

中图分类号: R932; R284

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)21-0051-07

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.21.011



右旋丹参素-右旋冰片酯制备过程中引入杂质分析与结构鉴定*

夏 丽¹, 彭莉蓉¹, 孙 颖^{2,3}, 贾 璞³, 白亚军^{2,3}, 郑晓晖^{3△}

(1. 陕西省西安市中心医院, 陕西 西安 710003; 2. 陕西鸿道生物分析科学技术研究院有限公司, 陕西 西安 710068; 3. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 分析右旋丹参素-右旋冰片酯(DD-DBZ)制备过程中引入的杂质,并鉴定杂质结构。方法 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法分离 DD-DBZ 和杂质,采用紫外光谱法、红外光谱法、高效液相色谱-质谱法、核磁共振法鉴定杂质结构。结果 鉴定出 4 种杂质,分别为乙酰 α -羟基 DD-DBZ(杂质 A)、丹参素乙酯(杂质 B)、右旋双丹参素冰片酯(杂质 C)、右旋丹参素-左旋冰片酯(杂质 D)。杂质 A、杂质 B 主要产生于纯化过程中的酯交换反应,杂质 C、杂质 D 主要产生于合成反应过程。结论 右旋丹参素-右旋冰片酯生产过程中应严格控制生产工艺、原料等,才能有效控制杂质含量。

关键词: 右旋丹参素右旋冰片酯; 杂质; 反相高效液相色谱法; 紫外光谱法; 红外光谱法; 核磁共振法; 结构鉴定

Impurities Introduced During the Preparation of Tanshinol (*D* - Form) - Borneol (*D* - Form) Ester and Its Structural Identification

XIA Li¹, PENG Lirong¹, SUN Ying^{2,3}, JIA Pu³, BAI Yajun^{2,3}, ZHENG Xiaohui³

(1. Xi'an Central Hospital, Xi'an, Shaanxi, China 710003; 2. Hong - Taoism Research Institute of Analytical Science and Technology Ltd., Xi'an, Shaanxi, China 710068; 3. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi, China 710069)

Abstract: Objective To analyze the impurities introduced during the preparation of tanshinol (*D* - form) - borneol (*D* - form) ester (DD - DBZ), and to identify their structures. **Methods** Reverse - phase high - performance liquid chromatography (RP - HPLC) was used to separate DD - DBZ and impurities, and ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, HPLC - mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance were adopted to identify the structures of the impurities. **Results** Four impurities were identified, namely acetyl α - hydroxy DD - DBZ (impurity A), salvianic acid ethyl ester (impurity B), salvianolic acid borneol ester (*D* - form) (impurity C), and salvianolic acid (*D* - form) - borneol (*L* - form) (impurity D). Impurity A and impurity B were generated through the ester exchange reaction in the purification process, while impurity C and impurity D were generated during the reaction process. **Conclusion** It is necessary to strictly control the production process and raw materials in the DD - DBZ production process in order to effectively control the impurity content.

Key words: tanshinol (*D* - form) - borneol (*D* - form) ester; impurity; RP - HPLC; UV spectroscopy method; infrared spectroscopy method; nuclear magnetic resonance method; structural identification

右旋丹参素-右旋冰片酯(DD-DBZ)是在中医药理论指导下,以中药复方丹参方整体疗效和作用规律为基础,设计、合成的抗脑卒中创新药。DD-DBZ 的原料药及其制剂工艺、质量稳定^[1-4],制造成本低^[5-6],药理学活性显著(如抗神经炎症、抗氧化应激、抗脑缺血损伤、保护血管内皮、促进血管新生),代谢稳定,且毒性低^[7-16]。DD-DBZ 被认为是一种潜在的治疗心脑血管性疾病的 I 类化学新药,开发前景好。药物的纯度对其临床安全性和有效性至关重要,在新药临床前研究中须对药物进行严格的纯度测定,确保药物达到临床

使用的要求^[17-18]。其中,杂质的来源、去向分析及其准确、有效的控制是药品质量研究的关键^[19]。本研究从 DD-DBZ 的制备过程出发,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法分离杂质,并采用紫外光谱(UV)法、红外光谱(IR)法、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法、核磁共振(NMR)法鉴定杂质结构,分析杂质产生的原因,为 DD-DBZ 原料药的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SIGMA 2-16K 型低温高速离心机(德国 Merck

* 基金项目: 国家中医药管理局科技项目[GZY-KJS-2023-035]; 陕西省创新药物研究中心项目[2022YWZX-01]; 陕西省中医药管理局秦创原中药创新研发项目[2022-QCYZH-023]。

第一作者: 夏丽, 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向为临床药学及中药药效物质基础, (电子信箱)li_xiatcm@126.com。

[△]通信作者: 郑晓晖, 男, 博士, 研究方向为中药复方代谢、应答及分析、生物分析新技术及创新药物研发, (电子信箱)zhengxh@nwnu.edu.cn。

