

黄芩素中有关物质的检测及其降解机制初步研究^Δ

王玮珏^{1*},董武军¹,张培成²,苏倩倩¹,范茹涵³,刘玉玲^{1#}(1.中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室,北京 100050;2.中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室,北京 100050;3.郑州大学药学院,郑州 450001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0803-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.23

摘要 目的:建立黄芩素中有关物质的分离检测方法,鉴定其结构并初步探讨降解机制。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)检测黄芩素与合成过程中的有关杂质及强制破坏降解产物;色谱柱为ES Industries[®] FluoroSep-RP Phenyl,流动相为0.3%甲酸-甲醇-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为275 nm,柱温为10 ℃,进样量为10 μL。采用LC-串联质谱法鉴定有关物质并推测降解机制;色谱柱为ES Industries[®] FluoroSep-RP Phenyl,流动相为0.3%甲酸-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为275 nm,柱温为10 ℃,进样量为10 μL;离子源为电喷雾离子源,正负离子同时检测,雾化器压力为55 psi,干燥气体流速为11 L/min,干燥气体温度为350 ℃,毛细管电压为4.0 kV,检测模式为全扫描一级质谱和选择离子全扫描二级质谱,扫描范围为 m/z 100~1 000(一级质谱),50~500(二级质谱),电离电压为80~135 eV,碰撞能量为10~30 eV。结果:黄芩素检测质量浓度线性范围为2.4~480 μg/mL($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;定量限、检测限分别为7.2、2.4 ng。黄芩素与有关物质及3个主要降解产物分离良好,有关物质为化学合成前体木蝴蝶素;碱降解产物为6,7位邻醌衍生物和7,8位邻醌衍生物,两者互为异构体;氧化降解产物为苯甲酸苯酯类衍生物。结论:黄芩素碱降解和氧化降解的主要机制包括吡喃环开环、互变更排和氧化反应等;该研究所建方法专属性好、灵敏度高,可用于黄芩素有关物质的分离检测。

关键词 黄芩素;有关物质;降解机制;高效液相色谱法;液相色谱-串联质谱法

Detection of Related Substances and Preliminary Study on the Degradation Mechanism of Baicalein

WANG Weijue¹, DONG Wujun¹, ZHANG Peicheng², SU Qianqian¹, FAN Ruhan³, LIU Yuling¹ (1.Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2.State Key Laboratory of Bioactive Substances and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3.School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the separation and detection of related substances in baicalein, identify its

- 成像研究[J].电子显微学报,2012,31(4):346-349.
- [6] 陈召红,刘皈阳,魏亚超.脂质体包封率测定方法研究进展[J].解放军药学报,2011,27(1):79-82.
- [7] 邵红霞,奉建芳,龙晓英.脂质体包封率的测定方法[J].中南药学,2009,7(3):212-215.
- [8] 陈蓓,袁明奎,王建华,等.葡聚糖凝胶柱色谱法测定阿苯达唑纳米脂质体包封率的方法研究[J].中国药房,2012,23(45):4281-4284.
- [9] 赵锋,栾瀚森,罗华菲,等.葡聚糖凝胶色谱法用于纳米粒包封率的测定[J].中国药学杂志,2012,47(17):1385-1390.
- [10] 李学涛,唐炜,姜英,等.转铁蛋白修饰长春新碱-粉防己碱脂质体中主药含量及包封率的测定[J].中国药房,2016,27(22):3034-3036.
- [11] 万胜利,钟萌,赵德璋,等.葡聚糖凝胶柱色谱法测定姜黄素囊泡包封率[J].激光杂志,2015(2):142-144.
- [12] 白兰,赵明琴,尹蓉莉,等.龙胆苦苷脂质体含量测定及包封率考察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):48-50.
- [13] 郑杭生,佐拉·沙肯迪克,王湘林,等.离心沉淀-离心超滤法测定盐酸青藤碱脂质体的包封率[J].中草药,2011,42(8):1523-1527.
- [14] 李琅琅,王文喜,牛泱平.低速离心法测定荧光红GG脂质体包封率[J].浙江工业大学学报,2009,37(5):535-537.
- [15] 刘卫斌,薛彦宁,秦永刚.鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J].中国药房,2010,21(39):3695-3697.

