

新人参皂苷元 HPD 相关物质的分离鉴定研究

高连丛, 马莹慧, 李平亚, 韩柳

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(编号:20170520040JH)

作者单位: 132013 吉林, 吉林医药学院临床医学院(高连丛), 药学院(马莹慧, 韩柳); 130000 长春, 吉林大学药学院(李平亚)

作者简介: 高连丛(1986-), 男, 大学本科, 理学学士, 助理实验师, 研究方向: 激光医学。E-mail: 864776051@qq.com

通讯作者: 韩柳(1987-), 女, 医学博士, 讲师, 研究方向: 药物化学。E-mail: hanliu13@mails.jlu.edu.cn

[摘要] **目的** 分离纯化新人参皂苷元羟基人参二醇(hydroxylation panoxadiol, HPD)的主要相关物质, 并进行结构确证。**方法** 利用反复硅胶柱层析和重结晶方法对 HPD 合成过程中所产生的相关物质进行分离纯化, 得到 4 个化合物, 经理化性质及波谱学方法(LC-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR)鉴定其结构。**结果** 新人参皂苷元 HPD 中 4 个相关物质分别是(20S, 24R)-达玛-20, 24-环氧-3 β , 6 α , 12 β , 25-四醇、(20S, 24S)-达玛-20, 24-环氧-3 β , 12 β , 25-三醇、(20S, 25R)-达玛-20, 25-环氧-3 β , 12 β , 26-三醇和达玛-24-烯-3 β , 12 β , 20S-三醇。**结论** 新人参皂苷元 HPD 相关物质的定量和定性研究可以为 HPD 原料药的质量控制提供依据。

[关键词] 新人参皂苷元 HPD; 相关物质; 杂质; 分离鉴定

[中图分类号] R 284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)05-0506-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.05.09

Study on isolation and identification of related substances of new sapogenin hydroxylation panoxadiol GAO Lian-cong, MA Ying-hui, LI Ping-ya, et al. School of Clinical Medicine, Jilin Medical College, Jilin 132013, China

[Abstract] **Objective** To separate and purify the main related substances of new sapogenin hydroxylation panoxadiol (HPD), and to confirm their structures. **Methods** Four main impurities were isolated from new sapogenin HPD using repeated silica column chromatography and recrystallization. The structural characteristics of the impurities were determined by physical and chemical properties and spectral methods, such as LC-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. **Results** The structures of the four related substances for new sapogenin HPD were identified as (20S, 24R)-dammar-20, 24-epoxy-3 β , 6 α , 12 β , 25-tetraol, (20S, 24S)-dammar-20, 24-epoxy-3 β , 12 β , 25-triol, (20S, 25R)-dammar-20, 25-epoxy-3 β , 12 β , 26-triol and dammar-24-ene-3 β , 12 β , 20S-triol. **Conclusion** The quantitative and qualitative studies on the HPD related substances of new sapogenin HPD can provide a basis for the quality control of HPD active pharmaceutical ingredients.

[Key words] New sapogenin hydroxylation panoxadiol (HPD); Related substances; Impurity; Isolation and identification

相关物质主要是指在药物生产过程中带入的起始原料、中间体、聚合物、副反应产物以及药物贮藏过程中的降解产物等。相关物质的检测是药品质量控制的关键项目之一,其含量是反映药品纯度的直接指标,也是药学研究和评价中的重点和难点。相关物质的研究直接关系到对药物杂质把握的准确性、相关物质的微量性和复杂性。由于相关物质通常与活性成分在化学结构上相似或具有渊源关系,了解相关物质的定性信息,推测其可能的结构,将有助于分析其形成的原因和过程,并在药品制备过程中可以设法避免该杂质的形成,或经过一些纯化方

