

线性变温法预测硫酸链霉素化学稳定性

庞贻慧 鲁纯素 肖振彰

(北京医学院药理学系)

提要 本文用线型变温法, 同时用经典恒温法, 对同一批号硫酸链霉素水溶液进行稳定性预测, 得到硫酸链霉素在 pH=6.50 水溶液中的分解活化能分别为 $E=33 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 及 $E=34 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; 室温速度常数分别为 $k_{20\cdot c}=5.7\times 10^{-8}\text{h}^{-1}$ 及 $k_{20\cdot c}=5.0\times 10^{-8}\text{h}^{-1}$ 。

关键词 线性变温法; 经典恒温动力学法; 稳定性预测方法; 硫酸链霉素; 活化能; 反应速度常数

预测药物稳定性通常采用的方法是在高于室温的恒温下, 加速药物分解, 测定其含量的变化, 然后根据 Arrhenius 指数规律, 求出室温时的速度常数 k 及贮存期 τ 。

Rogers⁽¹⁾与 Eriksen⁽²⁾等曾报道在变温过程中测室温速度常数的方法。大草直也⁽³⁾发展了这些方法, 并应用于缓慢分解药物的稳定性预测, 收到较好的效果。本文用自制 BJD-1 型程序升温仪以线型变温法作了硫酸链霉素水溶液的稳定性预测, 同时以经典恒温法对照。

原 理

一般动力学方程为:

$$\frac{-dc}{dt} = kc^n \quad (1)$$

式中速度常数 k 与温度有关。在变温动力学中, (1)式可写作:

$$-\frac{dc}{dt} = k[T(t)c^n] \text{ 或 } \frac{-dc}{c^n} = k[T(t)]dt \quad (2)$$

$k[T(t)]$ 表示 k 值是温度 T 的函数, 而温度 T 又是时间的函数。设不同温度下的 k 值符合 Arrhenius 规律, 则(2)的积分式可写作:

$$f(C_0) - f(C) = \int_0^t A e^{\frac{-E}{RT(t)}} dt \quad (3)$$

式中 E 为反应活化能, R 为气体常数, A 为频率因子, $f(C)$ 为浓度函数。对于一级反应, $[f(C_0) - f(C)]$ 应为 $(\ln C_0 - \ln C)$ 。

为了使(3)式等号右端容易积分, Rogers⁽¹⁾建议温度时间函数为:

$$\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_t} = a \ln(1+t) \quad (4)$$

这就是 Rogers 的变温规律, T_0 为开始时的开尔文 (Kelvin) 温度, T_t 为时间 t 时的开尔文温度, a 为常数。Rogers 根据不同药物的稳定性大小, 选择好 T_0 及最终 T_t , 并由 (4) 式确定 a 值后, 再用 (4) 式计算出不同时间 t 时所应具有 T_t 值, 实验时就在不同的时间 t 用手调变温使水浴达到这个相应的温度 T_t 。

在药物稳定性预测工作中, 加速稳定性试验的温度一般最高为 100°C , T_0 最低选为 25°C ,

加温一小时后制得四乙酰化合物, 因此贛乌碱的四个羟基为叔羟基, 四个羟基的位置只能在 $C_4, C_5, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{13}$ 和 C_{17} 位上。

将贛乌碱的 ^{13}C 核磁共振谱与 ranaconitine 加以比较, 贛乌碱的 C_{10} 信号比 ranaconitine 的向低场位移了 41.9 ppm, 并且在偏共振谱中, 贛乌碱的 C_{10} 为单峰, 而 ranaconitine 呈双峰出现。贛乌碱的 C_{11}, C_{12} 和 C_9 分别也比 ranaconitine 向低场位移了 5.6 ppm、11.2 ppm 和 1.1 ppm (由于 C_{11} 为唯一的季碳, 它的位移在偏共振谱中十分容易发现), 因此 C_{10} 上有 OH 取代。由于受到 $C_{10}\sim OH$ 的 ν -效应, C_1, C_5 和 C_{13} 分别向高场位移, 因而证实了 $C_{10}\sim OH$ 为 β 羟基。而贛乌碱的其他各碳均与 ranaconitine 一致, 因此推定贛乌碱的化学结构为 10- β -羟基-冉乌头碱。见表 1。

