

核磁共振和液相色谱-质谱法对苯丙哌林未知杂质的结构分析

孙煌, 付瑾莹, 周润宏, 白政忠

(黑龙江省食品药品检验检测所, 哈尔滨 150088)

摘要 目的: 建立利用仪器分析苯丙哌林未知杂质化学结构的方法, 并对 2 个未知杂质进行结构确证。**方法:** 采用 Inertsil ODS-3 (4.6 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱, 以甲醇-0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵缓冲液 (取醋酸铵 0.77 g, 加水 800 mL 溶解, 用冰醋酸调节 pH 至 3.3, 用水稀释至 1 000 mL) (65:35) 为流动相, 流速 0.25 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 270 nm。用 HPLC-MS/MS 分析 2 个未知杂质, 使用制备液相进行分离纯化, 通过核磁共振 (¹H-NMR、¹³C-NMR、HMBC、HSQC、DEPT135、H-H COSY) 技术, 对苯丙哌林及其未知杂质进行结构确证。**结果:** 首次发现并确定苯丙哌林 2 个未知杂质的结构, 分别为 1-[2-(2-苯甲酰基苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶和 1-[2-(2-苄基-6-氯苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶。**结论:** 该方法可为苯丙哌林的质量控制提供依据。

关键词: 苯丙哌林; 有关物质; 核磁共振波谱; 液相色谱质谱联用; 波谱归属; 杂质结构确证

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 11-2000-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.11.12

Structural analysis of unknown impurities in benproperine by NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry

SUN Huang, FU Cui-ying, ZHOU Run-hong, BAI Zheng-zhong

(Heilongjiang Institute for Food and Drug Control, Harbin 150088, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of unknown impurities in benproperine and identify the structure of two unknown impurities. **Methods:** An Inertsil ODS-3 (4.6 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm) column was adopted for the study. The mobile phase was methanol-0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ sodium acetate buffer solution (Take ammonium acetate 0.77 g, dissolved by 800 mL of water, adjust the pH to 3.3 by acetic acid, diluted with water to 1 000 mL) (65:35). The flow rate was 0.25 mL $\cdot$ min⁻¹, the detection wavelength was 270 nm. Two impurities were analyzed by HPLC-MS/MS, and was then separated and purified by preparative HPLC, and the structure were confirmed by nuclear magnetic resonance (¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC, HSQC, DEPT135, H-H COSY). **Results:** Two unknown impurities were 1-[2-(2-benzoylphenoxy)-1-methylethyl] piperidine and 1-[2-(2-benzyl-6-chlorophenoxy)-1-methylethyl] piperidine. **Conclusion:** The established method can provide a comprehensive reference for quality control of benproperine.

Keywords: benproperine; related substances; NMR; HPLC-MS/MS; assignment; structure identification of impurity

苯丙哌林(benproperine)为非成瘾性镇咳药。能抑制咳嗽中枢,也能抑制肺及胸膜牵张感受器引起的肺-迷走神经反射,且有平滑肌解痉作用,是中枢性和末梢性双重作用的强效镇咳药,其镇咳作用比可待因强^[1-3]。该药目前我国使用广泛,但至今尚无有关苯丙哌林杂质 NMR 谱的数据报道,现有文献^[3-8]多是使用液相进行有关物质或含量测定的研究。本文首次通过 HPLC-MS/MS 及 NMR 对苯丙哌林原料药中的 2 个未知杂质进行了分析,确定杂质为杂质 A: 1-[2-(2-苯甲酰基苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶; 杂质 B: 1-[2-(2-苄基-6-氯苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶,结构式见图 1。并对两杂质的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱进行了全归属,确定其结构,为该药杂质的结构解析提供了 NMR 数据,对该药的质量研究和应用具有指导意义。