法使之降至可以接受的水平。相关物质的定性研究也可为其定量分析提供重要参考,对贮藏条件的确定也具有指导意义^[1]。新人参皂苷元羟基人参二醇(HPD),其化学名称为“达玛-20S, 25S-环氧-3 β , 12 β , 26-三醇”,具有很强的抗心肌缺血活性^[2],HPD注射液有望开发成为高效、速效、低毒治疗心血管疾病的创新药物(化药 1.1),目前处于临床前研究阶段。为确保药物安全有效,同时考虑药物生产实际情况等因素,一般可允许含有一定量的无害或低毒性的相关物质存在,但对其毒性较大或能危害人体健康的、无效的相关物质则必须进行严格控制。因

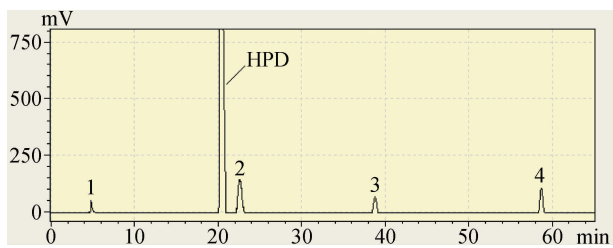
此,一般原料药都需进行相关物质研究,尤其供注射用的原料药更要引起关注^[3]。本研究按照人用药品注册技术要求国际协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)新原料药中的杂质 Q3A 指导原则,以及国家食品药品监督管理局(State Food and Drug Administration, SFDA)修订的《化学药物杂质研究技术指导原则》的要求,对 HPD 中的 4 个主要杂质进行了定性,分离纯化制备单体并鉴定了其结构,为制定 HPD 有关物质的合理限度提供了依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,ELSD 2000 型蒸发光散射检测器;甲醇[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];乙腈[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];水(超纯水)。新人参皂苷元 HPD 为自制(批号 171201, 180301, 180302)。

1.2 色谱条件 采用华谱 Unitary C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, ODS 预柱;流动相为乙腈:甲醇:水(52:28:20)等度洗脱,流速为 1.3 ml · min⁻¹;检测进样量 10 μl。理论板数按 HPD 峰计不低于 6000;新人参皂苷元 HPD 峰与有关物质的分离度应符合要求。

1.3 分离与纯化方法 取新人参皂苷元 HPD 适量,加甲醇制成每 1 ml 含约 15.0 mg 的溶液,0.45 μm 滤膜滤过,注入液相色谱仪,以乙腈:甲醇:水(52:28:20)为流动相(见图 1)。利用反复硅胶柱层析(洗脱剂:石油醚-乙酸乙酯),再经 C₁₈ 反相柱色谱(洗脱剂:甲醇-水)和重结晶方法得相关物质 I、II、III、IV 粗品,将制得的各相关物质粗品进行制备液相分离,得新人参皂苷元 HPD(5.7 g),相关物质 I (23 mg)、II (30 mg)、III (20 mg)、IV (28 mg) 精品。将其与数据库及文献资料数据比对以进行鉴定^[4~13]。



