

· 论著 ·

雷公藤甲素-硬脂酸酯的合成及其制剂成药性研究

傅志勤^{1,2}, 许幼发^{1,2}, 陈炳辰³, 程丹², 马娟娟², 陈建明^{1,2} (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 第二军医大学学员旅学员 6 队, 上海 200433)

[摘要] 目的 合成一种雷公藤甲素脂溶性前药,以期提高其制剂的成药性。方法 以4-二甲氨基吡啶(DMAP)催化的酸与醇的DCC缩合法,合成雷公藤甲素-硬脂酸酯(TP-SA),通过质谱、核磁共振氢谱和碳谱进行结构确认;采用摇瓶法测定化合物油-水分配系数;将TP及TP-SA制备成脂质体及脂肪乳,考察其初步稳定性。结果 实验结果证明:成功合成TP-SA。TP-SA的log *P*为2.33。相同处方条件下,TP难以制备成脂质体和乳剂;TP-SA制备成脂质体粒径约90 nm,制备成脂肪乳粒径约110 nm,包封率均大于95%;4℃及25℃条件下观察TP-SA脂质体和脂肪乳的放置稳定性,1周内粒径、包封率等制剂参数皆无明显变化。结论 TP-SA显著改善药物制剂成药性,本研究可为TP制剂开发提供参考。

[关键词] 雷公藤甲素;硬脂酸酯;前药;脂质体;脂肪乳;成药性

[中图分类号] R284.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)02-0141-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.011

Synthesis and druggability study of triptolide stearate

FU Zhiqin^{1,2}, XU Youfa^{1,2}, CHEN Bingchen³, CHENG Dan², MA Juanjuan², CHEN Jianming^{1,2} (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. The sixth Team of Student Brigade, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize a lipophilic prodrug of triptolide (TP) and improve its druggability. **Methods** Triptolide stearate (TP-SA) was synthesized *via* the DMAP-catalyzed DCC method and identified by MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The shake-flask method was used to study the oil/water partition coefficient. The preparations of TP and TP-SA liposomes and emulsions were compared. Their encapsulation efficiency and stability were investigated. **Results** TP-SA was synthesized successfully. Its log *P* in octanol/water system was 2.33. It was difficult to prepare TP liposome or emulsion. By contrast, TP-SA liposome and emulsion can be prepared successfully with the same formulation process. The particle size of TP-SA liposomes were about 90 nm and TP-SA emulsions were about 110 nm. The encapsulation efficiency was above 95%. Their stability were studied at 4℃ and 25℃. The preparation parameters, such as particle size and encapsulation efficiency, had no significant change in a week. **Conclusion** Triptolide stearate enhanced drug lipophilicity. Its druggability was improved significantly. These data can be used for the TP related drug design and development.

[Key words] triptolide stearate; prodrug; liposome; emulsion; druggability

雷公藤甲素(triptolide, TP),又称雷公藤内酯、雷公藤内酯醇,是从中药雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)中提取分离的一种主要活性单体,具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤等多种药理活性^[1]。作为雷公藤用于治疗类风湿关节炎上市片剂的指标成分,TP的抗炎疗效已得到公认,近年来更是因在抗肿瘤方面具有广谱、高效等特点^[2]而引起

广泛关注。然而,TP存在的毒性大、治疗窗窄等问题^[3]严重限制了其临床应用。

目前,纳米载药系统被广泛应用于药物增效减毒研究,脂质体和乳剂作为两种重要的载体形式在抗肿瘤和抗炎药物的开发方面各有其优势^[4,5]。但由于TP在水相和油相中溶解性均差,使得开发过程受限于此性质缺陷,无法从根本上解决制剂存在的包封率低、稳定性差等问题。脂质体和乳剂中因含有大量脂质成分,对脂溶性强的药物有独特的包载优势。基于以上考虑,本研究拟对TP的结构进行修饰,在其C-14位羟基上引入脂溶性强的长链脂肪酸基团,制备一种新型TP前药:雷公藤甲素-硬脂酸酯(TP-SA),以期增强药物与载体的结合能力,

[作者简介] 傅志勤,硕士研究生。研究方向:药物制剂及质量控制研究。E-mail: fuzhiqin9106@qq.com

[通讯作者] 陈建明,教授,博士生导师。研究方向:靶向给药系统、缓控释给药系统及难溶性药物注射给药系统。Tel: (021)81871291; E-mail: yjcjm@163.com

改善制剂成药性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Avane II 600 MHz 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); API-3000LC-MS 质谱仪(美国 McKinley Scientific 公司); GL-3250 型磁力搅拌器(海门 QILINBEIER 公司); UV1102 II 型紫外分光光度计(上海 Techcomp 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪、G1311C 四元泵、G1329B 进样器、G1314F 检测器(美国 Agilent 公司); CPA225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); Mili-QUFPLUS 纯水仪(美国 Milipore 公司); SK5210HP 型水浴超声仪(上海 KUDOS 公司); PB-10 型 pH 计(德国 Sartorius 公司); R-200 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司); JY92-II N 超声波细胞破碎仪(宁波 SCIENTZ 公司); EmulsiFlex-C3 高压均质机(加拿大 AVES-TIN 公司); FA25 型剪切乳化仪(FLUKO 公司); NANO-S 粒径仪(英国 Malvern 公司); TGL-16C 离心机(上海 Anke 仪器厂); Cs120 GX II 微量-超速离心机(日本 Hitch 公司); SYC-A 电热恒温调速振荡器(上海 CIMO 公司)。