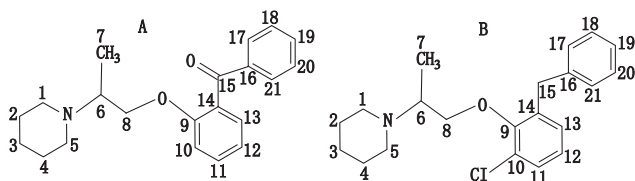


图 1 苯丙哌林中杂质 A (A) 和杂质 B (B) 结构式

Fig. 1 Structure of impurity A (A) and B (B) in benproperine

1 仪器与试剂

Bruker 400 核磁共振仪; Thermofisher TSQ Quantum Discovery MAX 质谱仪, 配有 ESI 离子源; Thermofisher U3000 型高效液相色谱仪。

甲醇、冰醋酸、乙酸铵均为色谱纯, 购自默克公司; 氘代甲醇购自 CIL 公司; 水为实验室自制超纯水; 磷酸苯丙哌林原料药由厂家提供; 磷酸苯丙哌林对照品(批号 100237-201303) 购自中国食品药品检定研究院。

2 实验条件^[3, 12-14]

色谱柱: Inertsil ODS-3 (十八烷基硅烷键合硅胶, 4.6 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm, 迪马公司); 流动相: 甲醇-0.01 mol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸铵缓冲液(取醋酸铵 0.77 g, 加水 800 mL 溶解, 用冰醋酸调节 pH 至 3.3, 用水稀释至 1 000 mL)(65:35); 流速: 0.25 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长: 270 nm; 进样量: 10 μL 。

离子源: ESI 源; 电压: 4.3 kV; 鞘气(N₂): 25 arb; 辅助气(N₂): 5 arb; 碰撞气(Ar): 1.5 mTorr; 离子传输毛细管温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 采用全扫描一级质谱及

全扫描二级质谱同时测定。

核磁共振仪器 ¹H-NMR 的工作频率为 400 MHz, ¹³C-NMR 工作频率为 100 MHz, 氘代甲醇为溶剂。进行 ¹H-NMR、¹³C-NMR、HMBC、HSQC、DEPT135 和 H-H COSY 的扫描。

3 样品处理方法

3.1 HPLC-MS/MS 分析样品溶液的制备 称取苯丙哌林原料药 40 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶液溶解并定容至刻度, 混匀即得。

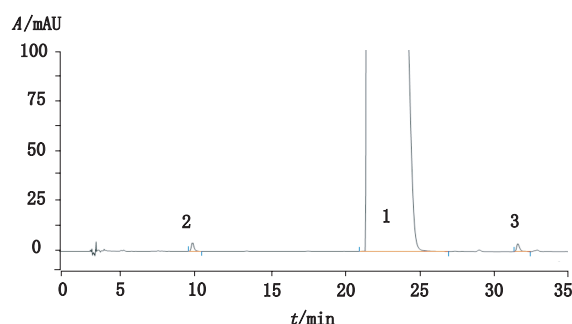
3.2 NMR 分析样品溶液的制备

称取苯丙哌林原料药 15 g, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 使用制备液相对未知杂质进行分离及纯化, 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干, 2 mL 水复溶后使用十八烷基键合硅胶为填充剂的固相萃取柱进行脱盐, 脱盐后样品 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干, 室温条件下减压干燥过夜, 使用 0.5 mL 氘代甲醇复溶。

4 结果

4.1 HPLC-MS/MS 分析

在苯丙哌林的色谱图中, 可确定其含有 2 个明显杂质, 见图 2。通过液相质谱联用得全扫描一级质谱图及全扫描二级质谱图见图 3。1、2 与 3 号峰的一级全扫描质谱图均出现 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 其 m/z 分别为 310、324 和 344。全扫描二级质谱图中均出现 m/z 为 126 的产物离子。由于三者含有相同的产物离子, 推测两未知杂质均为苯丙哌林的同系物。相同产物离子碎片结构式图 4。