KGaA 公司); LCMS - 8040CL 型高效液相色谱质谱联用仪(配备 LC - 30AD 型二元泵, SIL - 30ACMP 型自动进样器, SPD - 20AV 型检测器, LabSolutions 色谱工作站), UV - 1800 型 UV 检测器, 均购自日本 Shimadzu 公司; BCE55I - 10CN 型电子天平(德国 Sartorius 公司, 精度为 0.01 mg); VER - TEX6 型快速混匀器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司); NP7100C 型制备液相泵, DAC - HB150 型动态轴向压缩柱, NP7010C 型制备液相泵, DAC - HB50 型动态轴向压缩柱, 均购自江苏汉邦科技有限公司; JEOL 400M 型 NMR 谱仪(日本 JEOL 公司); Nicolet 5700 型 IR 检测器(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 试药

右旋冰片(江西林科龙脑科技股份有限公司, 批号 20220508, 纯度 96%); 右旋丹参素、DD - DBZ 对照品均为实验室自制, 纯度均为 99%; 硅胶(青岛海洋化工有限公司); 其余试剂均购自中国医药集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 RP - HPLC 法分离杂质

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Agilent TC - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 甲酸水 - 乙腈(40:60, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 5.0 μL。

2.1.2 DD - DBZ 粗品制备

向 10 L 四口圆底烧瓶中依次加入四氢呋喃(THF) 5 L、右旋丹参素 1 000 g、右旋冰片 1 010 g、一水对甲苯磺酸(TsOH·H₂O) 95.1 g, 搅拌, 加热, 回流, 按 2.1.1 项下色谱条件进样分析, 监测至反应液中右旋丹参素含量小于 5%(约 15 h)时停止。向反应液中加水 4 L, 再用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 3 L, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥 2 h, 滤过, 浓缩, 浓缩液加硅胶 2 kg 拌样, 得 DD - DBZ 粗品。制备流程见图 1。

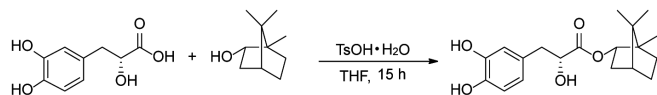


图1 DD - DBZ 粗品制备流程

Fig.1 Preparation process of the DD - DBZ crude product

2.1.3 DD - DBZ 纯化与杂质分离

取 2.1.2 项下 DD - DBZ 粗品(纯度为 88.0%) 2.6 kg, 用硅胶拌样, 采用汉邦 150 动态轴向压缩柱(填充 200~300 目硅胶, 2 MPa 保压 2 h), 以乙酸乙酯 - 石油醚(1:5, V/V) 为流动相等度洗脱, 流速为 540.0 mL/min, 上样量为 每次 800 g(步骤 a)。通过监测 UV 检测器(检测波长为 280 nm)信号并结合薄层色谱(TLC)法[流动相为石油醚 - 乙酸乙酯(1:2, V/V), 检测方法为碘熏], 先

后收集获得 6 个组分(DD - DBZ 纯品与各杂质)的流分; 采用汉邦 50 动态轴向压缩柱(填充 200~300 目硅胶), 分别以石油醚 - 乙酸乙酯[(20:1, 10:1, 5:1, 4:1, V/V), 步骤 b], 石油醚 - 乙酸乙酯[(50:1, 40:1, 30:1, 20:1, V/V), 步骤 d], 二氯甲烷 - 甲醇[(50:1, 25:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, V/V), 步骤 e] 为流动相梯度洗脱, 流速为 40.0 mL/min, 分别收集、精制杂质 A - C; 采用半制备型超临界流体色谱系统(NS8002)及 UniChiral OZ - 5H 色谱柱(250 mm × 21.2 mm, 5 μm), 以乙腈 - 二氧化碳(10:90, 20:80, 30:70, V/V) 为流动相梯度洗脱, 流速为 15.0 mL/min(步骤 c), 收集、精制杂质 D。操作流程见图 2。

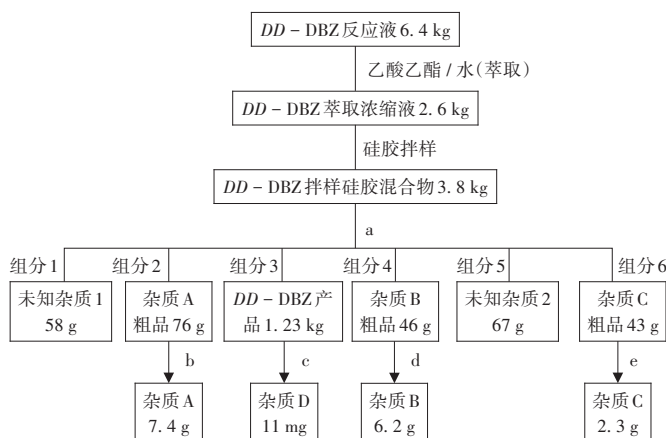


图2 DD - DBZ 与杂质 A - D 的分离与纯化流程

Fig.2 The flowchart of impurities A - D separation and purification process from the reaction system of DD - DBZ