1 - 相关物质 I; 2 - 相关物质 II; 3 - 相关物质 III; 4 - 相关物质 IV

图 1 新人参皂苷元 HPD 相关物质的高效液相色谱

2 结果

2.1 相关物质 I 白色透明针状结晶(乙酸乙

酯),正离子 ESI-MS(m/z):493.4[M+H]⁺,推断该化合物的相对分子质量为 492.4,结合¹H-NMR 和¹³C-NMR,确定相关物质 I 的分子式为 C₃₀H₅₂O₅。易溶于乙醇、丙酮等。薄层色谱法(TLC)检测,10% 硫酸乙醇溶液显紫色。Liebermann-Burchard 反应呈阳性,Molish 反应呈阴性。10% H₂SO₄ 及 50% HAc 水解未检测出糖,推测该化合物不含有糖。提示其为三萜皂苷元类化合物。¹H-NMR(500 MHz, C₅D₅N)谱:高场区 8 个甲基的质子信号 δ0.90(3H, s)、0.95(3H, s)、1.09(3H, s)、1.25(3H, s)、1.25(3H, s)、1.42(3H, s)、1.46(3H, s)、1.97(3H, s)。中场 4 个连氧碳上的质子信号:δH3.50(1H, m)、3.71(1H, m)、3.94(1H, m)、4.40(1H, t),结合¹³C-NMR 谱分别归属为苷元上 C-3、C-12、C-24 和 C-6 位上的质子信号,同时给出其他饱和碳上的质子信号。¹³C-NMR(125.8 MHz, C₅D₅N)谱:共 30 个碳信号,在高场 8 个甲基碳信号,分别为 δC17.16(C-18)、17.77(C-19)、26.98(C-21)、27.13(C-26)、27.62(C-27)、31.91(C-28)、16.47(C-29)、18.33(C-30)。中场 6 个连氧碳信号,化学位移分别为 δC78.41(C-3)、67.73(C-6)、71.19(C-12)、86.72(C-20)、85.63(C-24)、70.37(C-25),并给出 δC61.94(C-5) 原人参三醇特征信号,根据 C-17、C-20、C-21、C-22 的化学位移值提示 C-20 的构型为 S 型,符合人参皂苷 C-20 位立体构型(S, R)位移规律。根据 C-20、C-24、C-26、C-27 位碳信号的化学位移和文献规律,确定 C-24 位为 R 构型。将相关物质 I 波谱数据与 24(R)-奥克梯隆昔元的数据比对,二者基本一致。结果表明,鉴定相关物质 I 为(20S, 24R)-达玛-20, 24-环氧-3β, 6α, 12β, 25-四醇。化学结构式见图 2(a)。

2.2 相关物质 II 无色针状结晶(丙酮),正离子 ESI-MS(m/z):477.4[M+H]⁺,推断该化合物的相对分子质量为 476.4,结合¹H-NMR 和¹³C-NMR,确定相关物质 II 的分子式为 C₃₀H₅₂O₄。易溶于甲醇、乙醇,微溶于丙酮,不溶于水。Liebermann-Burchard 反应呈阳性,Molish 反应呈阴性,10% H₂SO₄ 水解及 50% HAc 水解均未检出糖。提示为三萜皂苷元类化合物。¹H-NMR(500 MHz, C₅D₅N)谱在高场共 8 个甲基质子信号,分别为 δ 0.90(3H, s)、0.91(3H, s)、1.03(3H, s)、1.05(3H, s)、1.22(3H, s)、1.30(3H, s)、1.30(3H, s)和 1.44(3H, s);中场 3 个连氧碳质子信号分别为 H-3 信号 δ3.42(1H, dd, J = 10.5, 5.0 Hz)、H-12 信号 δ3.75(1H, td, J = 10.0, 4.5 Hz)、H-24 信号 δ4.16(1H, dd, J = 11.0, 5.5 Hz);同

时给出其余饱和碳上质子信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)谱共30个碳信号,在高场8个甲基碳信号分别为 $\delta 15.7$ (C-18)、 16.3 (C-29)、 16.7 (C-19)、 18.2 (C-30)、 26.6 (C-21)、 27.0 (C-26)、 29.0 (C-27)和 28.7 (C-28);中场5个连氧信号分别为 $\delta 70.0$ (C-25)、 70.8 (C-12)、 78.0 (C-3)、 87.1 (C-20)、 88.4 (C-24);同时给出其余饱和碳信号。通过 $\delta 49.5$ (C-17)、 87.1 (C-20)、 26.6 (C-21)、 32.2 (C-22)的化学位移值可知C-20的构型为S型,将相关物质II的波谱数据与伪人参皂苷元DQ波谱数据比对,二者基本一致。结果表明,鉴定相关物质II为(20S,24S)-达玛-20,24-环氧- $3\beta,12\beta,25$ -三醇。化学结构式见图2⑥。