表 1 贛乌碱(A), Lappaconitine(B)和 Ranaconitine(C)的 ^{13}C -核磁共振谱

	贛乌碱	Ranaconitine	Lappaconitine		贛乌碱	Ranaconitine	Lappaconitine
C_1	77.1 d*	83.5	84.2	C_{17}	64.3 d	63.1	61.5
C_2	26.5 t	26.5	26.2	C_{18}	55.1 t	55.2	55.5
C_3	31.5 t	31.6	31.9	$-N-CH_2$	51.0 t	48.7	49.9
C_4	84.6 s	84.4	84.7	$ $ CH_3	14.5 q	14.4	13.5
C_5	44.0 d	51.1	48.6	C'_1	55.9 q	56.3	56.5
C_6	32.9 t	32.5	26.8	C'_{14}	57.9 q	58.0	57.9
C_7	76.6 s	77.9	47.6	C'_{18}	56.3 q	56.3	56.1
C_8	84.9 s	85.7	75.6	$R = NHC(=O)$ $ $ CH_3	169.3 s	169.5	169.0
C_9	79.5 s	78.4	78.6		25.5 q	25.6	25.5
C_{10}	78.5 s	36.6	36.4	$O-C(=O)$ $ $ C $ $ R	167.4 s	167.7	167.5
C_{11}	57.0 s	51.4	51.0	a	115.8 s	115.9	115.8
C_{12}	37.1 t	26.9	24.2	b	141.6 s	141.8	141.7
C_{13}	34.8 d	49.8	49.0	c	120.3 s	120.4	120.3
C_{14}	87.7 d	90.0	90.2	d	134.4 s	134.6	134.4
C_{15}	37.6 t	37.8	44.9	e	122.5 s	122.6	122.3
C_{16}	82.7 d	82.9	82.9	f	131.0 s	131.3	131.1

TMS 为内标准, $CDCl_3$ 为溶剂, 单位为 ppm。

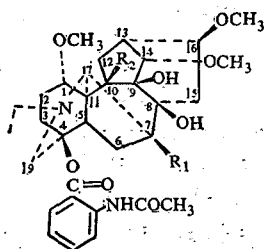
* 偏共振谱中的多重度, s 为单峰, d 为双峰, t 为三峰, q 为四峰。

由于贛乌碱的质谱中有较强的 $M-31$ 的峰 (m/e 585), 因此 C_1 上有 OCH_3 (4)。

根据文献报道, 如果 C_{10} 上有 OH, C_{14} 上的氢质子要向低场位移, 从贛乌碱的 1H 核磁共振谱与 lappaconitine 和 ranaconitine 的比较中可见, 贛乌碱的 $C_{14}\text{-H}$ 向低场位移至 $\delta 3.78$ (H, d, $J=4.5$ Hz), 与文献一致 (6)。

由于 $C_{14}\text{-H}$ 呈双峰出现, 因此 C_9 和 C_{13} 位上只能有一个取代, 进而进行双照射实验, 当照射 $\delta 2.38$ 时, 除了 $C_{14}\text{-H}$ ($\delta 3.78$) 去偶外, $\delta 1.80$ 和 $\delta 1.96$ 也分别去偶, 从而证实了 C_9 上有 OH 取代。如果 C_{13} 上有 OH, $C_{16}\text{-OCH}_3$ 因受 $C_{13}\text{-OH}$ 的影响要向低场位移至 $\delta 3.60$ 左右 (6, 6), 而贛乌碱的三个甲氧基分别在 $\delta 3.26\sim\delta 3.40$ 之间, 与 lappaconitine 和 ranaconitine 出现的位置相同, 因而也进一步证实了 C_{13} 上没有羟基取代。

此类生物碱的苯甲酸酯的取代一般在 C_4 和 C_{14} 位上; 如果 C_{14} 位上有苯甲酸酯取代, 乙酰化后, C_8 位上的乙酰基因受 C_{14} 位上的苯环屏蔽效应, 要向高场位移至 δ 1.20 左右⁽⁵⁾; 赣乌碱乙酰化后, 未见乙酰基信号向高场位移, 因此, 邻乙酰胺基苯甲酸酯是在 C_4 位上。在赣乌碱的 ^{13}C 核磁共振谱中, 除了 C_{10} 上因羟基取代, 而对周围的一些碳产生羟基效应外, 其余各碳均与 ranaconitine 一致, 并且赣乌碱的质谱裂解规律与 lappaconitine 和 ranaconitine 十分相似, 根据以上数据进一步证实了赣乌碱的化学结构为 10- β -羟基-冉乌头碱。



