

消旋山莨菪碱的杂质研究

王雄飞, 孙毅坤, 钟 苗, 段晓杰, 罗世林, 杨雨薇, 袁瑞娟*

北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

摘 要: 目的 鉴定消旋山莨菪碱未知杂质。方法 采用多种色谱、光谱方法联合对消旋山莨菪碱中的未知杂质进行分析, 确定未知杂质结构。结果 消旋山莨菪碱在存储过程中因水解而产生杂质, 经过高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用技术、薄层色谱法和核磁共振技术鉴定, 杂质为 6 β -羟基托品和托品酸。结论 消旋山莨菪碱中的杂质为水解产物 6 β -羟基托品和托品酸, 应对这两种杂质进行质量控制。

关键词: 消旋山莨菪碱; 杂质; 6 β -羟基托品; 托品酸

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)02-0243-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.013

Study on impurities of racanisodamine

WANG Xiongfei, SUN Yikun, ZHONG Miao, DUAN Xiaojie, LUO Shilin, YANG Yuwei, YUAN Ruijuan

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To identify the impurity of racanisodamine. **Methods** Several chromatographic and spectroscopic methods were used to analyze and identify the unknown impurities in racanisodamine. **Results** During storage, the impurities were produced by hydrolysis of racanisodamine. The impurities were 6 β -hydroxy tropine and tropine acid after identifying by HPLC, LC-MS, TLC and NMR. **Conclusion** 6 β -hydroxy tropine and tropine acid were hydrolysis products of racanisodamine, which were the impurities. The quality control of the two impurities should be carried out.

Keywords: racanisodamine; impurity; 6 β -hydroxy tropine; tropine acid

山莨菪碱是从山莨菪根中提取的一种生物碱, 于 1965 年 4 月试用于临床, 其天然提取物称为 654-1^[1]。由于植物来源稀缺, 随着临床用量的增加, 天然品已不能满足需求, 在此情况下, 我国科学家合成了消旋山莨菪碱, 被称为 654-2^[2-4], 主要用于解除平滑肌痉挛、胃肠绞痛、胆道痉挛以及急性微循环障碍及有机磷中毒等^[5-9]。该品种收载于《中国药典》2015 年版二部, 采用高效液相色谱法测定有关物质^[10]。在 2012 年的国家评价性抽验过程中, 发现该品种的有关物质基本上有 2 个明显的杂质峰, 主峰之后的杂质峰为药典中规定的已知杂质阿托酸 6 β -羟基-3 α -托品酯; 此外, 主峰之前仍有一个杂质峰, 此峰在消旋山莨菪碱储存过程中会不断增高, 但药典未对此峰进行检测和控制。有文献报道该峰是它的降解产物之一托品酸^[11]。但消旋山莨菪

碱在水解时, 既会产生托品酸也会产生 6 β -羟基托品 (图 1)。推测主峰之前的杂质峰是消旋山莨菪碱的降解产物托品酸和 6 β -羟基托品的混合物。因此, 采用加热方法将消旋山莨菪碱水解后作为待测样品, 并采用高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用技术、薄层色谱法和核磁共振技术来确定主峰之前杂质峰的结构。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 1525 型高效液相色谱仪 (2489 型紫外检测器, 2414 型柱温控制系统, 2707 型自动进样系统, Breeze 色谱工作站) (美国 Waters 公司); Waters-ACQUITYTM I-Class SYNAPT G2-Si MS 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪 (美国 Waters 公司), 配有电喷雾离子源及 Mass-Lynx 4.1

收稿日期: 2017-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81403071); 北京市自然科学基金项目 (7172130); 北京中医药大学自主课题项目 (2017-JYB-XS-075)

第一作者: 王雄飞 (1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析与质量控制研究。Tel: (010) 84738619 E-mail: airstforever@qq.com

*通信作者: 袁瑞娟 (1979—), 女, 博士, 副教授, 主要从事药物分析与质量控制研究。Tel: (010) 84738619 E-mail: rjyuance@126.com