(收稿日期:2016-10-16 修回日期:2016-12-12)

(编辑:刘柳)

Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2012ZX09301002-001-008);中央高校基本科研业务费专项“创新药物发现与新技术专项”(No.2012CHX03)

* 硕士研究生。研究方向:纳米给药系统。电话:010-83160332。E-mail: doggiejue@163.com

通信作者:研究员,博士生导师。研究方向:新型微粒载体构建及肿瘤靶向制剂等。电话:010-63159373。E-mail: ylliu@imm.ac.cn

structure and preliminarily explore the degradation mechanism. METHODS: HPLC was adopted to detect the baicalein, related impurities and forced destruction of degradation products in synthesis process: the column was ES Industries® FluoroSep-RP Phenyl with mobile phase of 0.3% formic acid-methanol-acetonitrile (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 275 nm, the column temperature was 10 °C, and the injection volume was 10 μL. LC-MS/MS was conducted to identify the related substances and conjecture degradation mechanism: the column was ES Industries® FluoroSep-RP Phenyl with mobile phase of 0.3% formic acid - methanol (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 275 nm, column temperature was 10 °C, and the injection volume was 10 μL; ion source was electrospray ion source, positive and negative ions, nebulizer pressure was 55 psi and the drying gas flow was 11 L/min, drying gas temperature was 350 °C, capillary voltage was 4.0 kV, detection modes were full-scan first-order MS and selective ion full-scan second-order MS, scan ranges were *m/z* 100-1 000 (first-order MS) and 50-500 (second-order MS), ionization voltage was 80-135 eV, and the collision energy was 10-30 eV. RESULTS: The linear range of baicalein was 2.4-480 μg/mL ($r=0.9999$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; the limit of quantitation was 7.2 ng, the limit of detection was 2.4 ng. Baicalein was well separated with related substance and 3 major degradation products, the related substance was chemical synthesis precursor wood butterfly; the degradation products were 6, 7-quinone derivatives and 7, 8-quinone derivatives, which were isomers; oxidative degradation products were benzoic acid phenyl ester derivatives. CONCLUSIONS: The main mechanisms of alkali degradation and oxidative degradation of baicalein include pyran, reciprocal rearrangement and oxidation reaction; the established method is specific and sensitive, and can be used for the detection of related substances in baicalein.

KEYWORDS Baicalein; Related substance; Degradation mechanism; HPLC; LC-MS/MS

黄芩素 (Baicalein, BE) 是黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的主要活性成分之一, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$, 化学名为 5,6,7-三羟基黄酮 (5,6,7-Trihydroxyflavone), 化学结构见图 1。研究表明, 黄芩素具有显著的抗菌、抗病毒、清除自由基、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、保肝、保护神经元等药理作用^[1-4], 含有黄芩素成分的中药制剂在临床上已被广泛用于治疗细菌或病毒引起的急慢性肠炎、痢疾、上呼吸道感染、急慢性结膜炎等。但受溶解度低、化学性质不稳定等理化性质限制, 黄芩素单一成分至今未能成药。

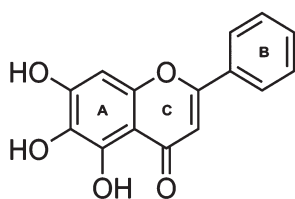


图 1 黄芩素的化学结构

Fig 1 Chemical structure of baicalein

黄芩素属多羟基黄酮, 分子结构中含有三个羟基, 在溶液状态尤其是碱性条件下极易发生化学降解, 降解机制复杂。含有酚羟基的黄酮易被氧化为醌类衍生物, 由于降解产物结构的特殊性, 且通常为系列降解产物, 高效液相色谱法 (HPLC) 常用的 C_{18} 、 C_8 、苯基、腈基、氨基等色谱柱往往难以对降解产物进行有效分离与检测。文献采用 HPLC 考察黄芩素在不同 pH 的 Krebs-Ringer 试液中的稳定性, 发现在 pH 6.0、6.8、7.4 条件下药物含量均显著降低, 但该报道未对降解产物进行测定^[5]。另有文献通过紫外光谱研究光照、温度、pH 及抗氧化剂对黄芩素稳定性的影响, 发现在光照和碱性条件下黄芩素溶液的吸光度值显著下降, 其含量明显降低, 但该文献亦未对黄芩素降解产物进行分离检测和结构鉴定^[6]。有