	R_1	R_2
赣乌碱 (A)	OH	OH
Lappaconitine (B)	H	H
Ranaconitine (C)	OH	H

实 验 部 分

(一) 提取和分离

秋季, 庐山所产的赣皖乌头*干根 7.5 kg, 粉碎后用 5% 氨水润湿, 用苯浸泡提取至提取液无生物碱反应为止, 苯提取液用 2% 盐酸提取 4~5 次, 酸水用氨水调节至 pH 9, 用氯仿提取 4 次, 氯仿提取液用无水碳酸钠干燥, 减压浓缩得浸膏 230 g, 得率为 3.07%。

浸膏 230 g, 经 3250 g 中性氧化铝柱层析, 依次用苯、苯-乙醚(10:2)、苯-乙醚(1:1)、苯-乙醚-二氯甲烷(1:1:1)、苯-乙醚-二氯甲烷(1:1:2)和二氯甲烷洗脱, 洗脱液减压浓缩后, 经硅胶 G 薄层层析, 用己烷-二乙胺(8:2)展开、碘化铊钾试剂显色, 检查各流分。

(二) 碱 A 的分离

苯-乙醚-二氯甲烷(1:1:1)洗脱部分, 析出碱 A 结晶 210 mg, 经乙醇重结晶, 熔点 $220\sim 221^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} + 44.7^\circ$ (甲醇 $C=0.1$), 元素分析 $C_{32}H_{44}N_2O_{10}$, 计算值 % C 62.32, H 7.19, N 4.54, 实验值 % C 62.03, H 7.18, N 4.40; 紫外光谱 λ_{max}^{EtOH} (nm) 225、254、310 ($\log \epsilon$ 4.46、4.22、3.75); 红外光谱 (KBr) $\nu_{cm^{-1}}$ 3470(OH)、3260($>NH$) 2960、1700(C=O), 1685

(C=O)、1590(C_6H_5)、1530、1450、1275(—O—)、1090、760; 核磁共振谱 ($CDCl_3$) δ 1.08

(3 H, t, $J=7$ Hz, $N-CH_2CH_3$), 2.20(3 H, s, $NHCOCH_3$), 3.26 (3 H, s, OCH_3), δ 1.08 3.30 (3 H, s, OCH_3), δ 3.40(3 H, s, OCH_3), 3.78(H, d, $C_{14}-H$, $J=4.5$ Hz), 7.02, 7.60 (各 1H, t), 7.92, 8.70(各 1H, d), 11.10 (H, s, $NHCOCH_3$)。质谱 m/e (%) 616 ($M^+ 8.5$), 601 (M^+-15 , 20), 585 (M^+-31 , 55), 567 ($M^+-31-18$, 18), 437(100), 422(95), 178(87), 136(100), 119(100)。

碱 A 的乙酰化

碱 A 60 mg, 加 60 mg 对甲苯磺酸和 2 ml 醋酐, $100^\circ C$ 加热 1 小时, 放置过夜, 加冰水,


* 本实验赣皖乌头均由庐山植物园帮助采集和鉴定

用氨水调节至 pH 9, 用乙醚提取三次, 乙醚提取液用无水碳酸钠干燥, 蒸去乙醚, 经氧化铝 (中性) 柱层析, 用乙酸乙酯-石油醚 (6:4) 洗脱, 得 52 mg。元素分析 $C_{40}H_{52}N_2O_{14} \cdot \frac{1}{2}H_2O$, 计算值% C 60.50, H 6.72 实验值% C 60.66, H 6.50; 核磁共振谱 ($CDCl_3$) δ 1.10 (3 H, t, $J=7$ Hz $N-CH_2CH_3$), 1.96 (9 H, s $OCOCH_3 \times 3$), 2.16 (3 H, s, $OCOCH_3$), δ 2.22 (3 H, s, $NHCOCH_3$), 3.36 (3 H, s, OCH_3), 3.40 (6 H, s, $OCH_3 \times 2$), 7.10, δ 7.58 (各 1H, t) 7.92, δ 8.62 (各 1H, d), 10.98 (H, s, $NHCOCH_3$)。