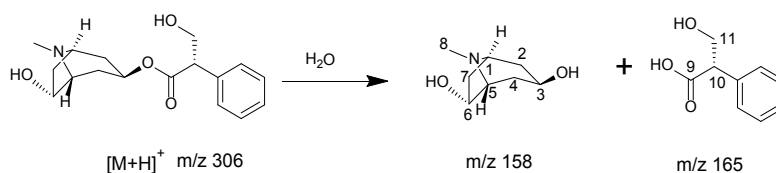


图1 消旋山莨菪碱的水解过程

Fig.1 The hydrolytic process of anisodamine

工作站, UNIFITM 1.7 软件系统(美国 Waters 公司); 600-MHz 核磁共振仪(德国布鲁克公司); 薄层硅胶板(GF254, 青岛海洋化工厂); 暗箱式紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂)。

1.2 试药

消旋山莨菪碱(南京泽朗生物科技有限公司, 批号 ZL20140522SD, 质量分数>98%), 托品酸对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号 F09J8E37558, 质量分数>98%), 磷酸二氢钾、三乙胺、二氯甲烷均为分析纯(北京化工厂), 甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司), 水为蒸馏水。重水(Norell, 美国 Landisville 公司)。

1.3 供试品和对照品的制备

各取消旋山莨菪碱、托品酸对照品 1.00 mg, 溶于 1 mL 蒸馏水, 超声溶解, 过 0.45 μm 滤膜, 制成消旋山莨菪碱、托品酸标准品溶液。另取消旋山莨菪碱 15.00 mg, 溶于 20 mL 水中, 置于 50 °C 水浴锅加热 96 h 使其充分水解, 过 0.45 μm 滤膜, 冷冻干燥, 得白色粉末。取白色粉末 1.00 mg, 溶于 1 mL 蒸馏水, 超声溶解, 过 0.45 μm 滤膜, 将水解物作为未知杂质待测溶液。薄层色谱法检测时样品溶于甲醇, 核磁共振检测时样品溶于重水。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱法鉴别

将消旋山莨菪碱、托品酸和待测样品分别进样。色谱柱为 Agilent SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 参考 2015 年版《中国药典》消旋山莨菪碱【有关物质】项下规定的流动相条件: 0.01 mol/L KH₂PO₄ 溶液(含 0.15% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 值至 6.5) - 甲醇(70:30), 检测波长 214 nm, 柱温 35 °C, 体积流量 1 mL/min, 进样 10 μL。结果见图 2。从图 2 可以看出, 消旋山莨菪碱对照品在顺、反异构体前存在一个明显的杂质峰。经过加热水解后的待测样品, 几乎水解完全, 只有极少量的消旋山莨菪碱存

在, 且水解产物与消旋山莨菪碱中的杂质峰保留时间和峰形均相同, 推测消旋山莨菪碱中的杂质和其水解产物一致。此外, 使用托品酸进行比对时, 发现杂质峰与托品酸的保留时间相同, 推测杂质可能是托品酸。高效液相色谱中未检测到 6β-羟基托品的峰, 原因可能是 6β-羟基托品紫外吸收较弱, 也可能是 6β-羟基托品与托品酸在同一位置出峰。

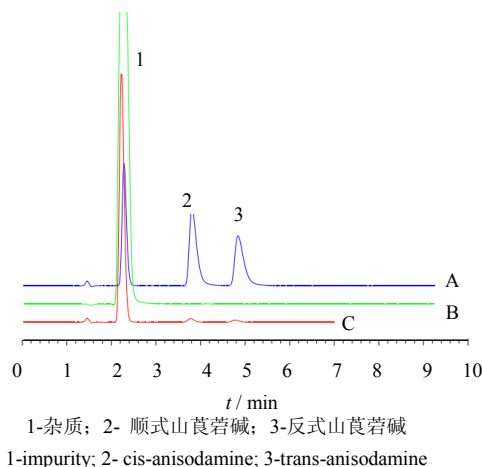


图2 消旋山莨菪碱(A)、托品酸(B)、待测样品(C)高效液相色谱法结果色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of anisodamine (A), tropic acid (B) and sample (C)