研究报道了黄芩素原料药有关物质的 HPLC 分析方法, 但最终仅鉴定检测了千层纸素 A, 未能提供黄芩素的降解情况及降解产物结构信息^[7]。本课题组曾参考文献^[7]方法对黄芩素有关物质进行考察, 发现碱破坏降解产物多、峰形差且堆积在溶剂峰后, 难以有效分离, 无法满足有关物质测定要求。

虽然普遍认为黄酮类化合物的降解产物多为醌类结构^[8-9], 但关于黄芩素的降解产物类型及其结构至今尚不清楚。而关于黄芩素系列降解产物的有效分离与检测, 国内外亦均未见文献报道, 这在一定程度上影响了黄芩素制剂的开发和临床应用。本课题组以全合成的黄芩素为试验样品, 拟通过优化 HPLC 色谱条件, 实现黄芩素与工艺杂质及破坏降解产物的有效分离; 并进一步结合二极管阵列 (DAD) 紫外光谱分析和液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 一级、二级质谱信息收集, 对降解产物进行结构鉴定, 由此推测黄芩素降解机制, 为后续的黄芩素制剂研发提供准确、科学的质量控制方法。

1 材料

1.1 仪器

1100 型 HPLC 仪 (包括 DAD 检测器、自动进样器、柱温箱)、1200 型 LC-6410 型三重串联四级杆质谱仪 (包括 DAD 二极管阵列检测器、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子源、三重四级杆质谱仪) 均购自美国 Agilent 公司; XS105 Dual Range 型电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂

黄芩素原料药 (中国医学科学院药物研究所自制, 批号: HJ73); 黄芩素对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111595-200905, 纯度: 98.5%); 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取黄芩素对照品 12 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液 精密称取黄芩素原料药 12 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得。

2.1.3 强制破坏样品溶液 精密称取黄芩素原料药 60 mg, 加甲醇溶解并定容至 25 mL, 作为贮备液, 备用。

①酸破坏样品溶液: 精密量取上述贮备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 0.01 mol/L 盐酸 1 mL, 30 °C 水浴加热 30 min, 再加甲醇定容, 摇匀, 即得。

②碱破坏样品溶液: 精密量取上述贮备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 0.01 mol/L 氢氧化钠 0.5 mL, 30 °C 水浴加热 20 min, 加 0.01 mol/L 盐酸 0.5 mL 中和, 再加甲醇定容, 摇匀, 即得。

③氧化破坏样品溶液: 精密量取上述贮备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 10% 过氧化氢 1 mL, 30 °C 水浴加热 30 min, 再加甲醇定容, 摇匀, 即得。

④高温破坏样品溶液: 精密量取上述贮备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 置于 80 °C 烘箱中加热 24 h, 冷却后加甲醇定容, 摇匀, 即得。

⑤光照破坏样品溶液: 精密量取上述贮备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 于 (4 500 ± 500) lx 强光下照射 24 h, 再加甲醇定容, 摇匀, 即得。

2.2 有关物质分离检测

2.2.1 色谱条件 色谱柱: ES Industries® FluoroSep-RP Phenyl(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.3% 甲酸溶液 (A)-甲醇(B)-乙腈(C), 梯度洗脱(洗脱程序见表 1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 275 nm; 柱温: 10 °C; 进样量: 10 μL。

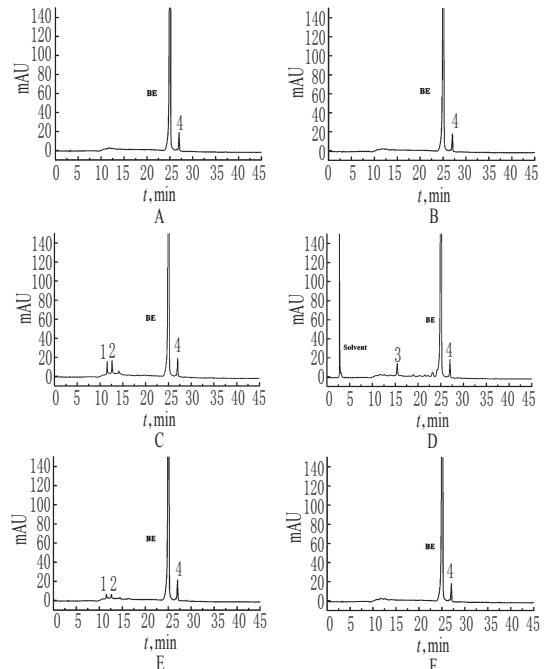
表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