2.1.4 组分分析

组分 1 主要为未反应完的冰片和少量极性较大的未知物; 组分 3 为目标产物 DD - DBZ(纯度 99.6%); 组分 5 杂质少, 暂未分离得到相应纯品, 且结构未知; 其他组分为杂质粗品。将组分 2 - 4, 6 进一步纯化, 得到杂质 A - D 的精制品, 质量分别为 7.4 g、6.2 g、2.3 g、11 mg。HPLC 图见图 3。

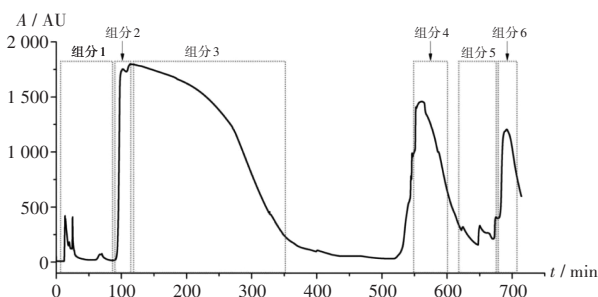


图3 DD - DBZ 粗品高效液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of the DD - DBZ crude product

2.2 杂质结构鉴定

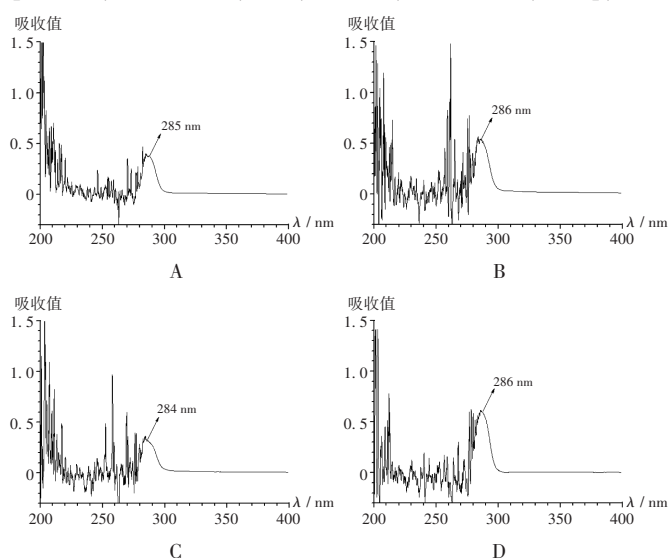
2.2.1 检测条件

1) HPLC - MS 法。色谱柱: Agilent TC C₁₈ 柱(250 mm ×

4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.2% 甲酸水 - 乙腈 (40:60, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 离子源: 电喷雾电离 (ESI); 接口电压: 4.5 kV; 检测模式: 负离子模式; 扫描方式: 全扫描; 扫描范围: 100 ~ 1 000 质荷比 (m/z); 扫描速度: 909 u/sec; 雾化气流量: 3 L/min; 干燥气流量: 15 L/min; DL 温度: 250 $^{\circ}$ C; 加热块温度: 400 $^{\circ}$ C。2) UV 法。取待测物 5 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描。3) IR 法。取待测物 1 mg, 精密称定, 采用溴化钾压片测定。4) NMR 法。溶剂: DMSO- d_6 ; 内标物: 四甲基硅烷 (TMS) (δ_H 0.00, δ_C 0.0); 观测核: 1H , ^{13}C ; 工作频率: 400 M(1H), 101 M(^{13}C); 温度: 25 $^{\circ}$ C; 脉冲序列: 标准脉冲; 采用 MestReNova 12.0 与 OriginPro 9.0 软件完成 NMR 图谱处理。

2.2.2 结果鉴定

杂质 A: 为浅褐色透明油状物, 在 285 nm 波长处有最大吸收 (图 4 A), 具有羰基、苯环与酚羟基典型官能团 (图 5 A)。高分辨质谱分析结果显示, $m/z = 375.1806$, $[M - H]^-$, 计算值为 375.1808, $m/z = 421.1860$, $[M + COOH]^-$, 计算值为 421.1862。详见图 6 A。主裂解离子为 C—O 键裂解片段, $m/z = 147$ 。详见图 7。杂质 B—D 均为类似裂解方式。 1H -NMR 结果显示, 杂质 A 具有 4 个甲基 [0.82(s, 3H), 0.81(s, 3H), 0.72(s, 3H), 2.05(s, 3H)], 4 个亚甲基氢 [2.90(m, 2H), 2.18–2.10(m, 1H), 1.73–1.60(m, 2H), 1.27–1.19(m, 1H), 1.08–1.01(m, 1H), 0.68(dd, $J = 16, 3.4$ Hz, 1H)], 1 个次甲基氢 [1.60–1.58(m, 1H)], 2 个烷氧基氢 [5.00(t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.70(d, $J = 8.9$ Hz, 1H)], 3 个