2.2 液相色谱-质谱联用技术鉴定杂质

将待测样品进行 UPLC-MS 鉴定。色谱条件如下: 色谱柱 Waters ACQUITYTM BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液和乙腈(75:25), 柱温 40 °C, 样品室温度 4 °C, 体积流量 0.2 mL/min, 进样量 2 μL。MS 条件如下: ESI 源; 雾化气温度为 175 °C; 雾化气流速为 5.0 L/min; 雾化压力 0.1 MPa; 正、负离子模式一级质谱全扫描, 正离子模式结果见图 3, 可以看到 m/z 158.121 3 的分子离子峰, 推测其含有 6β-羟基托品。负离子模式中 m/z 为 165.057 3, 结果与文献报道一



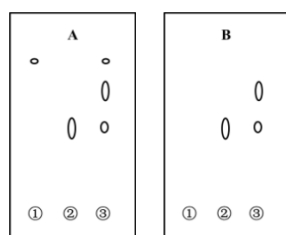
图3 待测样品的 UPLC-MS 色谱图

Fig. 3 UPLC-MS chromatogram of sample

致, 确定其含有托品酸。未知杂质经 UPLC-MS 鉴定后, 既含有托品酸, 也有 6 β -羟基托品。

2.3 薄层色谱法鉴别杂质

吸取待测样品及对照品溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上, 以甲醇-二氯甲烷 (1:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视, 并采用改良的碘化铋钾溶液进行显色, 结果见图 4。在 254 nm 紫外灯下 (A 图), 水解物在与托品酸、消旋山莨菪碱相应位置出现暗斑, 并在此两暗斑之间出现另一暗斑。说明未知杂质中含有托品酸和消旋山莨菪碱。改良的碘化铋钾溶液染色后 (B 图), 水解物在消旋山莨菪碱相应位置出现橙色斑点, 并在上方出现另一橙色斑点。水解物薄层图中消旋山莨菪碱位置的斑点应为水解时残余的消旋山莨菪碱, 上方的橙色斑点应为碱性物质, 根据消旋山莨菪碱的水解反应推测, 该斑点可能为 6 β -羟基托品。在 B 图中, 对照品托品酸不能被碘化铋钾溶液显色。根据 A 和 B 图推测, 消旋山莨菪碱杂质中既有托品酸, 也有 6 β -羟基托品。



A: UV254 nm; B: 改良碘化铋钾溶液显色剂

A: UV254 nm; B: potassium bismuth iodide

图4 托品酸 (①)、消旋山莨菪碱 (②)、待测样品 (③) 的薄层色谱图

Fig. 4 The TLC chromatograms of tropic acid (①), anisodamine (②) and sample (③)

2.4 核磁共振技术鉴别杂质

将待测样品进行 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) 分析, 结果如下。 δ : 7.36~7.43 (m, 5H, Ph-H), 4.13~

4.06 (m, 1H, H-10), 3.91~3.84 (m, 2H, H-11), 可知待测样品中含有托品酸。 δ : 3.19 (s, 1H, H-1), 1.71~1.80 (d, 2H, H-2), 4.92 (s, 1H, H-3), 1.99~2.09 (d, 2H, H-4), 3.01 (s, 1H, H-5), 4.17 (s, 1H, H-6), 1.69 (s, 1H, H-7), 2.36 (t, 3H, H-8), 可知待测样品中含有 6 β -羟基托品。