时间, min	A, %	B, %	C, %
0~5	85	15	0
7~15	40	60	0
25~40	42	0	58
41~46	85	15	0

2.2.2 专属性试验 分别量取“2.1”项下供试品溶液和强制破坏样品溶液各 10 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 2。结果表明, 样品在各强制降解条件下产生的主要降解产物与黄芩素分离良好, 主要降解产物之间均有效分离, 分离度均 > 1.5, 理论板数均 ≥ 10 000, 表明本方法专属性良好, 能够将降解产物有效分离, 满足有关物质测定要求。

2.2.3 线性关系考察 精密称取黄芩素对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 2.4、4.8、24、48、120、240、480 μg/mL 的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各 10 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以黄芩素质量浓度 (x , μg/mL) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归, 得黄芩素回归方程为 $y = 56.42x - 24.37$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 黄芩素检测质量浓度线性范围为 2.4~480 μg/mL。



A. 供试品; B. 酸破坏样品; C. 碱破坏样品; D. 氧化破坏样品; E. 高温破坏样品; F. 光照破坏样品; 1~4. 杂质 1~4

A. test sample; B. test sample destroyed by acid; C. test sample destroyed by alkaline; D. test sample destroyed by oxidation; E. test sample destroyed by high temperature; F. test sample destroyed by illumination; 1-4. impurity 1-4

图 2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.2.4 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察 取“2.2.3”项下质量浓度为 24 μg/mL 的对照品溶液, 逐级稀释, 精密量取各级对照品溶液各 10 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。当信噪比为 10:1 时, 得 LOQ 为 7.2 ng; 当信噪比为 3:1 时, 得 LOD 为 2.4 ng。

2.2.5 精密度试验 取“2.2.3”项下质量浓度为 240 μg/mL 对照品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 黄芩素峰面积的 RSD = 1.4% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液、“2.2.3”项下质量浓度为 240 μg/mL 对照品溶液适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、8 h 时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 供试品、对照品溶液中黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.5%、1.4% ($n = 5$), 表明供试品、对照品溶液未产生新的杂质, 溶液在 8 h 内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取黄芩素对照品适量, 加甲醇制成含量为 100% 的供试品溶液, 共 6 份, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 黄芩素峰面积的 RSD = 1.3% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.8 样品中杂质的测定 精密称取黄芩素原料药 12 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 作为供试品溶液; 精密量取上述供试品溶液 1 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 作为对照溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 调节检测灵敏度, 使主成分色

谱峰的峰高约为满量程的20%。分别精密量取上述供试品溶液、对照品溶液各10 μL,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以不加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量。结果表明,黄芩素原料药中单个最大杂质的含量为2.08%,总杂质含量为2.37%。

2.2.9 有关物质来源分析及紫外光谱测定 由图2可知,黄芩素强制破坏样品中主要有4个杂质,其保留时间分别为11.5、12.6、15.4、27.0 min,依次命名为杂质1、杂质2、杂质3、杂质4。在酸破坏和光照破坏条件下,黄芩素未产生明显的降解产物,表明其对酸、光照的稳定性良好;黄芩素在碱破坏和高温破坏条件下主要形成杂质1、杂质2,氧化破坏主要形成杂质3,表明碱、氧化条件对黄芩素稳定性的影响最为显著;在各强制破坏条件下,杂质4的含量均未见明显改变,推测该杂质可能为合成过程中产生的副产物。

取“2.1”项下供试品溶液、强制破坏样品溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件(检测波长为200~400 nm)连续进样测定6次,记录DAD吸收曲线,详见图3。结果,杂质1、杂质2、杂质3的紫外光谱形态和最大吸收均与黄芩素有明显差异,表明其共轭骨架结构与黄芩素不同;而杂质4具有典型的黄酮化合物紫外光谱特征,且与黄芩素相似,表明其化学结构与黄芩素相近。