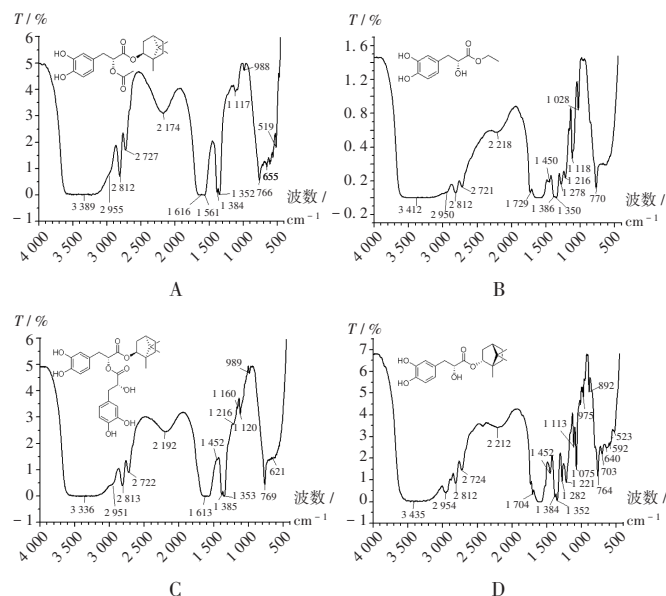
A. 杂质 A B. 杂质 B C. 杂质 C D. 杂质 D

图 4 杂质 A—D 的 UV 图

A. Impurity A B. Impurity B C. Impurity C D. Impurity D

Fig. 4 UV spectra of impurities A—D

苯环氢 [6.63(dd, $J = 5.0, 2.9$ Hz, 2H), 6.47(dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz, 1H)], 2 个酚羟基氢 [8.79(s, 1H), 8.75(s,

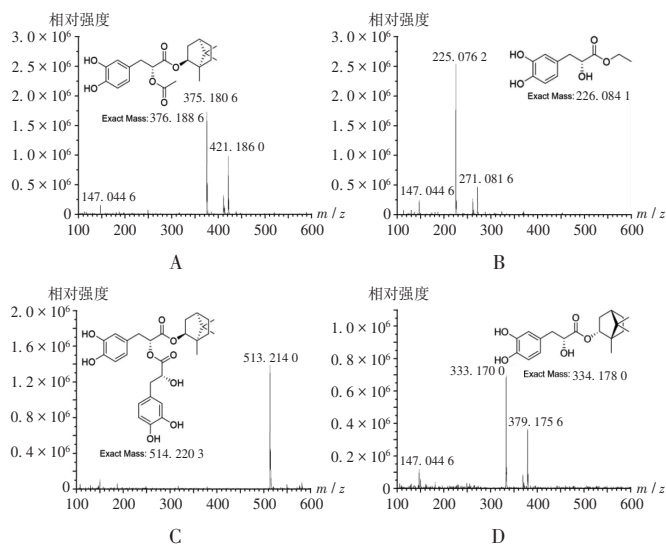


A. 杂质 A B. 杂质 B C. 杂质 C D. 杂质 D

图 5 杂质 A—D 的 IR 图

A. Impurity A B. Impurity B C. Impurity C D. Impurity D

Fig. 5 IR spectra of impurities A—D



A. 杂质 A B. 杂质 B C. 杂质 C D. 杂质 D

图 6 杂质 A—D 高分辨质谱图

A. Impurity A B. Impurity B C. Impurity C D. Impurity D

Fig. 6 High resolution spectra of impurities A—D

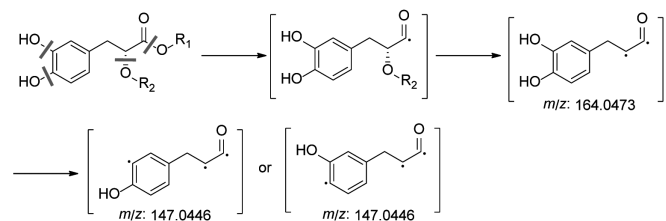


图 7 杂质 A—D 的推测质谱裂解途径

Fig. 7 Speculation on the mass spectrometry fragmentation pathway of impurities A—D