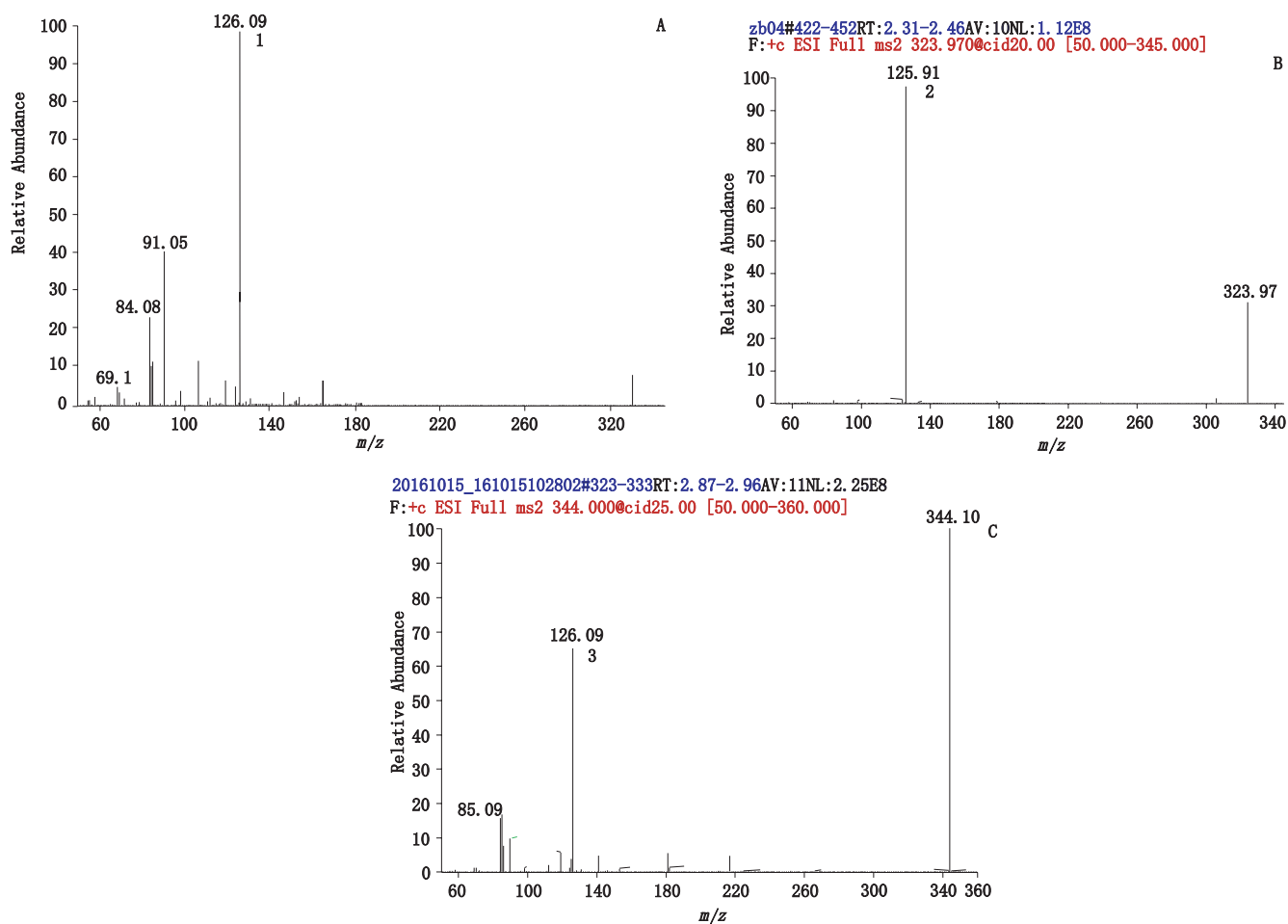


1. 苯丙哌林(benproperine) 2. 杂质 A(impurity A) 3. 杂质 B(impurity B)

图 2 苯丙哌林样品的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of benproperine sample

4.1.1 杂质 A 质谱分析 杂质 A (2 号色谱峰) 一级质谱质核比与苯丙哌林相差 14, 与苯丙哌林二级质谱相比, 其二级质谱图中不存在 m/z 为 91 的卓鎂离子, 推测杂质 A 为苯丙哌林苯环区连接两苯环的 15 位碳由亚甲基变为羰基。



