

阿可拉定的有关物质研究

单 淇¹, 周渭渭^{1,2}, 周福军¹, 侯文彬^{1*}

1. 天津药物研究院 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193

2. 广西中医学院, 广西 南宁 530001

摘要: **目的** 分离纯化阿可拉定(淫羊藿苷, IC-162)的主要有关物质, 进行结构确证。**方法** 利用反相硅胶和凝胶柱色谱分离阿可拉定中的2个主要杂质, 经化合物谱图数据(LC-DAD、LC-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR)鉴定其结构。**结果** 阿可拉定中2个主要杂质分别为8-异戊烯基山柰酚和朝藿素B。**结论** 阿可拉定有关物质的定量和定性研究可以为制定合理的杂质限度提供依据。

关键词: 阿可拉定; 淫羊藿苷; 有关物质; 杂质; 8-异戊烯基山柰酚; 朝藿素B

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2011)02-0092-04

Study on related substances of icraiin

SHAN Qi¹, ZHOU Wei-wei^{1,2}, ZHOU Fu-jun¹, HOU Wen-bin¹

1. Tianjin Engineering Laboratory of Quality Control Techniques for TCM, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China

Abstract: **Objective** To purify and identify the main related substances of icraiin (IC-162). **Methods** Two main impurities were isolated from IC-162 with reverse phase silica gel and Sephadex LH-20. The structural characteristics of impurities were determined by spectral methods, such as LC-DAD, LC-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. **Results** The structures of two impurities were identified as 8-isopentenyl kaempferol and epimedokoreanin B. **Conclusion** With the quantitative and qualitative studies, the related impurities will be controlled in the reasonable limit.

Key words: icraiin; IC-162; related substances; impurity; 8-isopentenyl kaempferol; epimedokoreanin B

有关物质研究一直是药学研究和评价中的重点和难点。随着对质量控制认识的不断深入、药品质量控制理念的不断提升以及临床应用中安全性、有效性的新变化, 对有关物质研究的要求也在不断提高。有关物质的研究主要体现在定量和定性2个层面。一方面, 定量分析方法直接关系到对药物杂质把握的准确性, 有关物质的微量性和复杂性, 使得检测方法的专属性和灵敏度十分关键, 需要从化合物结构特征、理化性质、剂型特征、工艺过程等方面考虑。国际前沿的杂质研究采用多样化的色谱条件和检测手段(HPLC-UV/ECD/ELSD/RID)能够有效控制不同类型杂质, 以实现全面检出、有效分离、目标明确和准确定量^[1]; 另一方面, 由于有关物质通常与活性成分在化学结构上相似或具渊源关系, 故而了解有关物质的定性信息、推测其可能的结构,

有助于分析其形成原因和过程, 在药品制备过程中可设法避免该杂质的形成, 或经纯化使之降至可接受的水平。另外, 还可通过检索毒性物质数据库获知该杂质的毒性数据, 为其限度的确定提供有力的依据。有关物质的定性研究也是定量分析的重要参考, 对贮藏条件的确定也有指导意义^[2]。

一类新药阿可拉定(淫羊藿苷, IC-162)是一种具有乳腺癌靶向治疗作用的黄酮类化合物, 目前处于临床研究阶段。由于从药材制备原料药到相关制剂, 再经贮藏、运输、使用, 要经历一段较为复杂和漫长的过程, 在此期间, 每一过程都有可能产生有关的物质。为保证药物的安全有效, 同时也考虑到生产实际情况、国内外对药物的研究, 一般可允许含有一定量的无害或低毒性的有关物质, 但对毒性较大, 能危害人体健康的、无效的或能影响药

收稿日期: 2010-08-10

*通讯作者 侯文彬(1969—), 男, 研究员, 硕士生导师。研究方向: 中药及天然产物的研究与开发。Tel: (022)23006295 E-mail: houwb@tjpr.com