表 2 杂质 A - D 核磁共振(NMR)图谱^a
Tab. 2 NMR spectra of impurities A - D^a

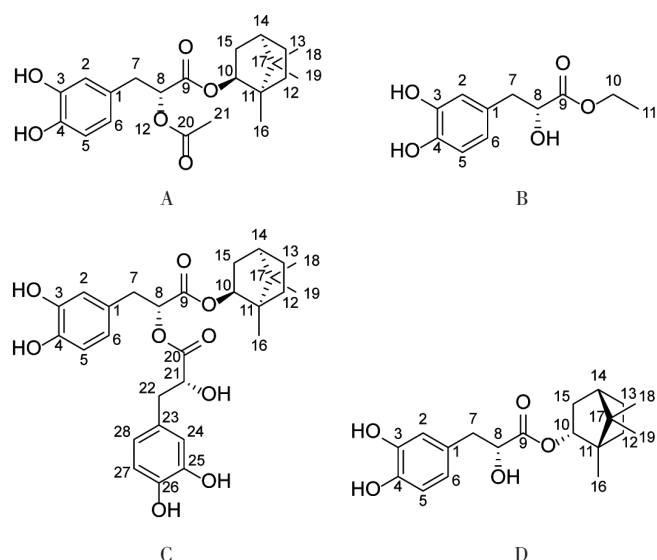
序号	杂质 A		杂质 B		杂质 C		杂质 D	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	126.26	-	128.29	-	126.20	-	128.06
2	6.63(dd, $J=5.0, 2.9$ Hz, 2H) ^b	116.68	6.59(s, 1H)	116.88	6.66-6.59(m, 4H) ^c	120.24	6.60(s, 1H)	116.72
3	-OH, 8.79(s, 1H), 8.75(s, 1H)	145.07	-OH, 8.72(s, 1H), 8.64(s, 1H)	144.84	-OH, 8.72(d, $J=37.8$ Hz, 4H) ^e	145.09	-OH, 8.68(s, 1H), 8.61(s, 1H)	144.84
4		144.22		143.76		144.24		143.72
5	6.63(dd, $J=5.0, 2.9$ Hz, 2H) ^b	115.42	6.60(d, $J=8.0$ Hz, 1H)	115.29	6.66-6.59(m, 4H) ^c	115.41	6.59(d, $J=6.8$ Hz, 1H)	115.21
6	6.47(dd, $J=8.0, 1.9$ Hz, 1H)	120.09	6.43(dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, 1H)	120.13	6.50(dd, $J=8.0, 1.8$ Hz, 1H)	116.81	6.44(dd, $J=8.0, 1.8$ Hz, 1H)	119.93
7	2.90(m, 2H)	39.62	2.79-2.59(m, 2H)	39.85	3.00-2.90(m, 2H)	36.27	2.79-2.63(m, 2H)	39.87
8	5.00(t, $J=6.6$ Hz, 1H)	73.26	4.14-4.07(m, 1H); -OH, 5.43(d, $J=6.1$ Hz, 1H)	60.01	5.06(t, $J=6.6$ Hz, 1H)	73.24	4.14(q, $J=6.2$ Hz, 1H); -OH, 5.43(d, $J=6.0$ Hz, 1H)	71.91
9	-	169.99	-	173.67	-	169.34	-	173.78
10	4.70(d, $J=8.9$ Hz, 1H)	79.93	4.04(q, $J=7.1$ Hz, 2H)	71.77	4.75(d, $J=9.1$ Hz, 1H)	80.03	4.74(d, $J=8.8$ Hz, 1H)	78.97
11	-	48.45	1.13(t, $J=7.1$ Hz, 3H)	14.15	-	48.51	-	48.40
12	1.73-1.60(m, 2H) ^c , 1.27-1.19(m, 1H)	27.37	-	-	1.75-1.68(m, 1H), 1.24-1.19(m, 1H)	26.63	1.86-1.77(m, 1H), 1.24-1.14(m, 2H) ^c	26.56
13	1.73-1.60(m, 2H) ^c , 1.08-1.01(m, 1H)	26.65	-	-	1.68-1.61(m, 1H), 1.08-1.05(m, 1H)	27.38	1.74-1.65(m, 1H), 1.24-1.14(m, 2H) ^c	27.57
14	1.60-1.58(m, 1H)	44.16	-	-	1.61-1.58(m, 1H)	44.15	1.65-1.61(m, 1H)	44.21
15	2.18-2.10(m, 1H), 0.68(dd, $J=16, 3.4$ Hz, 1H)	35.62	-	-	2.19-2.11(m, 1H), 0.71(dd, $J=12, 3.4$ Hz, 1H)	35.58	2.29-2.18(m, 1H), 0.89(dd, $J=16.0, 4.0$ Hz, 1H)	36.11
16	0.72(s, 3H)	13.18	-	-	0.73(s, 3H)	13.22	0.68(s, 3H)	13.18
17	-	47.40	-	-	-	47.49	-	47.41
18	0.82(s, 3H), 0.81(s, 3H) ^d	18.57, 19.48 ^g	-	-	0.83(s, 3H), 0.81(s, 3H) ^d	18.58, 19.51 ^e	0.86(s, 3H), 0.83(s, 3H)	18.59, 19.49 ^g
19				-				
20	-	169.53	-	-	-	173.26	-	-
21	2.05(s, 3H)	20.38	-	-	4.13(dt, $J=5.8, 3.0$ Hz, 1H), -OH, 5.51(d, $J=6.6$ Hz, 1H)	71.46	-	-
22	-	-	-	-	2.86(m, 1H), 2.55(m, 1H)	39.24	-	-
23	-	-	-	-	-	128.76	-	-
24	-	-	-	-	6.66-6.59(m, 4H) ^c	119.99	-	-
25	-	-	-	-	-OH, 8.72(d, $J=37.8$ Hz, 4H) ^f	144.86	-	-
26	-	-	-	-		143.77	-	-
27	-	-	-	-	6.66-6.59(m, 4H) ^c	115.32	-	-
28	-	-	-	-	6.43(dd, $J=8.0, 1.8$ Hz, 1H)	116.81 ^f	-	-