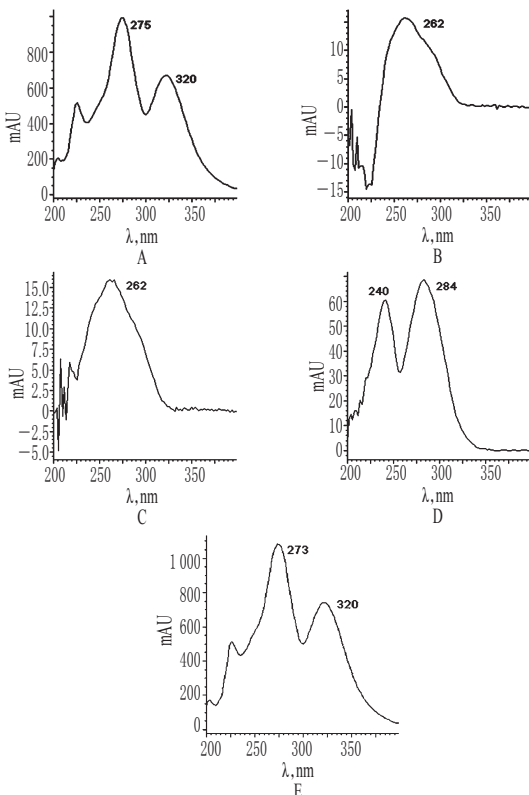


Fig 3 DAD absorption spectrum
A. baicalin; B. impurity 1; C. impurity 2; D. impurity 3; E. impurity 4

图3 DAD吸收曲线
Fig 3 DAD absorption spectrum

2.3 有关物质结构鉴定及降解机制推测

2.3.1 LC-MS/MS条件 ①色谱条件。色谱柱:ES In-

dustries® FluoroSep-RP Phenyl(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相:0.3%甲酸(A)-甲醇(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:1.0 mL/min;检测波长:275 nm;柱温:10 ℃;进样量:10 μL。该色谱条件下获得的色谱与“2.2”项下的HPLC色谱一致性良好。②质谱条件。离子源:电喷雾离子源(ESI),正负离子同时检测;雾化器压力:55 psi;干燥气体流速:11 L/min;干燥气体温度:350 ℃;毛细管电压:4.0 kV;检测模式:全扫描一级质谱(Scan)和选择离子全扫描二级质谱;扫描范围 m/z 一级质谱100~1 000,二级质谱50~500;电离电压:80~135 eV;碰撞能量:10~30 eV。

表2 梯度洗脱程序
Tab 2 Program of gradient elution

时间, min	A, %	B, %
0~5	85	15
7~15	40	60
25~40	0	100
41~45	85	15

2.3.2 结构鉴定和降解机制推测 黄芩素在碱、氧化条件下的降解最为显著,因此分别量取“2.1.3”项下碱破坏、氧化破坏样品溶液各适量,按“2.3.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录色谱、总离子流(TIC),详见图4、图5。

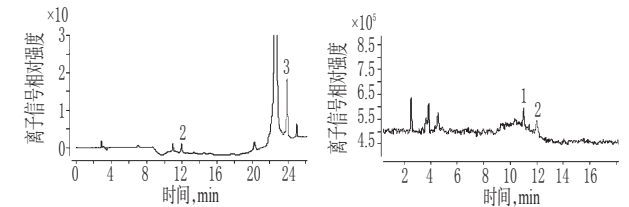


Fig 4 Atlas of samples destroyed by alkaline
A. HPLC; B. TIC; 1. impurity 1; 2. impurity 2; 3. impurity 4

图4 碱破坏样品的图谱
Fig 4 Atlas of samples destroyed by alkaline

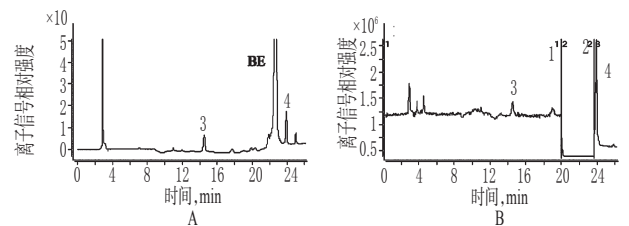
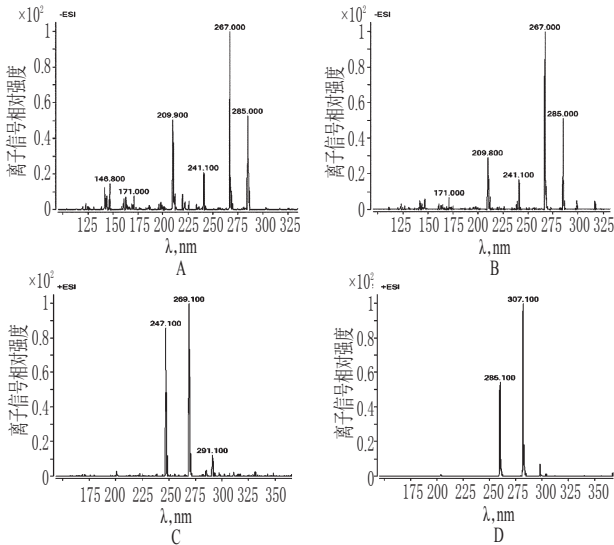