物稳定性的有关物质则必须严格控制。因此,本研究按照 ICH Q3A/Q3B 指导原则以及 2005 年 SFDA《化学药物杂质研究技术指导原则》的要求,对阿可拉定中的 2 个主要杂质进行定量,分离纯化制备单体并鉴定其结构,从而为制定阿可拉定有关物质的合理限度提供依据。

2 材料和方法

2.1 仪器与试剂

淫羊藿苷粗品、阿可拉定原料药(自制); Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB); ODS C₁₈ Gel (YMC Co., Ltd.); Agilent 1100 HPLC 系统; Thermo Finnigan LCQ Advantage Max HPLC-MS 系统; Bruker AV400 NMR。

2.2 阿可拉定有关物质的定量检测

参考《中国药典》2010 版中阿可拉定前体淫羊藿苷定量测定的液相条件,为改善峰型和分离度,以磷酸水代替水,以甲醇-四氢呋喃系统代替乙腈,摸索出阿可拉定有关物质的 HPLC 测定条件: C₁₈ 反相填料的色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-四氢呋喃-0.1%磷酸水(35:26:39)为流动相;检测波长 373 nm;体积流量 1 mL/min,柱温 35℃。

2.3 酶解处理

取淫羊藿苷粗品 10 g,加入 100 mL 水,加入适量的 β-糖苷酶,进行酶解反应。反应 24 h 后,取酶解液进行 HPLC 分析。

2.4 阿可拉定主要杂质的分离纯化

以反相柱色谱法进行杂质分离,取上述酶解液浓缩蒸干,加入适量甲醇使其完全溶解,以 C₁₈ 硅胶拌样,自然晾干。C₁₈ 硅胶柱色谱,以水-甲醇梯度洗脱,采用 HPLC 对各洗脱部位进行跟踪检测。65%甲醇洗脱部分合并含有杂质 a 的组分,进行反复 Sephadex LH-20 柱色谱分离,甲醇洗脱,得到杂质 a。70%甲醇洗脱部分合并含有杂质 b 的组分,进行反复 Sephadex LH-20 柱色谱分离,甲醇洗脱,得到杂质 b。

3 结果

3.1 阿可拉定有关物质的来源分析

阿可拉定原料药的质量研究表明,采用甲醇-四氢呋喃-0.1%磷酸水(35:26:39)系统检出的杂质数量最多、量最高,共 7 个杂质,其中杂质 a 和杂质 b 的量>0.1%,杂质之间、杂质与主峰间达到基线分离(分离度>1.5),见图 1-A。

