

沙咪珠利中间体 4-硝基邻甲酚中未知杂质的结构确证

张丽芳, 朱建德, 王米, 王霄旸, 赵娟, 费陈忠, 郑文丽, 张可煜, 王春梅, 肖遂, 薛飞群^{*}(中国农业科学院上海兽医研究所, 中国农业科学院兽药安全评价与残留研究重点开放实验室, 农业部动物寄生虫学重点开放实验室动物药理学研究室, 上海 200241)

摘要: 目的 对沙咪珠利中间体 4-硝基邻甲酚中一未知杂质进行结构确证。方法 经重氮水解水蒸气蒸馏法制备沙咪珠利中间体 4-硝基邻甲酚中一未知杂质, 采用高分辨质谱、核磁共振和红外光谱分析等技术对其进行结构确证。结果 未知杂质的化学结构被确证为 4,6-二硝基邻甲酚。结论 中间体 4-硝基邻甲酚中一未知杂质的结构确证对沙咪珠利质量控制和生产工艺的改进具有重要作用。

关键词: 沙咪珠利; 4-硝基邻甲酚; 杂质; 4,6-二硝基邻甲酚; 结构确证

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)06-0683-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.06.01

Structural Elucidation of an Unknown Impurity in 4-Nitro-o-cresol, an Intermediate of Acetamizuril

ZHANG Lifang, ZHU Jiande, WANG Mi, WANG Xiaoyang, ZHAO Juan, FEI Chenzhong, ZHENG Wenli, ZHANG Keyu, WANG Chunmei, XIAO Sui, XUE Feiqun^{*}(Department of Pharmacology, Key Open Laboratory of Animal Parasitology of Ministry of Agriculture, Key Open Laboratory of Veterinary Drug Safety Evaluation and Residues Research of Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Shanghai 200241, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify the structure of an unknown impurity in 4-nitro-o-cresol, an intermediate of acetamizuril. **METHODS** The impurity was prepared through diazotization hydrolysis and steam distillation. The structure was confirmed by MS, HMR and IR analysis. **RESULTS** The impurity was identified as 4,6-dinitro-o-cresol. **CONCLUSION** It is very important for the structure identification of the impurity to control the quality and synthesis process improvement of acetamizuril.

KEY WORDS: acetamizuril; 4-nitro-o-cresol; impurity; 4,6-dinitro-o-cresol; structural elucidation

鸡球虫病系由一种或几种鸡艾美耳球虫引起的以肠道病变为主的细胞内寄生虫病, 是一种具有高度传染性的寄生虫病。在养鸡业中, 现阶段防治鸡球虫病的主要手段是使用抗球虫药进行化学防治^[1]。

沙咪珠利是由中国农业科学院上海兽医研究所动物药理学研究室研发的具有自主知识产权的抗球虫新化合物。已有研究结果显示, 沙咪珠利不仅具有良好的抗球虫效果[抗球虫指数(ACI)达 185~200], 且无致畸、致癌、致突变作用, 具有良好的应用前景, 可能成为一种新型抗球虫药物^[2]。

药物的纯度对于疗效、不良反应的影响很大。控制中间体中的杂质对于药物的纯度控制具

有重要意义。4-硝基邻甲酚是合成沙咪珠利的重要中间体。研究发现, 制备的中间体 4-硝基邻甲酚中存在一未知杂质, 经 HPLC 测定, 面积归一化计算, 杂质含量>5%。为了弄清杂质成因, 以便进一步工艺优化保证沙咪珠利的质量, 本研究合成了这一未知杂质, 并采用高分辨质谱、核磁共振和红外光谱等分析技术确证其化学结构。

1 仪器与材料

2690 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)配置 2487 型紫外检测器、Diamondsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国迪马公司); Impact HD 型四极杆飞行时间高分辨质谱仪(德国 Bruker 公司); Avance III 400 MHz 型核磁共振波谱仪(德

基金项目: 国家科技计划项目(2011AA10A214); 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303038)

作者简介: 张丽芳, 女, 硕士, 研究员 Tel: (021)34293396
E-mail: fqxue@shvri.ac.cn

E-mail: twinzhang@shvri.ac.cn ^{*}通信作者: 薛飞群, 男, 博士, 研究

国 Bruker 公司); Nicolet is10 型傅立叶红外光谱仪(美国 Thermo 公司); MP1100B 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

红色基 RL(吴江市荣泰染料有限公司); 4-硝基邻甲酚(中国农业科学院上海兽医研究所); 硫酸、甲苯、亚硝酸钠均为化学纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 甲醇(色谱级, 美国 Fisher 公司)。

