结果

### 2.1 MJJ 原料药 LC-MS 检测

#### 2.1.1 溶液的制备

精密称取 5 mg MJJ 原料药置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容, 摇匀, 作为供试品溶液。

#### 2.1.2 检测条件

色谱柱: 安捷伦 C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈-水 (10 mM 乙酸胺) (25: 75); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 °C, 进样量: 10 μL。离子源: ESI (+), 喷雾电压 4 000 V, 源温度为 100 °C; 雾化气为氮气, 雾化压力为 40 psi; 去溶剂气为氮气, 温度 350 °C, 流速为 10 L/min; 碰撞气为高纯氮气, 压力为 0.1 MPa; 采用全扫描模式对药物检测。

#### 2.1.3 检测结果

MJJ 原料药 LC-MS 检测结果见图 1、图 2。

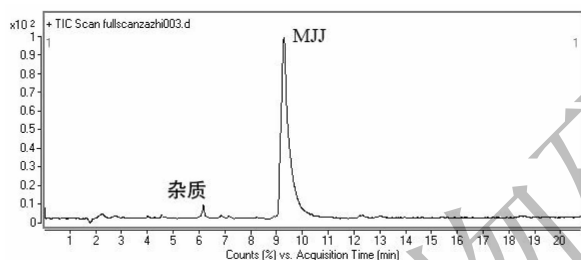


图 1 MJJ 原料药 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of MJJ

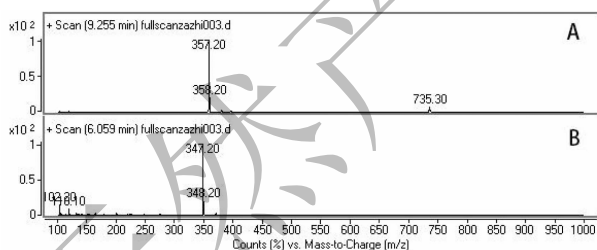


图 2 MJJ (A) 及杂质 (B) 质谱图

Fig. 2 Mass spectra of MJJ (A) and impurity (B)

### 2.2 杂质结构及来源推测

#### 2.2.1 HPLC-MS 杂质结构推测

HPLC 图谱中, 保留时间为 9.255 min 的峰为原料药二乙基射干昔元 (MJJ) 峰, 其 MS 为 357, 为二乙基射干昔元 ( $m/z$  356) 的  $[M + H]^+$  峰; 而保留时间为 6.059 min 的峰为杂质峰,  $m/z$  347  $[M + H]^+$ , 分子量比 MJJ 少 10, 推测其少了一个碳原子, 并少一个环。参考文献<sup>[6]</sup>推测其结构为 2,6-二羟基-3-

甲氧基-4,4'-二乙氧基脱氧安息香, 结构式见图 3, 分子量为 346, 故  $m/z$  347 为该化合物  $[M + H]^+$  峰。

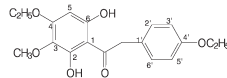


图 3 杂质化学结构

Fig. 3 Chemical structure of impurity

#### 2.2.2 杂质来源推测

参考文献<sup>[6]</sup>及 MJJ 的合成过程, 可以推测杂质来源为 MJJ 在强碱性 (NaOH) 条件下的降解, 即杂质为 MJJ 的降解产物。

### 2.3 杂质的制备及结构鉴定

取 MJJ 原料药 10 g 于圆底烧瓶中, 加 5% NaOH 水溶液 20 mL, 于水浴加热 2 h, 取出, 用盐酸调 pH 至酸性, 加水搅拌放冷, 析出沉淀, 过滤, 水洗沉淀至流出液 pH 近中性, 得淡黄色粉末, 用无水乙醇重结晶, 过滤, 60 °C 减压干燥, 得 MJJ 杂质, 即 2,6-二羟基-3-甲氧基-4,4'-二乙氧基脱氧安息香 8 g, 收率 82%。

本品为淡黄色结晶性粉末 (无水乙醇); mp. 137 ~ 138 °C; UV (无水乙醇)  $\lambda_{\max}$  nm: 288; IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 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  $[M + H]^+$ ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 13.32 (1H, s, 6-OH), 6.87 (1H, s, 2-OH), 6.03 (1H, s, H-5), 4.36 (2H, s, -CH<sub>2</sub>-), 7.17 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-2', H-6'), 6.86 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3', H-5'), 3.86 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4.02 (2H, q, 4'-CH<sub>2</sub>), 4.10 (2H, q, 4-CH<sub>2</sub>), 1.40 (3H, t, 4'-CH<sub>3</sub>), 1.47 (3H, t, 4-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 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'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.8, 64.4 (4-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。鉴定此化合物为: 2,6-二羟基-3-甲氧基-4,4'-二乙氧基脱氧安息香。