HPLC 图谱显示,淫羊藿苷粗品中含有杂质 a

和 b(图 1-B),经酶解处理后(图 1-C),杂质 a 和 b 的量都显著增加(表 1)。

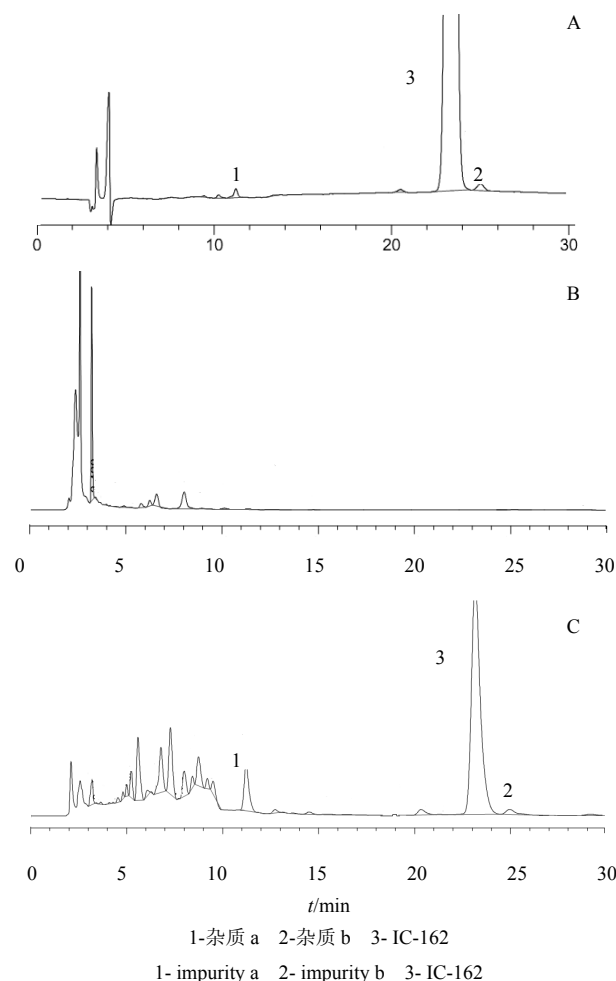


图 1 阿可拉定原料药有关物质(A)、淫羊藿苷酶解前(B)、淫羊藿苷酶解后(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of related substances of IC-162 pharmaceutical products (A), icraiin before enzymolysis (B), and icraiin after enzymolysis (C)

表 1 酶解处理前后杂质 a 和杂质 b 的量

Table 1 Contents comparison of impurity a and b before and after enzyme

处 理	杂质 a/%	杂质 b/%
酶解前	1.69	0.91
酶解后	6.25	1.32

3.2 阿可拉定杂质的提取分离与纯化

考虑到杂质 a 和杂质 b 在酶解产物中的量较高,拟对其进行分离纯化,以进行结构分析。根据 RP-HPLC 中的出峰顺序,选择反相柱色谱法进行杂质分离。取上述酶解产物,加入适量甲醇使其完全

溶解, 适量 C_{18} 硅胶拌样, 自然晾干。 C_{18} 硅胶柱色谱分离, 以水-甲醇梯度洗脱, 采用 HPLC 对各部位进行跟踪检测。65% 甲醇洗脱部分合并含有杂质 a 的组分, 进行反复 Sephadex LH-20 柱色谱分离, 甲醇洗脱, 得到杂质 a。70% 甲醇洗脱部分合并含有杂质 b 的组分, 进行反复 Sephadex LH-20 柱色谱, 甲醇洗脱, 得到杂质 b。

3.3 结构确证

杂质 a, 黄色粉末, 正离子 ESI-MS (m/z): 355 $[M+H]^+$, 推断该化合物的相对分子质量为 354, 结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR, 确定杂质 a 的分子式 $C_{20}H_{18}O_6$ 。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 8.02 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2',6'), 6.91 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3',5'), 6.27 (1H, s, H-6), 5.17 (1H, m, H-2''), 3.41 (2H, d, $J=6.4$ Hz, H-1''), 1.73 (3H, s, H-5''), 1.61 (3H, s, H-4'')。 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 146.5 (C-2), 135.6 (C-3), 176.1 (C-4), 158.3 (C-5), 98.0 (C-6), 162.1 (C-7), 105.6 (C-8), 153.5 (C-9), 102.7 (C-10), 122.1 (C-1'), 129.3 (C-2',6'), 115.5 (C-3',5'), 159.2 (C-4'), 21.3 (C-1''), 122.8 (C-2''), 130.8 (C-3''), 25.5 (C-4''), 17.8 (C-5'')。 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献对照^[3], 鉴定本品为 8-异戊烯基山柰酚 (8-isopentenyl kaempferol), 结构见图 2。