注:a 为在 1D 与 2D NMR 数据的基础上归属(DMSO - d₆, ¹H - NMR, 400 MHz, δ : ppm; ¹³C - NMR, 101 MHz, δ : ppm; J : Hz); b 为 C₂ - H 与 C₅ - H 重叠; c 为 C₁₂ 与 C₁₃ 的 H 相互重叠; d 为不能区分 C₁₈ - H 与 C₁₉ - H; e 为 C₂ - H, C₅ - H, C₂₄ - H, C₂₇ - H 重叠; f 为 C₃ - OH, C₄ - OH, C₂₅ - OH, C₂₆ - OH 重叠; g 为不能区分 C₁₈ - C 与 C₁₉ - C。- 代表空白。

Note: a is assigned based on 1D and 2D NMR data (DMSO - d₆, ¹H - NMR, 400 MHz, δ : ppm; ¹³C - NMR, 101 MHz, δ : ppm; J : Hz); b is the overlap between C₂ - H and C₅ - H; c is the overlap between C₁₂ - H and C₁₃ - H; d cannot distinguish between C₁₈ - H and C₁₉ - H; e is the overlap of C₂ - H, C₅ - H, C₂₄ - H, C₂₇ - H; f is the overlap of C₃ - OH, C₄ - OH, C₂₅ - OH, C₂₆ - OH; g cannot distinguish between C₁₈ - C and C₁₉ - C. - refers to the blank.

1H)。详见表 2。结合 ¹³C - NMR(表 2), 上述谱图表征结果与分子式 C₂₁H₂₈O₆ 相符, 且该分子具有丹参素冰片酯^[20]及乙酰基的显著特征, 确定杂质 A 为乙酰 α - 羟基 DD - DBZ。其推导化学结构式见图 8 A。

杂质 B: 为类白色固体, 在 286 nm 波长处有最大吸收(图 4 B), 其具有羰基、苯环与酚羟基典型官能团(图 5 B)。高分辨质谱分析结果显示, $m/z = 225.076\ 2$, $[M - 1]^-$, 计算值为 225.076 3; $m/z = 271.081\ 6$, $[M + \text{COOH}]^-$,



A. 杂质 A B. 杂质 B C. 杂质 C D. 杂质 D

图 8 DD-DBZ 与杂质 A-D 的化学结构式

A. Impurity A B. Impurity B C. Impurity C D. Impurity D

Fig. 8 Chemical structural formula of DD-DBZ and impurities

A-D

计算值为 271.081 8。详见图 6 B。¹H-NMR 信号结果显示,杂质 B 具有 1 个甲基[1.13(t, $J = 7.1$ Hz, 3H)], 2 个亚甲基氢[4.04(q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.79-2.59(m, 2H)], 1 个羟基氢[5.43(d, $J = 6.0$ Hz, 1H)], 1 个烷氧基氢[4.14-4.07(m, 1H)], 3 个苯环氢[6.60(d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.59(s, 1H), 6.43(dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H)], 2 个酚羟基氢[8.72(s, 1H), 8.64(s, 1H)]。详见表 2。结合 ¹³C-NMR 分析数据(表 2)及文献[21]的文献值,确定杂质 B 为丹参素乙酯,分子式为 C₁₁H₁₄O₅。其推导化学结构式见图 8 B。

杂质 C:为褐色油状物,在 284 nm 波长处有最大吸收(图 4 C),具有羰基、苯环与酚羟基典型官能团(图 5 C)。¹H-NMR 信号分析结果显示,杂质 C 具有 3 个典型冰片甲基[0.83(s, 3H), 0.81(s, 3H), 0.73(s, 3H)], 5 个亚甲基氢[3.00-2.90(m, 2H), 2.86(m, 1H), 2.55(m, 1H), 2.19-2.11(m, 1H), 1.75-1.68(m, 1H), 1.68-1.61(m, 1H), 1.24-1.19(m, 1H), 1.08-1.05(m, 1H), 0.71(d, $J = 12, 3.4$ Hz, 1H)], 1 个次甲基氢[1.61-1.58(m, 1H)], 1 个羟基氢[5.51(d, $J = 6.6$ Hz, 1H)], 3 个烷氧基氢[5.06(t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.75(d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.13(dt, $J = 5.8, 3.0$ Hz, 1H)], 6 个苯环氢[6.66-6.59(m, 4H), 6.50(dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H), 6.43(dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H)], 4 个酚羟基氢[8.72(d, $J = 37.8$ Hz, 4H)]。详见表 2。通过与 DD-DBZ、杂质 A、杂质 C 的 NMR 图谱对比发现,杂质 C 有 2 个丹参素片段及 1 个冰片片段,同时结合 ¹H-NMR 的 4 个酚羟基信号及 2D HMBC(C₈-H 与 C₂₀相关)信号,其 2 个丹参素片段