Fig 5 Atlas of samples destroyed by oxidation
A. HPLC; B. TIC; 1. impurity 1; 2. impurity 2; 3. impurity 3; 4. impurity 4

图5 氧化破坏样品的图谱
Fig 5 Atlas of samples destroyed by oxidation

由图4、图5可知,在LC-MS/MS系统中,黄芩素主峰及主要杂质的保留时间、出峰顺序与HPLC系统基本一致。通过TIC图提取与杂质1~4对应的一级质谱和二级碎片信息,鉴定杂质结构并分析降解机制。各杂质的一级、二级质谱分别见图6、图7。

杂质1和杂质2的一级质谱高度相似(如图6A和B所示),均可观察到 m/z 171、210、241、267 $[M-H-H_2O]^-$ 、

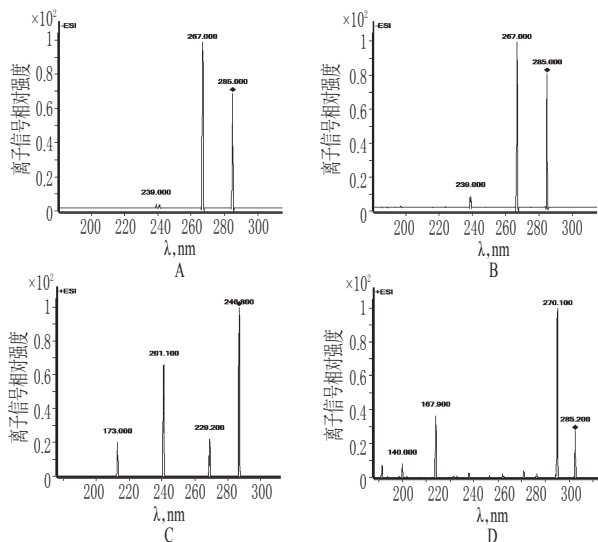


A. 杂质1; B. 杂质2; C. 杂质3; D. 杂质4

A. impurity 1; B. impurity 2; C. impurity 3; D. impurity 4

图6 杂质的一级质谱图

Fig 6 First-order MS of impurities



A. 杂质1; B. 杂质2; C. 杂质3; D. 杂质4

A. impurity 1; B. impurity 2; C. impurity 3; D. impurity 4

图7 杂质的二级质谱图

Fig 7 Second-order MS of impurities

285[M-H]⁻,可知杂质1、杂质2的分子量为286。杂质1和杂质2的母离子(*m/z* 285)产生的二级碎片(-ESI)分别如图7A和B所示,由285[M-H]⁻脱去H₂O产生碎片*m/z* 267,再脱去CO产生*m/z* 239,碎片质量数和相对丰度基本相同,故推测二者是同分异构体。黄芩素的分子量为270,此分子量286比黄芩素多16,可能是1个氧原子,结合DAD吸收曲线可知,二者的紫外光谱只有一个吸收峰,表明不具有黄酮母体共轭结构,杂质1和杂质2可能的结构、裂解途径见图8。由于化合物的保留时间与极性相关,在反相HPLC中杂质2的保留时间比杂质1大,表明杂质2的极性较小,推测杂质2是分子偶极较小的7,8位邻醌式结构,而杂质1是分子偶极较大的6,7位邻醌式结构,二者是一对异构体。