2 方法

2.1 未知杂质的制备

将含 7.6 g(0.05 mol)红色基 RL、25 mL 硫酸和 100 mL 水的混合液加入装有搅拌器的 250 mL 四口反应瓶中, 搅拌降温至 10~15 °C, 慢慢滴加 3.8 g(0.06 mol)亚硝酸钠溶于 10 mL 水中。滴加完毕后进行水蒸气蒸馏, 收集黄色混浊馏出液。过滤, 30 °C 真空干燥得黄色粉末。

2.2 沙咪珠利中间体 4-硝基邻甲酚的 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液(65:35); 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C; 检测波长为 251 nm; 进样量为 10 μL。

2.2.2 4-硝基邻甲酚和未知杂质溶液的配制 分别称取 4-硝基邻甲酚(批号: 20150601)和未知杂质适量, 用甲醇溶解, 分别制成浓度约 0.5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.2.3 未知杂质的仪器测定

¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT 等采用氘代二甲亚砜为溶剂, TMS 为内标, ¹H-NMR 的观测频率为 399.95 MHz, ¹³C-NMR 观测频率为 100.58 MHz, 质谱以注射杆直接进样方式进样, 采用 ESI⁺方式电离, 红外光谱采用 KBr 法。

3 结果与讨论

3.1 HPLC 测定

4-硝基邻甲酚的 HPLC 图见图 1, 未知杂质(Rt: 11.4 min)和 4-硝基邻甲酚(Rt: 8.0 min)达良好分离。经面积归一化计算未知杂质的含量达 7.2%。

制备的未知杂质经 HPLC 测定(图 1), 面积归一化计算未知杂质的含量达 99%。可满足化合物结构鉴定的样品要求。

3.2 核磁共振波谱测定结果的解析

¹H-NMR 谱(图 2A)中出现 4 组氢峰, 根据积分曲线比例 1:1:1:3 可知该化合物的化学结构中存在 6 个氢, 根据化学位移 δ 2.34, 3 个氢的单

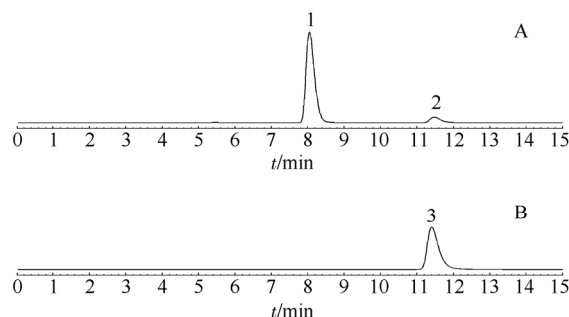


图 1 4-硝基邻甲酚和未知杂质的高效液相色谱图

A-4-硝基邻甲酚; B-制备的未知杂质; 1-4-硝基邻甲酚; 2-杂质; 3-未知杂质。

Fig. 1 HPLC Chromatograms of 4-nitro-o-cresol and an unknown impurity

A-4-nitro-o-cresol; B-unknown impurity; 1-4-nitro-o-cresol; 2-impurity; 3-unknown impurity.

峰, 表明此化合物结构中存在一个甲基-CH₃; δ 8.37 和 δ 8.58 两峰, 耦合常数为 2.4 Hz, 表明此化合物结构中存在一个苯环, 并且苯环上有 2 个氢, 由于这两峰的化学位移往低场移动, 表明苯环上一定存在吸电子基团; δ 9.86 的宽馒头峰, 表明此化合物结构中可能存在一个活泼氢, 而通过重水交换 ¹H-NMR 谱(图 2B)中 δ 9.86 的宽馒头峰的消失进一步证实此化合物结构中存在一个活泼氢。根据经验化学位移值可判定此氢为酚羟基上的氢。

宽带去偶 ¹³C-NMR(图 2C)中出现 7 组峰, 表明此化合物结构中存在 7 个碳, 根据化学位移 δ 16.2, 进一步表明此化合物结构中存在一个 -CH₃, 另 6 组碳峰证实为苯环上碳。根据 DEPT135 谱(图 2D)δ 119.1 和 δ 129.8 中的 2 组峰, 判定苯环上存在 2 个 -CH 结构, 其他苯环上的氢均被取代基取代。

3.3 高分辨质谱测定结果与解析

未知杂质经过高分辨率质谱测定, 得分子量为 197.0197。由此确定该化合物的分子式为 C₇H₆N₂O₅。

3.4 红外光谱测定结果的解析

红外光谱图(图 3)显示, 在 3 235 cm⁻¹ 和 1 232 cm⁻¹ 处有强吸收, 表明该化合物含有酚羟基结构。1 339 cm⁻¹ 和 1 529 cm⁻¹ 的强吸收峰为硝基的反对称和对称伸缩振动, 表明该化合物化学结构中存在硝基。1 608 cm⁻¹ 和 1 450 cm⁻¹ 为苯环的骨架振动, 表明化合物中存在苯环。