杂质 b, 黄色粉末, 正离子 ESI-MS (m/z): 423 $[M+H]^+$, 推断该化合物的相对分子质量为 422, 进一步结合 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR, 确定杂质 b 的分子式 $C_{25}H_{26}O_6$ 。 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.29 (2H, s, H-6'), 7.26 (2H, s, H-2'), 6.56 (1H, s, H-3), 6.25 (1H, s, H-6), 5.30 (1H, m, H-2''), 5.23 (1H, m, H-2'''), 3.43 (2H, d, $J=7.2$ Hz, H-1''), 3.26 (2H, d, $J=6.8$ Hz, H-1'''), 1.73 (3H, s, H-4''), 1.68 (6H, s, H-4''', 5'''), 1.60 (3H, s, H-5'')。 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 164.0 (C-2), 106.1 (C-3), 181.7 (C-4), 159.0 (C-5), 98.4 (C-6), 159.0 (C-7), 106.1 (C-8), 154.3 (C-9), 103.3 (C-10), 122.3 (C-1'), 110.4 (C-2'), 147.4 (C-3',4'), 128.6 (C-5'), 118.8 (C-6'), 21.3 (C-1''), 118.8 (C-2''), 131.8 (C-3''), 25.4 (C-4''), 17.5 (C-5''), 28.1 (C-1'''), 122.3 (C-2'''), 131.0 (C-3'''), 25.4 (C-4'''), 17.7 (C-5''')。本品的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献对照^[4], 鉴定本品为 5, 7, 3', 4'-四羟基-8, 5'-二异戊烯基黄酮, 即朝藿素 B (epimedokoreanin B), 结构

见图 2。

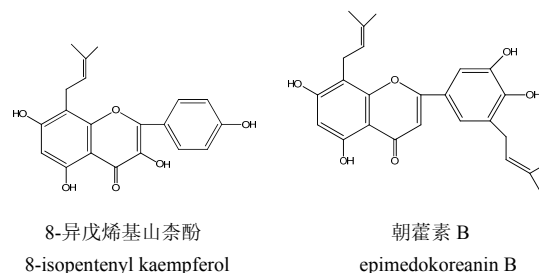


图 2 杂质 a 和杂质 b 的结构

Fig. 2 Structures of impurities a and b

4 讨论

对于中药或天然药物新药, 其有关物质的来源与药材本身和生产工艺都有直接的联系, 由于药材成分的复杂性和药材植物种群间的化学成分多样性, 在天然药物质量研究过程中, 杂质定性很难像合成药物一样, 可以通过理论推导对杂质的类型有一个初步了解。如果破坏降解实验所得降解产物与其产品中的杂质不一致 (如阿可拉定), 就需要借助间接测定法获得杂质的部分信息。本研究中, 在得到杂质纯品之前, 利用液质 LC-MS 联用技术获得各个杂质的相对分子质量, 为最终采用直接测定法确定有关物质结构提供了有用的信息。

尽管与合成药物相比, 要获得天然药物的有关物质纯品难度较大, 尤其是像阿可拉定这样有关物质的量较低且性质接近时, 杂质的分离纯化困难更大, 不易获得充足的样品进行测定。为此, 本研究通过酶解刻意增加主要杂质的量, 获得尽可能多的杂质进行下一步的研究工作。

从杂质来源分析, 很多时候完全除去药品中的杂质几乎不可能, 而且有时也没有必要, 在不影响药物疗效和不发生与杂质相关的不良反应前提下, 通过系统全面的研究, 将杂质控制在安全合理的限度内正是杂质研究的最终目的^[5]。由于已完成的临床前安全性评价未发现当前工艺制备的阿可拉定样品有明显的毒性, 参照 ICH Q3B (R), 将阿可拉定中的单一非特定杂质的定量限度规定为 0.1%; 已鉴定出的有关物质 8-异戊烯基山柰酚和朝藿素 B 由于缺少已报道的毒理学数据, 可以通过进一步安全性评价, 适当的放宽杂质限度。

创新药的研究是一个逐渐认知的过程, 其间可能会经历处方工艺的调整、分析方法的优化等变化, 因此对于有关物质的研究和认识是一个不断积累的过程。本研究所探讨阿可拉定有关物质定量和定性

研究可能并不完善,但其思路和方法,能够为更深入进行阿可拉定及其类似的中药或天然药物的有关物质研究提供借鉴和参考。

参考文献

- [1] 张哲峰. 药物杂质研究中风险控制的几个关键问题[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(5): 327-333.
- [2] 张震, 陈海峰. 化学药品新药研究中的有关物质定

性研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(19): 1721-1723.