碱 A 的水解


碱 A 90 mg 加入 2% 氢氧化钾甲醇溶液 5 ml, 加热回流半小时, 蒸去甲醇, 加水后用氯仿提取三次, 未得胺醇; 这与北乌碱水介亦未得胺醇结果相同⁽⁵⁾。

母液用稀盐酸调节至 pH 2; 用乙醚提取三次, 乙醚提取液用无水硫酸钠干燥, 蒸去乙醚, 丙酮重结晶, 熔点 $180 \sim 181^\circ C$ 。元素分析 $C_9H_9NO_3$, 计算值% C 60.33, H 5.06, 实验值% C 60.28, H 5.16, 红外光谱 (KBr) ν cm^{-1} 3000 ($COOH$ OH), 1690 ($C=O$), 1645,

1600 () , 1580 ($NHC=O$), 1510, 1450, 1230, 960, 650; 核磁共振谱 (DMSO) δ 2.20 (3 H, s, $NHCOCH_3$), 7.08, 7.62 (各 1H, t), 8.04, 8.64 (各 1H, d), 10.96 (H, s, $NHCOCH_3$) 质谱 m/e (%) 179 (M^+ , 43), 161 (M^+-H_2O , 18), 146 (20), 137 (90), 119 (100)。

(三) 碱 B 的分离


苯洗脱部分 2.1 g, 经 120 g 中性氧化铝 (III) 柱层析, 依次用己烷-乙酸乙酯 (8:2) 和己烷-乙酸乙酯 (8:4) 洗脱。己烷-乙酸乙酯 (8:4) 洗脱部分析出碱 B 结晶 900 mg, 经乙醇重结晶, 熔点 $224 \sim 225^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} 27.0^\circ$ (氯仿, $c=0.22$), 元素分析 $C_{32}H_{44}N_2O_8$, 计算值% C 65.73 H 7.59 N 4.79, 实验值% C 65.99, H 7.72 N 4.80, 紫外光谱 (nm) λ_{max}^{EtOH} : 225, 254, 310 ($\log \epsilon$ 4.44, 4.18, 3.77), 红外光谱 (KBr) ν cm^{-1} 3560, 3530 (OH), 3255 (NH), 1700

($C=O$), 1685 ($C=O$), 1585 () , 1265 ($-O-$), 1090, 765, 核磁共振谱 ($CDCl_3$) δ 1.08

(3 H, t, $J=7$ Hz $N-CH_2CH_3$), 2.20 (3 H, s, $NHCOCH_3$), 3.28 (6 H, s, $OCH_3 \times 2$), 3.34 (3 H, s, OCH_3), 7.02, 7.50 (各 1H, t), 7.94, 8.68 (各 1H, d), 11.14 (H, s, $NHCOCH_3$), 质谱 m/e (%) 584 (M^+ , 9), 569 ($M-15$, 12), 553 ($M-31$, 66), 535 ($M^+-31-18$, 19), 405 (100), 390 (100), 178 (88), 136 (100), 119 (100)。


(四) 碱 C 的分离

苯-乙醚 (10:2)、苯-乙醚 (1:1) 流分析出碱 C 结晶 31 g, 经无水乙醇重结晶, 熔点 $130 \sim 131^\circ C$, $[\alpha]_D^{25} 40.2^\circ$ (甲醇, $c=0.19$), 元素分析 $C_{32}H_{44}N_2O_9$, 计算值% C 63.98, H 7.38, N 4.66, 实验值% C 63.90, H 7.23, N 4.57, 紫外光谱 λ (nm) 225, 254, 310 ($\log \epsilon$ 4.44,

4.19, 3.74), 红外光谱 ν (KBr) cm^{-1} 3480 (OH), 3270 (NH), 1675 ($C=O$), 1585 () ,

1520, 1445, 1270 ($-O-$), 1090, 755, 核磁共振谱 ($CDCl_3$) δ 1.08 (3 H, t, $J=7$ Hz, $N-CH_2CH_3$), 2.20 (3 H, s, $NHCOCH_3$), 3.22 (3 H, s, OCH_3), 3.28 (3 H, s, OCH_3), 3.38 (3 H, s, OCH_3), 7.00, 7.46 (各 1H, t), 7.90, 8.64, (各 H, d), 11.12 (H, s, $NHCOCH_3$), 质谱 m/e % 600 (M^+ , 9), 585 (M^+-15 , 13), 569 (M^+-31 , 58), 551 ($M^+-31-18$, 18), 421 (100),