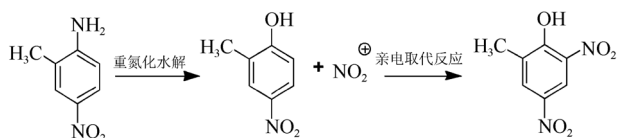


图5 4,6-二硝基邻甲酚产生的反应机理图

Fig. 5 Reaction mechanism diagram of generation of 4,6-Dinitro-o-cresol

REFERENCES

- [1] SUO X, LI G Q. Chicken Coccidiosis [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1998: 271.
- [2] WANG H X, WANG X Y, ZHANG L F, et al. Determination of methanol, ethanol and toluene in acetaminophen by gas chromatography [J]. Chin J Veterinary Medicine(中国兽药杂志), 2014, 48(3): 38-41.

收稿日期: 2015-09-27

银杏叶原花青素的制备及其抗氧化活性研究

黄海波^{1,3}, 刘华春², 金朱明¹, 董光辉¹, 乔洪翔^{3*}, 王如伟¹ (1.浙江康恩贝制药股份有限公司, 杭州 310052; 2.云南希康生物科技有限公司, 昆明 650217; 3.云南康恩贝植物研究院, 昆明 650217)

摘要: 目的 制备高纯度的银杏原花青素, 为系统研究银杏来源的原花青素提供物质基础。方法 利用 NP-HPLC 方法指导大孔树脂及聚酰胺树脂的纯化工艺, 分析并定量所得原花青素提取物中黄酮杂质的组成及含量, 用 DPPH 法比较银杏和葡萄籽来源的原花青素的抗氧化活性。结果 制备得到的银杏原花青素提取物中原花青素的含量>90%, 黄酮杂质含量仅为 3.44%, DPPH 清除率 IC₅₀ 为 22.87 μg·mL⁻¹, 葡萄籽原花青素 IC₅₀ 为 36.99 μg·mL⁻¹。结论 本研究工艺可制备获得高纯度的银杏原花青素, 其抗氧化活性较葡萄籽原花青素更强。

关键词: 银杏; 原花青素; 提取物; 黄酮; 抗氧化活性; 树脂

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)06-0686-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.06.02

Proanthocyanidins from *Ginkgo Biloba* L. and Their Anti-oxidant Activities

HUANG Haibo^{1,3}, LIU Huachun², JIN Zhuming¹, DONG Guanghui¹, QIAO Hongxiang^{3*}, WANG Ruwei¹ (1.Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China; 2.Yunnan Xikang Biological Technology Co. Ltd., Kunming 650217, China; 3.Yunnan Institute of Botany of Conba Group, Kunming 650217, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare highly purified proanthocyanidins from *Ginkgo biloba* L., so as to provide material base for the systematic study of proanthocyanidins from *Ginkgo biloba* L.. **METHODS** The purification processes of macroporous resins and polyamide resin were optimized by using NP-HPLC methods; qualitative and quantitative analysis of flavonoid, the impurity of *Ginkgo biloba* proanthocyanidin extract(GPE), was realized by HPLC with different chromatographic conditions; the anti-oxidant activities of proanthocyanidins from *Ginkgo biloba* L. and grape seed were compared by DPPH assay. **RESULTS** The purity of proanthocyanidins in GPE was >90%, and the content of flavonoid was only 3.44%. The GPE exhibited higher DPPH radical scavenging activity with IC₅₀ 22.87 μg·mL⁻¹ than that of grape-seed proanthocyanidins with IC₅₀ 36.99 μg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The process of this study could be prepared to obtain high-purity GPE, and its antioxidant activity is better than grape-seed proanthocyanidin.

KEY WORDS: *Ginkgo biloba* L.; proanthocyanidins; extract; flavonoid; anti-oxidant activities; resin

原花青素是一种具有黄烷-3-醇结构的植物多酚类化合物, 也是一种缩合鞣质, 有着广泛的药理学活性, 包括抗氧化、抗炎、抗辐射、抗病毒、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等^[1-3]。银杏叶及其制剂

中也含有丰富的原花青素, 但银杏叶原花青素的组成与葡萄籽原花青素的组成区别极大^[4]: 银杏叶原花青素由(表)没食子儿茶素组成的 Prodelphinidin, 比例高达 85%; 而由(表)儿茶素组

基金项目: 国家重大新药创制项目(2011ZX09203-001-18); 浙江省科技计划项目(2009E10009); 浙江省科技计划项目(2009C13027)

作者简介: 黄海波, 男, 硕士, 高级工程师 Tel: (0571)87774831 E-mail: huanghb@conbagroup.com *通信作者: 乔洪翔, 男, 博士, 高级工程师 Tel: (0571) 87774831 E-mail: qiaohx@conbagroup.com。