3 讨论

在 2012 年的国家评价性抽验过程中, 发现消旋山莨菪碱在主峰之前有一个杂质峰, 且该峰在消旋山莨菪碱在储存过程中会不断增加。推测该峰是消旋山莨菪碱的降解产物, 与文献报道一致, 文献报道其为消旋山莨菪碱的降解产物托品酸^[11]。根据物质守恒原则, 消旋山莨菪碱水解产物为 6 β -羟基托品和托品酸, 但文献中仅指出托品酸, 未对另一产物 6 β -羟基托品进行相关解释。由于消旋山莨菪碱的水解产物和其降解产物一致, 因此, 本研究采用加热方法使消旋山莨菪碱水解, 作为含未知杂质的待测样品, 采用多种色谱技术联合的方法对消旋山莨菪碱杂质进行确认。在 UPLC-MS 的正离子模式中, 出现了山莨菪碱 m/z 306 以及 m/z 158, 与消旋山莨菪碱代谢的文献报道的水解产物一致, 为 6 β -羟基托品^[12-13]; 在负离子模式中, 出现了与文献一致的 m/z 165, 为托品酸。在薄层色谱法鉴别中, 在 254 nm 波长下, 托品酸和水解产物在相应位置处出现相同暗斑。与改良的碘化铋钾溶液反应, 发现在消旋山莨菪碱相应橙色斑点上方出现另一橙色斑点, 可知其也是不同于消旋山莨菪碱的生物碱, 由消旋山莨菪碱水解产物可知其为 6 β -羟基托品。在液相鉴别中, 参考 2015 年《中国药典》方法, 发现水解产物与托品酸的保留时间和峰形一致, 说明其确实含有托品酸。液相色谱中, 经托品酸对照品比对, 发现杂质峰可能是托品酸, 但在 UPLC-MS 实验中, 杂质峰在不同电离模式下既检测 6 β -羟基托品, 又检测到托品酸, 因此我们推测 6 β -羟基托品和与托品酸在同一位置出峰。综上所述, 消旋山莨菪碱杂质①号峰中既有 6 β -羟基托品, 又有托品酸, 应对这两种杂质进行质量控制。对于这两种杂质是否具有副作用或毒性作用, 还需要进一步进行研究。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药物研究所植物化学研究室. 山莨菪碱的化学研究 [J]. 化学学报, 1976, 34(1): 39-44.
- [2] 中国药典 [S]. 二部. 1990.
- [3] 陈新谦, 金有豫. 新编药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.

- 版社, 2001.
- [4] 孙 凯, 杨丽敏. 山莨菪碱的药理和临床研究进展 [J]. 世界临床药物, 2010, 31(3): 182-186.
- [5] 陈德俊, 梁翠荣, 张 雷. 注射液 pH 对盐酸消旋山莨菪碱注射液稳定性的影响 [J]. 中国药师, 2013, 16 (12): 1942, 1951.
- [6] Wu X M, Huang W X, Lu L N, et al. Simultaneous determination of six alkaloids in blood and urine using a hydrophilic interaction liquid chromatography method coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 398(3): 1319-1327.
- [7] Wu H, Fan Z F. Mn-doped Zn S quantum dots for the room-temperature phosphorescence detection of raceanisodamine hydrochloride and atropine sulfate in biological fluids [J]. Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectrosc, 2012, 90(7): 131-134.
- [8] Chen H X, Wang H, Chen Y, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of anisodamine and its phase I and II metabolites in rat urine [J]. J Chromatogr B, 2005, 824(1): 21-29.
- [9] Yang L M, Xie Y F, Chen H Z, et al. Diastereomeric and enantiomeric high-performance liquid chromatographic separation of synthetic anisodamine [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(3): 905-909.
- [10] 中国药典 [S]. 二部. 2015.
- [11] 陈 青, 李 军, 谭会洁, 等. 盐酸消旋山莨菪碱注射液有关物质的研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 865-868.
- [12] 陈怀侠, 杜 鹏, 韩凤梅, 等. 液相色谱-串联质谱法鉴定大鼠血浆中的山莨菪碱及其代谢物 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(15): 1178-1181.
- [13] 陈怀侠, 杜 鹏, 韩凤梅, 等. 山莨菪碱及其大鼠肠内菌体外代谢物的液相色谱-质谱法分析 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 563-565.