2.3 相关物质III 白色针晶(乙酸乙酯),正离子ESI-MS(m/z):477.4[$M+H$] $^+$,推断该化合物的相对分子质量为476.4,结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$,确定相关物质III的分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_4$ 。易溶于甲醇,微溶于丙酮,不溶于水。TLC检测,10%硫酸乙醇溶液显紫色。Liebermann-Burchard反应呈阳性,Molish反应呈阴性,10% H_2SO_4 水解和50% HAc水解均未检出糖,提示为三萜皂苷元类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)谱高场7个甲基质子信号分别为 $\delta 0.86$ (3H,s)、 0.88 (3H,s)、 1.01 (3H,s)、 1.01 (3H,s)、 1.21 (3H,s)、 1.29 (3H,s)和 1.31 (3H,s),与人参二醇比较,少一个甲基质子信号;在中场出4个连氧碳质子信号分别为H-3信号 $\delta 3.42$ (1H,m)、H-12信号 $\delta 3.67$ (1H,m)、H-12信号 $\delta 3.56$ (1H,d, $J=11.5$ Hz)和 3.56 (1H,d, $J=11.5$ Hz);同时还给出其他质子信号。

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)谱共30个碳信号,在高场7个甲基碳信号分别为 $\delta 16.0$ (C-18)、 16.7 (C-19)、 27.0 (C-21)、 23.8 (C-27)、 28.7 (C-28)、 16.3 (C-29)和 18.6 (C-30);在中场 $\delta 56.5$ 给出人参二醇组皂苷C-5位的特征信号,同时给出5个氧碳信号分别为 $\delta 70.9$ (C-12)、 71.4 (C-26)、 77.1 (C-25)、 78.1 (C-3)和 78.1 (C-20),其中 $\delta 78.1$ 为人参二醇组皂苷C-3位未连接糖的特征信号;同时给出其余饱和碳信号。将相关物质III碳谱数据与人参二醇碳谱数据相比较,二者母环部分基本一致,差别在于C-17位所连接的六元环的化学位移的不同。相关物质III碳谱数据表明C-17位连接的六元环,C-25位连接有1个- CH_3 和1个- CH_2OH 。将相关物质III波谱数据与26-羟基-人参二醇波谱数据比对,二者基本一致。结果表明,鉴定相关物质III为(20S,25R)-达玛-20,25-环氧- $3\beta,12\beta,26$ -三醇。化学结构式见图2③。

2.4 相关物质IV 白色絮状结晶(乙酸乙酯),正

离子ESI-MS(m/z):461.4[$M+H$] $^+$,推断该化合物的相对分子质量为460.4,结合 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$,确定相关物质IV的分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_3$ 。易溶于甲醇、乙醇,微溶于乙酸乙酯,不溶于水。Liebermann-Burchard反应呈阳性,Molish反应呈阴性,10% H_2SO_4 水解及50% HAc水解均未检出糖,提示为三萜皂苷元类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)谱在高场共8个甲基质子信号分别为 0.86 (3H,s)、 0.92 (3H,s)、 0.99 (3H,s)、 1.02 (3H,s)、 1.22 (3H,s)、 1.42 (3H,s)、 1.62 (3H,s)和 1.64 (3H,s);中场3个连氧碳质子信号分别为H-3信号 $\delta 3.42$ (1H,dd, $J=10.5,5.0$ Hz)、H-12信号 $\delta 3.90$ 和H-24信号 $\delta 5.31$;同时给出其余饱和碳上质子信号。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125.8 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)谱共30个碳信号,在高场8个甲基碳信号分别为 $\delta 15.9$ (C-18)、 16.4 (C-19)、 16.5 (C-29)、 17.1 (C-30)、 17.7 (C-27)、 25.9 (C-26)、 27.1 (C-21)和 28.7 (C-28);中场3个连氧信号分别为 $\delta 71.1$ (C-12)、 78.0 (C-3)、 73.0 (C-20);同时给出其余饱和碳信号。将相关物质IV的波谱数据与20(S)-原人参二醇波谱数据比对,二者基本一致。结果表明,鉴定相关物质IV为达玛-24-烯- $3\beta,12\beta,20\text{S}$ -三醇。化学结构式见图2④。