1. 苯丙哌林 (benproperine) 2. 杂质 A (impurity A) 3. 杂质 B (impurity B)

图3 苯丙哌林 (A)、杂质 A (B) 及杂质 B (C) 的 LC-MS 全扫描二级质谱图

Fig. 3 ESI-MS/MS spectra of benproperine (A), impurity A (B) and impurity B (C)

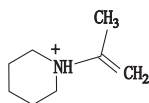


图4 二级质谱产物离子碎片结构式

Fig. 4 Structure of the same product-ion of benproperine and impurities in benproperine

4.1.2 杂质 B 质谱分析 杂质 B (3 号色谱峰) 一级质谱质核比与苯丙哌林相差 34, 同时杂质 B 一级质谱图中存在 m/z 为 344 与 346 2 个较强峰, m/z 344 的离子强度为 100, m/z 346 的离子强度为 34, 满足含 1 个氯元素化合物的同位素峰 3:1 的特征, 怀疑杂质 B 苯环存在 1 个氯取代的情况。由于杂质 B 二级质谱图存在 m/z 为 91 的卓鎗离子, 说明苯环区连接两苯环的 15 位碳亚甲基无变化, 推测氯取代在中间的苯环上而非端基苯环上, 但氯取代的具体位置无法确定, 需进一步进行核磁共振谱分析, 以确定氯取代的

位置。

4.2 NMR 分析^[9]

结合苯丙哌林的核磁谱及文献报道^[10], 苯丙哌林含有 21 个碳, 其中含有 3 个季碳及 1 个手性碳。通过 ^{13}C 谱及 DEPT135 谱可知, 两个杂质分别含有 21 个碳, 均含有 4 个季碳。其中杂质 A 含有 δ_{C} 198.95 的季碳, 结合质谱结果, 确定其为 15 位羰基碳。杂质 B 中第 4 个季碳与 11 和 12 位氢相关, 与 15 位氢无相关, 确定其为苯环上 10 位的氢被氯取代。分别对杂质 A 和杂质 B 的 ^1H 和 ^{13}C 数据作完全的归属。