406(100), 178(83), 136(100), 119(100)。

按常法制氢溴酸盐, 经乙醇重结晶, 熔点 225°C, 红外光谱(KBr) ν cm^{-1} 3510(OH), 3280(NH), 2940, 1695(C=O); 1680(C=O), 1585() ν , 1525, 1450, 1275 (-O-), 1090, 760。

碱 C 的水解

碱 C 1g 加入 2% 氢氧化钾甲醇溶液 50 ml, 回流半小时, 蒸去甲醇, 加水后用氯仿提取三次, 提取液经无水碳酸钠干燥, 蒸去溶剂, 得胺醇 700 mg, 经丙酮重结晶, 熔点 105~107°C。元素分析 $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_7 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$, 计算值% C 61.58, H 8.54, N 3.12, 实验值% C 61.66, H 8.50, N 3.42, 紫外光谱 215 nm, 红外光谱(KBr) ν cm^{-1} 3440, 2545, 1450, 1375, 1115, 1080, 核磁共振谱 (CDCl_3) δ 1.06 (3 H, t, $J=7$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.22 (3 H, s, OCH_3), 3.28 (3 H, s, OCH_3), 3.36 (3 H, s, OCH_3), 质谱 m/e (%) 439(M^+ , 14), 424(M^+-15 , 16), 421(M^+-18 , 11), 408(M^+-31 , 100), 390($\text{M}^+-31-18$, 41), 378(35)。

母液用稀盐酸调节至 pH 2, 用乙醚提取三次, 乙醚提取液经无水硫酸钠干燥, 蒸去乙醚, 用丙酮重结晶得 170 mg, 熔点 185°C。元素分析 $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$, 计算值% C 60.33, H 5.06, 实验值% C 60.03 H 5.27, 红外光谱 ν (KBr) cm^{-1} 3000(COOH, OH), 1690(C=O), 1645

(C=O), 1600() ν , 1580 (NHCO), 1510, 1450, 1230, 960, 650, 核磁共振谱 (DMSO) δ 2.20 (3 H, s, NHCOCH_3) 7.08, 7.62 (各 1H, t), 8.04, 8.64 (各 H, d), 10.96 (H, s, NHC OCH_3), 质谱 m/e (%) 179(M^+ , 43), 161 (即 $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 18), 146(20), 137(90), 119(100)。

致谢 江西庐山植物园余水良、黄大付、赖坤书和雷云海同志帮助采集植物样品和鉴定标本; 云南植物所帮助做乌头的 ^{13}C 核磁共振谱, 特此感谢。

参 考 文 献

1. 江西省赣州市传染病医院: 破叶莲总碱治疗急性菌痢 152 例疗效观察. 赣南医药 (3): 24, 1979
2. 韦壁瑜等: 中国乌头的研究 XVIII 高乌头的研究. 中药通报 (2): 26, 1981
3. Pelletier S·W, et al: The structure of ranaconitine, a new diterpenoid alkaloid of *Aconitum ranunculae-folium*. *Tetrahedron Letters* 5045, 1978
4. Юнусов МС: О Пиролизе Аконимовых Алкалоидов. *Химия Природных Соединений* 626, 1971
5. 王永高等: 中国乌头的研究 XIII. 北草乌的研究. 药学学报 15: 526, 1980
6. 朱子清等: 伏毛铁棒锤生物碱的研究. 中药通报 (1): 26, 1981

STUDIES ON THE CHINESE DRUG, ACONITINE SPP
XX. ALKALOIDS FROM *ACONITUM FINETIANUM*
HAND-MAZZ

JIANG Shan-hao, ZHU Yuan-long and ZHU Ren-hong

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica)

ABSTRACT

Two known alkaloids, lappaconitine and ranaconitine and a new alkaloid, named finaconitine, $C_{32}H_{44}N_2O_{10}$, m.p. 220-221°C have been isolated from the root of *Aconitum finetianum* Hand-Mazz.

The chemical structure of finaconitine was assigned as 10- β -hydroxyranaconitine by ^{13}C NMR, 1H NMR, IR, UV, and MS spectral data.

Key words *Aconitum finetianum* Hand-Mazz; finaconitine; lappaconitine; ranaconitine.