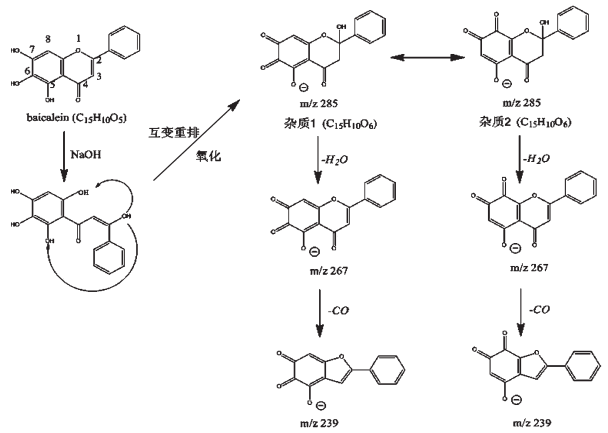


图8 黄芩素碱降解机制及杂质1、杂质2的结构、裂解途径

Fig 8 Alkaline degradation mechanism of baicalein and structures and fragmentation pathways of impurity 1, impurity 2

杂质1和杂质2是黄芩素的碱降解产物,据此推测碱降解机制为在碱性条件下,黄芩素C环发生开环反应,产生类似查尔酮的中间结构,通过Wessely-Moser重排反应^[10,11]生成互变异构体,同时A环羟基在空气中氧的作用下氧化成醌,生成杂质1和杂质2。

杂质3的一级质谱(+ESI)如图6C所示,可观察到*m/z* 247[M+H]⁺、269[M+Na]⁺,故分子量为246。杂质3母离子(*m/z* 247)的二级碎片如图7C所示,由*m/z* 247脱去H₂O产生碎片*m/z* 229,再依次脱去CO产生碎片*m/z* 201[M+H-H₂O-CO]⁺和*m/z* 173[M+H-H₂O-2CO]⁺。杂质3的DAD吸收曲线有2个吸收峰,与黄芩素相比,其最大吸收波长发生蓝移,表明杂质3共轭链缩短,可能不具有黄酮母核结构,其可能的结构和裂解过程见图9。

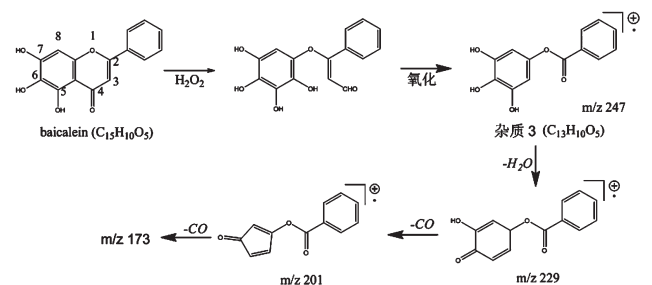


图9 黄芩素氧化降解机制及杂质3的结构、裂解途径

Fig 9 Oxidative degradation mechanism of baicalein and structure and fragmentation pathway of impurity 3

杂质3由黄芩素氧化降解产生,推测氧化降解机制为在过氧化氢作用下,黄芩素的C环发生开环反应,A环脱去羟基,2,3位碳-碳双键被氧化,产生苯甲酸苯酯类产品。

杂质4的一级质谱(+ESI)如图6D所示,可观察到*m/z* 285[M+H]⁺、307[M+Na]⁺,故分子量为284;其母离子(*m/z* 285)的二级质谱如图7D所示,由*m/z* 285脱去CH₃

产生 m/z 270, 再通过逆狄尔斯-阿德尔反应(RDA)裂解产生 m/z 168, m/z 168 丢失 CO 产生碎片离子 m/z 140, 因此可确定杂质 4 含有甲氧基^[12], 推测为黄芩素 A 环羟基被甲氧基取代的黄酮类化合物; 杂质 4 的紫外吸收光谱与文献报道的木蝴蝶素一致^[13], 结合原料药合成工艺路线^[14], 推测杂质 4 是黄芩素的化学合成前体——木蝴蝶素, 其结构及可能的裂解过程见图 10。