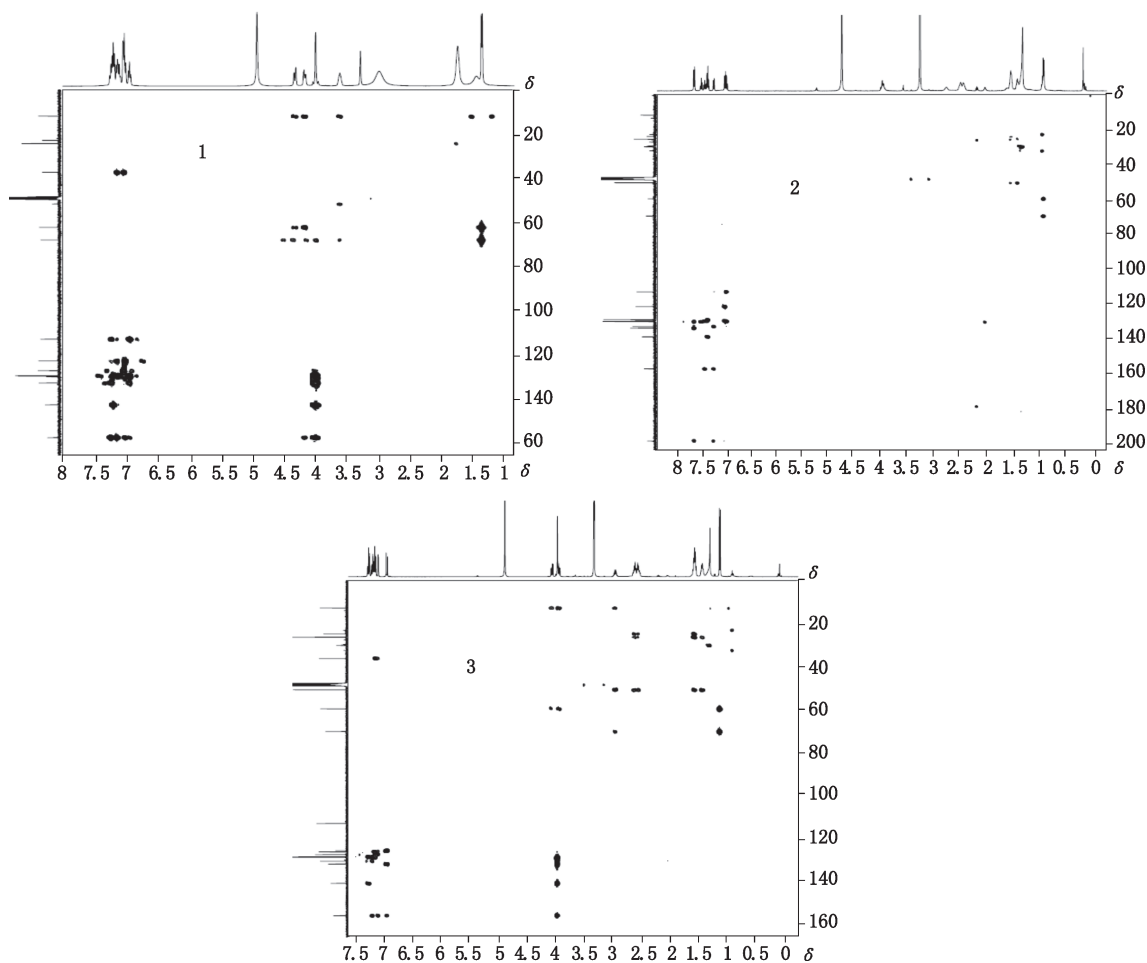
杂质 A 的 HMBC 谱解析如下: δ_{H} 0.88 (3H, d) 与 C6、C8 相关, 归属为 H-7; δ_{H} 1.29 (2H, broad s) 与 C1~C4 相关, 归属为 H-3; δ_{H} 1.52 (4H, broad s) 与 C1~C5 相关, 归属为 H-2 和 H-4; δ_{H} 2.46~2.51 (4H, broad d) 与 C1~C5 相关, 归属为 H-1 和 H-5; δ_{H} 2.79 (1H, broad s) 与 C1 和 C5 相关, 归属为 H-6; δ_{H} 4.00~4.09 (2H, m)

与 C7 相关, 归属为 H-8; δ_{H} 7.10~7.16 (2H, m) 与 C10、C12 和 C13 相关, 归属为 H-10 和 H-12; δ_{H} 7.36~7.38 (1H, m) 与 C9、C14 相关, 归属为 H-11; δ_{H} 7.12~7.13 (2H, m) 与 C16、C18 和 C20 相关, 归属为 H-18 和 H-20; δ_{H} 7.52~7.57 (1H, m) 与 C9、C14 相关, 归属为 H-13; δ_{H} 7.59~7.62 (1H, m) 与 C17、C21 相关, 归属为 H-19; δ_{H} 7.74~7.76 (2H, m) 与 C19 相关, 归属为 H-17 和 H-21。

杂质 B 的 HMBC 谱解析如下: δ_{H} 1.12 (3H, d) 与 C6、C8 相关, 归属为 H-7; δ_{H} 1.41~1.45 (2H, m) 与 C1~C4 相关, 归属为 H-3; δ_{H} 1.53~1.59 (4H, m) 与 C1~C5 相关, 归属为 H-2 和 H-4; δ_{H} 2.51~2.64 (4H, m) 与 C1~C5 相关, 归属为 H-1 和 H-5; δ_{H} 2.90~2.98 (1H, m) 与 C1、C5、C6、C7 和 C8 相关, 归属为 H-6; δ_{H}