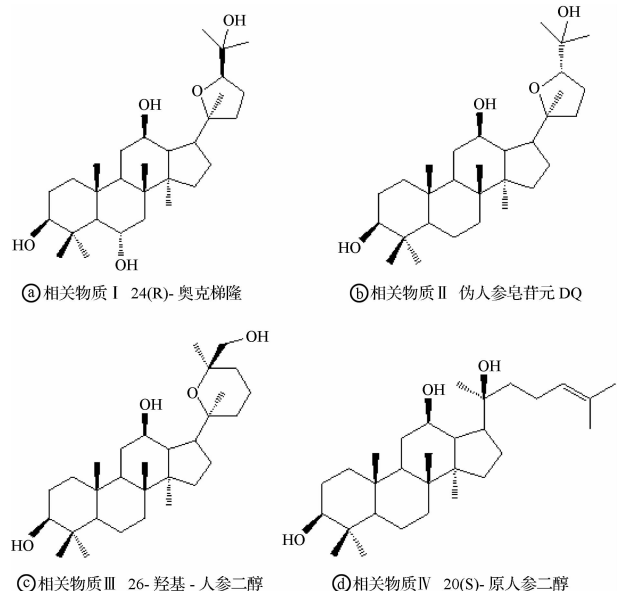


图2 新人参皂苷元HPD相关物质的化学结构式

3 讨论

3.1 近年来,对皂苷的发现、结构修饰及新产品开发得到国内外学者的广泛关注,一些新型的分离、鉴定技术得到了飞速发展,如色谱微分离技术和质谱鉴定技术以及液质联用等。常见的液相色谱技术的分离机理分为吸附、分配、交换、排阻以及亲和5种类型,而对化合物的结构研究主要是运用各种波谱技

术,包括紫外-可见吸收光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)、质谱(MS)、旋光光谱(ORD)、圆二色谱(CD)以及单晶 X 射线衍射技术等^[14]。Ji 等^[15]采用制备色谱法从云南甘草根中分离出 1 个齐墩果烷三萜、7 个新三萜皂苷和 4 种已知结构的皂苷,并且通过核磁和高分辨质谱将它们进行了结构鉴定。Xu 等^[16]利用反复硅胶柱层析和羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)通过物质分子大小的差别从菝葜的根茎中分离得到 4 种新的呋喃甾醇皂苷。Zheng 等^[17]通过色谱法从盾叶薯蓣中分离得到 2 种新的甾体皂苷,并利用 1D-NMR、2D-NMR、MS、IR 等波谱分析方法进行了结构鉴定。Xu 等^[18]首次通过合成的方法合成了(20R,24S)-20,24-环氧-达玛-3 β ,12 β ,25-三醇和(20R,24S)-20,24-环氧-达玛-3 β ,12 β ,25-三醇两种奥克梯隆型三萜皂苷,并利用光谱技术和单晶 X 射线衍射技术阐明了其具体结构。化合物的分离和鉴定通常不是一种方法就能达到理想的效果,往往是多种方法的联合应用,随着科技的进步,尤其是 NMR、MS 和 X 单晶衍射在设备、性能及测试技术方面的大幅改善以及结合计算机技术的应用,当今结构的测定需要的试样量已大幅度降低,十几毫克甚至几毫克就可以完成鉴定工作。

3.2 通过相关物质的分离、鉴定,推测相关物质的来源,从而能够更好地控制相关物质的含量。新人参皂苷元 HPD 的合成工艺包括三步:一是西洋参茎叶总皂苷制备 20(S)-原人参二醇(PPD);二是由 PPD 制备 25-烯-PPD;三是通过手性合成技术制备新人参皂苷元 HPD。故相关物质Ⅳ PPD 的来源主要是未完全反应的中间体,而相关物质Ⅱ伪人参皂苷元 DQ 就是第二步未完全反应的 PPD 在第三步手性合成过程中的副产物。相关物质Ⅰ和Ⅲ推测是第一步西洋参茎叶总皂苷制备 PPD 时,产生了副产物拟人参皂苷 RT5 和达玛-25-烯-3 β ,12 β ,20S-三醇,进而在第三步的手性环合中分别氧化形成了 24(R)-奥克梯隆和 26-羟基-人参二醇。依据这四种相关物质的来源分析,我们在实际生产方面,除了要提高产率还要把控制好反应温度、时间、溶剂等条件,以控制反应产生的相关物质,为更好的用药安全打下坚实的基础。