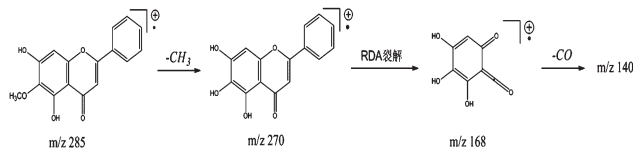


图 10 杂质 4 的结构、裂解途径

Fig 10 Structure and fragmentation pathway of impurity 4

3 讨论

黄酮类化合物化学降解机制复杂, 采用不同降解条件所得的产物不同, 鉴定降解产物的结构困难, 文献报道黄芩素易被氧化为醌类衍生物而显绿色^[15], 但黄芩素在不同条件下降解所得的产物结构和降解机制至今尚不清楚。本研究通过 HPLC-DAD、LC-MS/MS 对黄芩素强制降解产物进行分析和结构鉴定, 并以此推测其降解机制, 结果表明: (1) 在碱性条件下, 黄芩素吡喃环发生开环反应, 经 Wessely-Moser 反应互变重排成异构体, 同时 A 环酚羟基经空气氧化, 降解产生 6, 7 位邻醌类结构(杂质 1)和 7, 8 位邻醌类结构(杂质 2), 两者为互变异构体。(2) 在氧化条件下, 黄芩素吡喃环发生开环反应, 2, 3 位双键在过氧化氢作用下氧化断裂, 产生苯甲酸苯酯类结构(杂质 3)。

本研究在 HPLC 法色谱条件优化中, 考察了不同键合相填料的色谱柱, 包括 C_{18} 、 C_8 、苯基、腈基、氨基、苯基己基和氟苯基柱, 以及不同柱温 ($10\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$) 对分离检测结果的影响。结果发现, 含苯基键合相的色谱柱及低温有利于降解产物分离, 不仅实现了主成分与工艺杂质及降解产物的分离, 还实现了醌类降解产物及其互变异构体的相互分离; 而其他色谱填料, 黄芩素碱降解产物易堆积在溶剂峰后且峰形较差。推测原因, 可能是由于醌类降解产物及其互变异构体的化学结构和分子极性都极为相近, 而氟苯基色谱柱同时具有疏水作用、 π - π 电子相互作用及偶极诱导作用, 对芳香和杂环化合物、共轭体系及异构体等产生独特的分离机制, 更有利于降解产物分离。因此, 最终采用 FluoroSep-RP Phenyl (FSP) 氟苯基色谱柱, 在柱温 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 进行有关物质检测分离。

本研究建立的 HPLC 法, 能够有效分离检测黄芩素合成过程中的工艺杂质及系列降解产物, 在此基础上,

对其主要降解产物进行了结构鉴定, 推测了其降解机制。研究结果不仅为黄芩素制备工艺优化及质量控制提供了重要分析方法, 同时对黄酮类化合物的有关物质及降解机制研究具有一定指导意义。

参考文献

- [1] 辛文好, 宋俊科, 何国荣, 等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 647-653, 659.
- [2] 梁颖, 杨新建, 王雷. 黄芩素滴丸对动物过敏反应的影响[J]. 中国药房, 2013, 24(3): 206-208.
- [3] Chiu YW, Lin TH, Huang WS, et al. Baicalein inhibits the migration and invasive properties of human hepatoma cells[J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2011, 255(3): 316-320.
- [4] 杨阳, 周桂琼, 王再勇, 等. 6 种黄酮类化合物拮抗肝细胞毒性作用的比较[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(4): 289-291.
- [5] 刘太明. 黄芩苷和黄芩素的吸收机制研究[D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [6] 姚亚红, 张立伟. 黄芩素稳定性研究[J]. 光谱实验室, 2006, 23(2): 346-349.
- [7] 张桥, 陈保来, 谢雪, 等. 百可利原料药中的主要有关物质成分分析[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2014, 16(7): 1569-1572.
- [8] Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry[J]. *Cheminform*, 2014, 84(18): 206-211.
- [9] Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation[J]. *Trends in Food Sci Tech*, 2010, 21(1): 3-8.
- [10] Minassi A, Giana A, Ech-Chahad A, et al. A regiodivergent synthesis of ring a C-prenylflavones[J]. *Org Lett*, 2008, 10(11): 2267-2272.
- [11] Vitae VA, Vitae PA. Chemistry of biologically important flavones[J]. *Tetrahedron*, 2012, 68(41): 8523-8530.
- [12] 张培成. 黄酮化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 108.
- [13] 苏亚伦, 黄聿, 陈振宇, 等. 甘肃黄芩抗氧化有效成分的分离鉴定[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 863-866.
- [14] Kim S, Sohn DW, Kim YC, et al. Fine tuning of a reported synthetic route for biologically active flavonoid, baicalein[J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(1): 18-25.
- [15] 王雷, 王学艳, 周雪琴, 等. 黄芩苷在不同溶媒中的稳定性研究[J]. 中国药师, 2006, 9(2): 129-131.

(收稿日期: 2016-04-27 修回日期: 2016-06-30)

(编辑: 张 静)