3.90~3.94 (1H, dd) 和 4.03~4.06 (1H, dd) 与 C7 和 C6 相关, 归属为 H-8; δ_{H} 3.94~3.98 (2H, m) 与 C9、C14、C16、C17、C21 相关, 归属为 H-15; δ_{H} 6.91~6.94 (1H, d) 与 C9、C10、C14 相关, 归属为 H-12; δ_{H} 7.12~7.13 (2H, m) 与 C17、C19 和 C21 相关, 归属为 H-17 和 H-21; δ_{H} 7.22~7.26 (2H, m) 与 C16、C17、C18、C20 和 C21 相关, 归属为 H-18 和 H-20; δ_{H} 7.15~7.19 (2H, m) 与 C9、C10 和 C17、C21 相关, 归属为 H-11 和 H-19。

根据以上的分析, 可确认杂质 A 为 1-[2-(2-苯甲酰基苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶, 杂质 B 为 1-[2-(2-苄基-6-氯苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶, HMBC 相关谱见图 5, ^1H 和 ^{13}C 信号归属见表 1。



1. 苯丙哌林 (benproperine) 2. 杂质 A (impurity A) 3. 杂质 B (impurity B)

图 5 苯丙哌林、杂质 A 及杂质 B 的 HMBC 谱图

Fig. 5 HMBC spectra of benproperine and impurity A and impurity B

表 1 未知杂质的 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 数据Tab. 1 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR data of unknown impurity in benproperine

位置 (position)	化学位移 (chemical shift)			
	杂质 A (impurity A)		杂质 B (impurity B)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	51.39	2.46~2.51 (4H, broad d)	51.48	2.51~2.64 (4H, m)
2	26.44	1.52 (4H, broad s)	26.92	1.53~1.59 (4H, m)
3	30.75	1.29 (4H, broad s)	25.39	1.41~1.45 (2H, m)
4	26.44	1.52 (4H, broad s)	26.92	1.53~1.59 (4H, m)
5	51.39	2.46~2.51 (4H, broad d)	51.48	2.51~2.64 (4H, m)
6	60.48	2.79 (1H, broad s)	60.33	2.90~2.98 (1H, m)
7	12.75	0.88 (3H, d)	13.29	1.12 (3H, d)
8	70.41	4.00~4.09 (2H, m)	70.91	3.90~3.94 (1H, dd) 4.0 3~4.06 (1H, dd)
9	157.74	/	156.72	/
10	113.72	7.10~7.16 (2H, m)	126.41	/
11	134.45	7.36~7.38 (1H, m)	128.31	7.15~7.19 (2H, m)
12	122.15	7.10~7.16 (2H, m)	113.77	6.91~6.94 (1H, d)
13	130.40	7.52~7.57 (1H, m)	131.39	7.07~7.08 (1H, m)
14	130.34	/	132.72	/
15	198.95	/	36.85	3.94~3.98 (2H, m)
16	139.43	/	141.69	/
17	130.72	7.74~7.76 (2H, m)	129.61	7.12~7.13 (2H, m)
18	129.63	7.46~7.50 (1H, m)	129.36	7.22~7.26 (2H, m)
19	133.52	7.59~7.62 (1H, m)	127.05	7.15~7.19 (2H, m)
20	129.63	7.46~7.50 (1H, m)	129.36	7.22~7.26 (2H, m)
21	130.72	7.74~7.76 (2H, m)	129.61	7.12~7.13 (2H, m)

5 讨论

原有对苯丙哌林的研究未对其杂质进行结构确证。本文对苯丙哌林未知杂质进行了结构确证,通过 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMBC、HSQC、DEPT135 及 H-H COSY 核磁共振技术对化合物的结构进行了确认,苯丙哌林及杂质 B 氢谱中由于 6 位碳为手性碳,因此 8 位氢裂分为一对双二重峰;同时 15 位上的氢受两苯环的影响产生屋脊效应,裂分为中间高、两边低的多重峰。通过实验确定杂质 A 为 1-[2-(2-苯甲酰基苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶、杂质 B 为 1-[2-(2-苄基-6-氯苯氧基)-1-甲基乙基]哌啶,并对 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据进行了 HMBC 全归属。由于苯丙哌林较稳定^[6-7],可以初步判断杂质为合成