是由 1 个丹参素的羰基与另 1 个丹参素的 α -羟基以酯键的形式结合。除不能区分 C₁₈与 C₁₉的 2 个甲基的碳、氢外,其他碳、氢归属均可通过 1D NMR 与 2D COSY、HSQC 与 HMBC 确认(表 2)。结合高分辨质谱分析结果, $m/z = 513.2140$, $[M-1]^-$, 计算值为 513.2125, 确定杂质 C 为右旋双丹参素冰片酯,分子式为 C₂₈H₃₄O₉。其推导化学结构式见图 7 C。

杂质 D:为白色固体,在 286 nm 波长处有最大吸收(图 4 D),具有羰基、苯环与酚羟基典型官能团(图 5 D)。高分辨质谱分析结果显示,杂质 D 与 DD-DBZ 的相对分子质量相同, $m/z = 333.1700$, $[M-1]^-$, 计算值为 333.1702; $m/z = 379.1756$, $[M+COOH]^-$, 计算值为 379.1757。详见图 6 D。¹H-NMR 信号与 DD-DBZ 类似,具有 3 个甲基[0.86(s, 3H), 0.83(s, 3H), 0.68(s, 3H)], 4 个亚甲基氢[2.79-2.63(m, 2H), 2.29-2.18(m, 1H), 1.86-1.77(m, 1H), 1.74-1.65(m, 1H), 1.24-1.14(m, 2H), 0.89(dd, $J = 16.0, 4.0$ Hz, 1H)], 1 个次甲基氢[1.65-1.61(m, 1H)], 1 个羟基氢[5.43(d, $J = 6.0$ Hz, 1H)], 2 个烷氧基氢[4.74(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.14(q, $J = 6.2$ Hz, 1H)], 3 个苯环氢[6.60(s, 1H), 6.59(d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.44(dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H)], 2 个酚羟基氢[8.68(s, 1H), 8.61(s, 1H)]。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 的化学位移与 DD-DBZ 仅有微弱差异(图 9)。其中, DD-DBZ 的 1 个 C-15 H [0.70(dd, $J = 13.6, 3.4$ Hz, 1H)]的化学位移与 DL-DBZ 的 1 个 C-15 H [0.89(dd, $J = 13.9, 3.6$ Hz, 1H)]的化学位移差异显著,可作为 DD-DBZ 与 DL-DBZ 异构体的特征区别峰。鉴于冰片原料中含约 1% 左旋冰片,推测杂质 D 为右旋丹参素-左旋冰片酯(DL-DBZ),分子式为 C₁₉H₂₆O₅。其推导化学结构式见图 8 D。

3 讨论

药物中的杂质按来源可分为工艺杂质(包括合成中未反应完全的反应物及试剂、中间体、副产物等)、降解产物、反应物、由原料引入等。本研究中主要研究了 DD-DBZ 的工艺杂质及反应物中引入的相关杂质,采用 RP-HPLC 法监测了反应过程,并通过色谱分析与结果对比,确定杂质 A-D 的产生包括反应过程、纯化过程、由原料引入 3 种情况。1)反应过程。丹参素为 α -羟基酸,反应过程中与冰片酯化生成产物 DD-DBZ 的同时,还可与 DD-DBZ 的 α -羟基进一步酯化生成杂质 C。同时,由于天然提取的冰片中含左旋冰片,故在合成反应过程中会产生杂质 D。2)纯化过程。在萃取与纯化过程中,由于 DD-DBZ 与乙酸乙酯接触时间较长,尤其在硅胶拌样过程中,硅胶多孔吸附,产生催化效应,使乙酸乙酯与 DD-DBZ 的 α -羟基、酯基进行酯交换,进而