### 2.4 由杂质反向合成 MJJ

参照文献<sup>[6]</sup>, 取 MJJ 杂质 2,6-二羟基-3-甲氧基-4,4'-二乙氧基脱氧安息香 1.0 g, 溶于吡啶-六氢吡啶 (1:1) 溶液 10 mL 中加热, 滴加原甲酸三乙酯 2 mL, 回流 5 h, 倾入 50 mL 水中, 析出沉淀, 过滤, 水洗, 60 °C 减压干燥, 得淡黄色无定性粉末 1.0 g, 氯仿重结晶, 即得 MJJ 0.6 g (淡黄色结晶性粉末), 收

率 58%。经 UV、IR、 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 测定,其与文献报道<sup>[2]</sup>一致,故鉴定为 MJJ,即 5-羟基-6-甲氧基-7,4'-二乙氧基异黄酮,亦即二乙基射干昔元。

由 MJJ 制备杂质和由杂质合成 MJJ 路线图,见图 4。

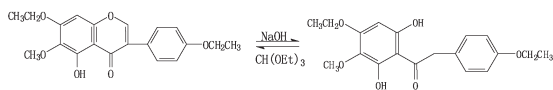


图 4 MJJ 制备杂质和由杂质合成 MJJ 路线图

Fig. 4 MJJ route for preparation of impurity and synthesis of MJJ from impurity

## 2.5 杂质的纯度分析

色谱柱:Kromasil  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈-水(63:37),检测波长 288 nm,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,流速 1 mL/min,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。在上述

色谱条件下,该杂质的保留时间为 6.503 min,纯度为 99.52%。进一步验证了合成方法的合理性和可靠性。

## 2.6 杂质的生物活性筛选

分别取对数期的人结肠癌细胞株 HCT116、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人肺癌细胞株 A549、人胃癌细胞株 SGC7901、人卵巢腺癌细胞株 SK-ov-3,用胰酶消化,吹散,制备细胞混悬液,显微计数,调整细胞浓度,按  $6 \times 10^3$  个/孔接种到 96 孔板,在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。药物处理组中加入梯度稀释的各化合物,同时设置空白对照组和射干昔元对照组,每个浓度做 3 个重复,放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h,试验结束前 4 h,将 96 孔板里的培养液吸出,加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液和 10  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。加 100  $\mu\text{L}$  10% SDS 溶液。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。测定  $\text{OD}_{570}$ ,计算  $\text{IC}_{50}$ 。结果见表 1。

表 1 杂质对多种人癌细胞的体外抗肿瘤活性

Table 1 Antitumor activity of impurity in a variety of human cancer cells *in vitro*

组别 Group	$\text{IC}_{50}$ (mg/L)				
	HCT116	MCF-7	A549	SGC7901	SK-ov-3
射干昔元 Tectorigenin	60	55	60	64	76
MJJ	154	167	108	125	149
杂质 Impurity	41	36	28	45	55

结果表明,杂质对 HCT116、MCF-7、A549、SGC7901、SK-ov-3 细胞株显示出一定的活性,作用大于射干昔元和 MJJ。

## 3 讨论与结论

利用硅胶干柱层析对 MJJ 原料药杂质进行分离,无水乙醇重结晶,得到该杂质。通过 HPLC 纯度检查,该杂质纯度  $> 98\%$ 。与合成的该杂质按 2.5 项下进行 HPLC 分析,二者保留时间一致,并进行了质谱测定,结果二者质谱数据基本一致。故原料药中的杂质与合成的杂质为同一化合物。由 MJJ 制备杂质、由杂质反向合成 MJJ。杂质的化学结构经 NMR、MS 确证,其纯度由 HPLC 验证,故合成的杂质可作为 MJJ 质量控制的杂质对照品。研究杂质的目的是为新药质量研究服务,了解了该杂质的来源,在合成 MJJ 过程中,反应时间很重要,反应完成后应立即用酸中和反应液以免产生更多的杂质。获得大量杂质,测定其理化常数,本杂质在无水乙醇中的溶解度为 1:10,而 MJJ 为 1:100,利用此性质,在精制 MJJ(重结晶)时,采用在热的氯仿饱和溶液中加入反溶剂无水乙醇的方法以除去该杂质。

## 参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 41-42.
- Xu XM (徐学民), Yuan CJ (袁崇均), Wang J (王箭), et al. An isoflavone derivative and preparation method and use (一种异黄酮衍生物及其制备方法和用途) [P]. ZL200910308146. 1, 2012. 02. 22.
- Yuan CJ (袁崇均), Wang J (王箭), Chen S (陈帅), et al. Study on the chemical constituents of *Iris tectorum* Maxim [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20: 444-446.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [C]. Impurities in New Drug Substances, Q3A. 2006.
- Guidance for impurities in chemical drug substances. CPH3-1[S]. Center for Drug Evaluation, 2005.
- Yu YG (余亚纲), Wang CH (汪聪慧), Liu D (刘岱), et al. Studies on fat-soluble constituents from *Belamcanda chinensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1983, 18: 969-972.