苯丙哌林原料不纯引起,且由于杂质与苯丙哌林结构极为相似,未能在纯化过程除去,从而引入到最终的苯丙哌林中。

参考文献

- [1] Martindale: the Extra Pharmacopoeia 37th Edition [S]. 2016: 1552
- [2] 钱之玉. 药理学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 478
QIAN ZY. Pharmacology [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2009: 478
- [3] 中国药典 2015 年版. 二部 [S]. 2015: 1571
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 1571
- [4] 刘克江, 陈怡. HPLC 法测定磷酸苯丙哌林颗粒的含量 [J]. 天津药学, 2004, 16(4): 10
LIU KJ, CHEN Y. Determination of benproperine phosphate

- granules by HPLC[J]. Tianjin Pharm, 2004, 16(4): 10
- [5] 欧阳冬华, 朱丹利, 陈雅萍. HPLC法测定磷酸苯丙哌林片的含量[J]. 安徽医药, 2008; 12(2): 135
- OUYANG DH, ZHU DL, CHEN YP. Determination of benproperine phosphate tablets by HPLC[J]. Anhui Med Pharm J, 2008, 12(2): 135
- [6] 王蓓, 高慧钦. 磷酸苯丙哌林口服溶液的有关物质研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(8): 1085
- WANG B, GAO HQ. Study of benproperine phosphate related substances by HPLC[J]. Mod J Integr Tradit Chin Western Med, 2007, 16(8): 1085
- [7] 傅强, 贺浪冲, 郭琦, 等. 高效液相色谱法测定磷酸苯丙哌林含量及有关物质[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(1): 55
- FU Q, HE LC, GUO Q, *et al*. HPLC determination of benproperine phosphate and its related substances[J]. Chin J Pharm Anal, 2006, 26(1): 55
- [8] 张军武, 赵琦. 磷酸苯丙哌林口服液中有关物质检查方法的改进[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(4): 205
- ZHAN JW, ZHAO Q. Improvement of detection of related substances in benproperine phosphate oral liquid[J]. Northwest Pharm J, 2008, 23(4): 205
- [9] 姚新生, 陈英杰, 徐绥绪, 等. 超导核磁共振波谱分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1991: 151
- YAO XS, CHEN YJ, XU SX, *et al*. NMR Spectrometer with Superconducting Magnet[M]. Beijing: China Medical Science Press, 1991: 151
- [10] LISE SCHJELDERUP, ARNE JORGEN AASEN. The absolute configuration of benproperinium dihydrogen phosphate, an antitussive drug[J]. Chirality, 1989, 1(1): 86
- [11] LI Y, ZHONG DF, CHEN SW, *et al*. Identification of some benproperine metabolites in humans and investigation of their antitussive effect[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(12): 1519
- [12] 黄海华, 崔洪霞, 钟大放, 等. 利用微生物转化模型研究苯丙哌林的代谢产物[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(4): 297
- HUANG HH, CUI HX, ZHONG DF, *et al*. Study on metabolites of benproperine using microbial model of transformation[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2001, 15(4): 297
- [13] 桂静, 宋林, 王凌. 人血浆中磷酸苯丙哌林的测定及其缓释制剂在人体内的生物等效性研究[J]. 华西药理学杂志, 2010, 25(3): 296
- GUI J, SONG L, WANG L. Determination of Benproperine phosphate in human plasma and bioavailability study of its preparations in healthy volunteers[J]. West China J Pharm Sci, 2010, 25(3): 296
- [14] 孙煌, 娄志红, 付瑾莹, 等. 核磁共振和液相色谱-质谱法对多索茶碱未知杂质的结构分析[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 443
- SUN H, LOU ZH, FU CY, *et al*. Structural analysis of an unknown impurity in doxofylline by NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(3): 443
- [15] 董宇, 王晓黎, 曲建国. 应用高效液相色谱-飞行时间质谱及离子阱质谱分析磷酸苯丙哌林中的杂质[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(19): 1585
- DONG Y, WANG XL, QU JG. Analysis of impurity in benproperine phosphate bulk drug by high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry and ion trap mass spectrometry[J]. Chin Pharm J, 2012, 47(19): 1585

(本文于2016年11月21日收到)