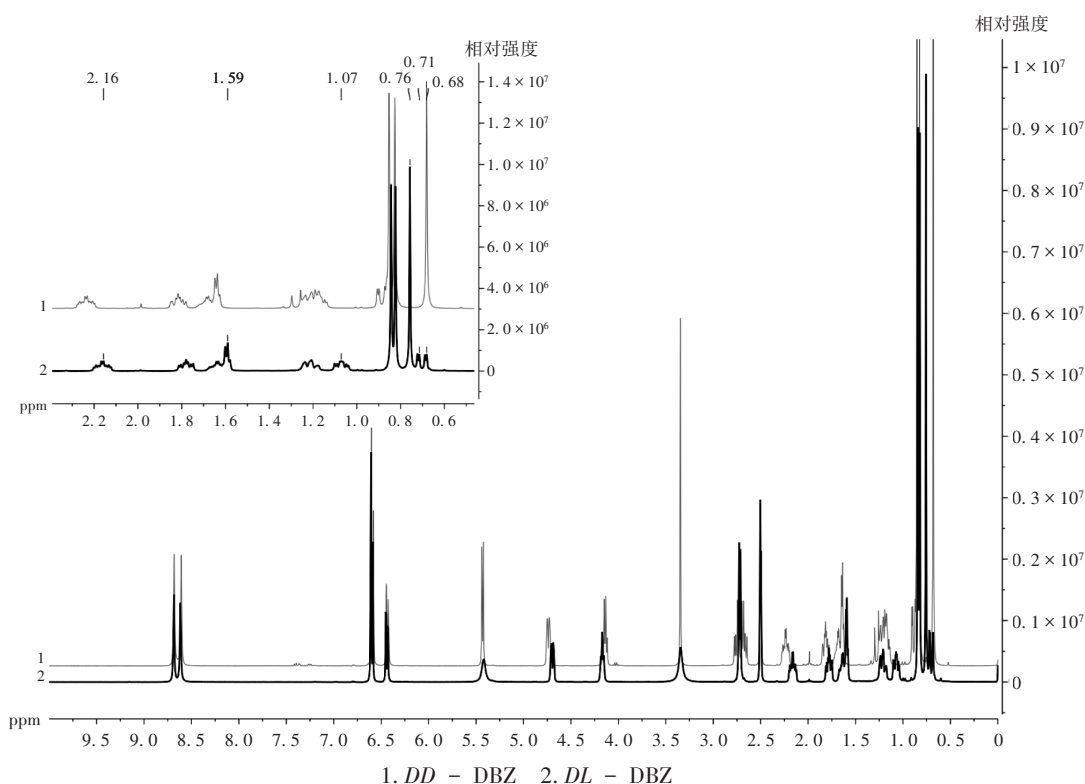


图9 DD-DBZ 与 DL-DBZ ¹H-NMR 图谱

1. DD-DBZ 2. DL-DBZ

Fig. 9 DD-DBZ and DL-DBZ ¹H-NMR spectra

产生杂质 A 和杂质 B,两者均未在反应过程中出现。
3)由原料引入。市售右旋冰片约含 1% 梅片(左旋冰片),难以除掉,故参与反应产生杂质 D(即 DL-DBZ),该杂质与产品 DD-DBZ 的结构、性质相近,采用常规色谱方法难以除掉,故本研究中采用超临界流体色谱、手性色谱柱获取少量杂质 D 标准品。但该方法不适用于大规模的分离纯化,故有效控制右旋冰片中梅片的含量是后期解决该杂质含量多少的核心与关键。

综上所述,右旋丹参素右旋冰片酯生产过程中,应严格控制生产工艺、原料等,才能有效控制杂质含量。

参考文献

- [1] 田海林,周晓伟,陈明,等. 丹参素冰片酯的不对称合成研究[J]. 中国药物化学杂志,2012,22(2):113-116.
- [2] 刘佩,秦方刚,白亚军,等. 丹参素异丙酯/冰片酯的合成及手性拆分研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),2015,45(3):413-417.
- [3] 左正龙,惠民权,申旭霖,等. 丹参素冰片酯乳剂中丹参素冰片酯和冰片的含量测定[J]. 中国药业,2012,21(3):18-20.
- [4] 王雨轩. 丹参素冰片酯脂肪乳注射液的制备、质量标准及药代动力学研究[D]. 咸阳:陕西中医学院,2012.
- [5] 王玥月. 丹参素冰片酯长循环纳米结构脂质载体的制备及其脑靶向性能研究[D]. 西安:西北大学,2016.
- [6] 李霞,李继,赵新锋,等. 毛细管气相色谱法测定丹参素冰片酯中有机溶剂残留[J]. 中国药业,2014,23(23):55-56.

- [7] LIAO S, WU JN, LIU RM, et al. A novel compound DBZ ameliorates neuroinflammation in LPS-stimulated microglia and ischemic stroke rats: Role of Akt(Ser473)/GSK3β(Ser9) mediated Nrf2 activation[J]. Redox Biology, 2020, 36: 101644.
- [8] 贾璞,廖莎,杨璐萌,等. “良关系”化合物丹参素冰片酯抗神经炎症作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2019,33(9):709.
- [9] 杨璐萌. “良关系化合物”DBZ 抗神经炎症作用及 QXs 设计合成研究[D]. 西安:西北大学,2017.
- [10] 赵诣林. DBZ 和 IDHP 对低氧刺激人脐静脉内皮细胞的保护作用及机制研究[D]. 西安:第四军医大学,2016.
- [11] 王雪,杨婧,袁红,等. 丹参素冰片酯对同型半胱氨酸诱导大鼠骨髓间充质干细胞损伤的保护作用及机制[J]. 中华心血管病杂志,2017,45(2):130-136.
- [12] YUAN X, FEI F, SUN H, et al. Tanshinol borneol ester on nanostructured lipid carriers has longer brain and systemic effector retention and better antioxidant activity *in vivo*[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 2265-2274.
- [13] 张易. 丹参素冰片酯对实验性脑缺血损伤大鼠的保护作用研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
- [14] LIAO S, HAN LW, ZHENG XP, et al. Tanshinol borneol ester (DBZ), a novel synthetic small molecule angiogenesis stimulator inspired by botanical formulations for angina pectoris[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(17):3143-3160.
- [15] WANG J, MA CC, LI QN, et al. Metabolites identification of Tanshinol Borneol Ester in rats by high performance liquid