- [3] 孙朋悦, 徐颖, 文晔, 等. 朝鲜淫羊藿的化学成分(I)[J]. 中国药物化学杂志, 1998, 8(2): 122-125.
- [4] 王婷, 张大威, 张金超, 等. 淫羊藿黄酮的分离鉴定及其对前破骨细胞株增殖的影响[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1458-1462.
- [5] 张宁, 于红. 化学药品杂质研究思路探析[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(23): 2074-2077.

首届中国药物毒理学会年会(2011年)暨国际药物非临床安全性评价研究论坛 (第一轮通知)

为加强国内外药物毒理学研究的学术交流,提高我国药物安全性评价研究的水平,减少新药临床试验的风险,促进创新药物的研发,中国毒理学会药物毒理与安全性评价专业委员会、中国药学会药物安全评价研究专业委员会、中国药理学会药物毒理专业委员会共同决定于2011年10月下旬在上海市联合召开首届中国药物毒理学会年会(2011年)暨国际药物非临床安全性评价研究论坛。本次会议与论坛由上海药理学会毒理专业委员会等单位承办。

1、会议主题

本次会议主题为药物安全性评价研究中 case by case 原则的应用。会议的主要内容包括交流国内外药物毒理学研究的最新进展,围绕 case by case 的原则,介绍生物药、化学药和中药非临床安全性评价的特点,阐述药物安全药理学、一般毒理学、毒代动力学、免疫药理学、生殖与遗传毒理学等研究的特点,介绍近几年药物毒理学研究的新技术和新方法、生物标记物、毒性病理学进展和新制订的安全性评价技术指导原则等。

2、会议的主要安排

本次会议分大会报告和分会场报告两种形式,会议将邀请国内外知名的药物毒理学专家、新药研发管理人员和药企研发代表针对药物毒理学的发展趋势和前沿动向做学术报告。

分会场报告内容包括安全药理学与毒性病理学、一般毒理学与毒代动力学、生殖与遗传毒理学等。报告内容从投稿的稿件中择优录用。

3、征文要求

凡未公开发表、具备科学性、创新性和实用性、与会议交流议题相关的研究内容或有参考价值的综述均可投稿。具体领域如下:(1)药物一般毒理学;(2)药物生殖毒理学;(3)药物遗传毒理学;(4)药物免疫毒理学;(5)药物靶器官毒理学;(6)药物分子毒理学;(7)毒性病理;(8)发现毒理学;(9)新药安全性评价的技术指导原则和注册办法中有关毒理学问题;(10)计算毒理学;(11)其他药物毒理学相关的新技术和新方法内容。会议期间将同时进行青年优秀论文评选活动,热诚欢迎40周岁以下(1970年12月31日以前出生)青年学者积极参与投稿。

征文请注明姓名、单位、通讯地址、邮编、电话及E-mail地址。愿意参加青年优秀论文评选活动的作者,请在论文上方,或邮件中注明。经大会学术委员会相关专家对论文摘要初评,入选者参加分会场报告。入选通知待初审后另发。征文截稿日期:2011年6月1日。请按以下网址在线投稿:www.drug-toxicology-china.net。

4、大会注册

请直接在线注册(www.drug-toxicology-china.net),也可下载报名表填写后以邮寄、传真或电子邮件发回。

会议注册费1500元,在读学生注册费800元。注册费用包括会务费、资料费、讲课费、培训证书等费用,报到时交纳注册费。学生报到时需提供有效学生证件。

5、大会会务组联系方式

通讯地址:上海翔殷路800号第二军医大学药物安全性评价中心 邮编:200433
联系人:袁伯俊,联系电话:021-81871036,传真:021-81871036,邮箱:Ybj74386@yahoo.com.cn
吕秋军,联系电话:010-64392995,传真:010-64392557,邮箱:luqj66@yahoo.com.cn
陆国才,联系电话:021-81871032,传真:021-81871032,邮箱:newdrug@smmu.edu.cn

中国毒理学会药物毒理与安全性评价专业委员会
中国药理学会药物毒理专业委员会
中国药学会药物安全评价研究专业委员会