3.3 创新药的研究是一个逐渐认知的过程,因此对于相关物质的研究和认识是一个不断积累的过程。按照 ICH Q3A 指导原则以及 SFDA《化学药物杂质研究技术指导原则》的要求,对于含量 >1% 的杂质需要进行进一步的毒性试验,因此,对于新人参皂苷

元 HPD 这 4 种相关物质的含量测定将是下一步的重点工作。本研究所探讨新人参皂苷元 HPD 相关物质的研究可能并不完善,但其思路和方法,能够为更深入进行新人参皂苷元 HPD 及其类似药物的相关物质研究提供借鉴和参考。

参考文献

- 1 单 淇,周渭渭,周福军,等.阿可拉定的有关物质研究[J].药物评价研究,2011,34(2):92-95.
- 2 韩 柳,李平亚,刘金平,等.达玛-20S,25S-环氧-3 β ,12 β ,26-三醇及其提取方法和药物用途[P].中国专利:201410675854.X,2014-11-22.
- 3 李志刚,阮爱华,孙学伟,等.注射用丹酚酸 A 相关物质分析研究[J].药物分析杂志,2011,31(2):348-351.
- 4 Han L, Lin MY, Zheng Q, et al. A new epimer of ocotillol from stems and leaves of American ginseng[J]. Nat Prod Res, 2014, 28(13):935-939.
- 5 刘海燕.拟人参皂苷 F₁₁ 合成工艺及其相关物质的研究[D].长春:吉林大学,2015.
- 6 杨 洁.奥克梯隆型人参皂苷的半合成及生物活性研究[D].长春:吉林大学,2016.
- 7 刘海宇.西洋参茎叶总皂苷高压碱降解成分及生物活性的研究[D].长春:吉林大学,2013.
- 8 田 旭.奥克梯隆型人参皂苷及其相关物质的研究[D].长春:吉林大学,2012.
- 9 Zheng Q, Li Z, Liu J, et al. Two new dammarane-type triterpene saponins from Chinese red ginseng[J]. Nat Prod Res, 2016, 30(1):95-99.
- 10 刘金平.国产西洋参茎叶皂苷分离、结构修饰及其生物活性研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2005.
- 11 Han L, Li Z, Zheng Q, et al. A new triterpenoid compound from stems and leaves of American ginseng[J]. Nat Prod Res, 2016, 30(1):13-19.
- 12 任媛媛.拟人参皂苷元 DQ 合成工艺及其相关物质的研究[D].长春:吉林大学,2012.
- 13 李平亚,刘金平.人参皂苷 NMR 标准图谱[M].北京:化学工业出版社,2012:63-66.
- 14 裴月湖,娄红祥.天然药物化学[M].第7版.北京:人民卫生出版社,2016:37-48.
- 15 Ji S, Wang Q, Qiao X, et al. New triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza yunnanensis* and their rapid screening by LC/MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 90:15-26.
- 16 Xu J, Feng S, Wang Q, et al. Four new furostanol saponins from the rhizomes and roots of *Smilax scobinicaulis* and their cytotoxicity[J]. Molecules, 2014, 19(12):20975-20987.
- 17 Zheng L, Zhou Y, Zhang JY, et al. Two new steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea zingiberensis*[J]. Chin J Nat Med, 2014, 12(2):142-147.
- 18 Xu YR, Yang JJ, Liu J, et al. Synthesis and crystal structures of C24-epimeric 20(R)-ocotillol-type saponins[J]. Acta Crystallogr C Struct Chem, 2016, 72(Pt 6):498-503.

[收稿日期 2018-07-05][本文编辑 余 军 吕文娟]