1.2 试剂 雷公藤甲素(江苏倍达医药科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 硬脂酸(国药集团化学试剂有限公司); 卵磷脂、胆固醇(德国 Lipoid 公司); 色谱级甲醇(德国 Merck 公司); 中链甘油三酸酯(中航铁岭药业公司); Sepharose CL-4B(美国 Sigma 公司); 其他试剂(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 TP-SA 的合成 合成路线见图 1, 方法如下: 在 100 ml 圆底烧瓶中投入硬脂酸(853 mg, 3 mmol)、二环己基碳二亚胺(DCC)(618 mg, 3 mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(366 mg, 3 mmol), 加入 20 ml 无水二氯甲烷溶解, 冰浴条件下搅拌 30 min; 将 TP(360 mg, 1 mmol) 溶于 5 ml 无水二氯甲烷后缓慢滴加入反应体系, 冰浴条件下反应 30 min, 室温下继续反应过夜。薄层点板显色剂喷板处理监测反应, 显色剂: 2% 的 3,5-二硝基苯甲酸无水乙醇溶液与 10% KOH 水溶液等体积混合。反应完毕后, 于反应液中加入 20 ml 乙酸乙酯萃取, 将有机相转入分液漏斗中, 用浓度为 3% 的柠檬酸水溶液洗涤至略酸性, 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤 3 次, 每次 20 ml, 饱和食盐水洗至中性, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 残留物经硅胶柱色谱分离, 以石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯(5:1)为洗脱剂, 得

TP-SA 502 mg, 淡黄色固体, 收率 80%, 色谱纯度 $\geq 95.8\%$, 经质谱核磁确证结构。该物质的 ESI-MS 和 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 数据如下: ESI-MS(m/z): 627.8[M+H] $^+$ (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{O}_7$); ^1H NMR(DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 4.98 (1H, s, 14-CH), 4.86 (1H, d, $J = 18.88$ Hz, 19-CH), 4.77 (1H, d, $J = 18.88$ Hz, 19-CH), 3.95 (1H, d, 11-CH), 3.69 (1H, d, 12-CH), 3.56 (1H, d, 7-CH), 2.28~2.39 (2H, m, 2'-CH $_2$), 1.73~2.00 (1H, m, 15-CH), 1.80~1.85 (2H, m, 3'-CH $_2$), 1.57~1.59 (2H, m, 2-CH $_2$), 1.24~1.34 (28H, m, 14 \times CH $_2$), 0.92 (3H, s, 20-CH $_3$), 0.85~0.87 (6H, m, 16'-17'-CH $_2$), 0.76 (3H, t, 18'-CH $_3$); ^{13}C NMR(DMSO, 150 MHz) δ 175.52, 170.59, 71.08, 70.66, 63.74, 63.08, 61.30, 59.84, 55.29, 54.93, 35.51, 34.19, 31.78, 29.57, 29.51, 29.37, 29.23, 29.19, 28.71, 28.11, 25.06, 22.85, 22.57, 17.90, 17.05, 17.00, 14.39, 14.13。

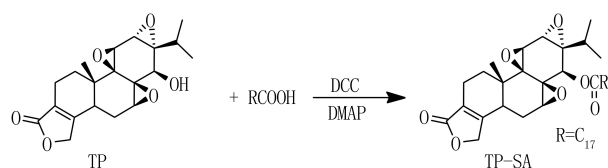


图 1 雷公藤甲素-硬脂酸酯的合成路线

2.2 TP-SA 含量分析方法的建立

2.2.1 确定检测波长 取适量 TP-SA 溶解于甲醇中, 在波长 200~600 nm 范围内进行全波长扫描。TP-SA 的最大吸收峰在 218 nm, 因此选用 218 nm 作为检测波长。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相: 纯甲醇; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 20 μl ; 检测波长: 218 nm。外标法定量。TP-SA 的 HPLC 图谱见图 2, 保留时间 7.4 min。

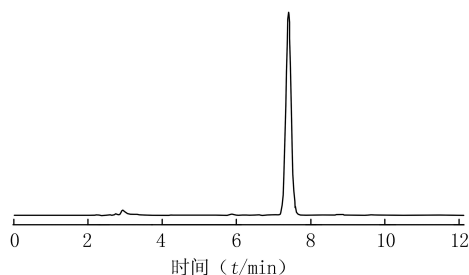


图 2 雷公藤甲素-硬脂酸酯的 HPLC 图

2.2.3 TP-SA 储备液的制备 精密称取 TP-SA

药物5.0 mg至5 ml容量瓶中,加甲醇溶解稀释定容至刻度,摇匀,得质量浓度为1.0 mg/ml的TP-SA储备液,于4℃保存备用。

2.2.4 标准曲线的确立 精密吸取“2.2.3”项下配制的储备液,分别稀释得到质量浓度为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0和50.0 μg/ml的系列溶液。按“2.2.2”项下色谱条件进行分析。以浓度C为横坐标,峰面积A为纵坐标,计算TP-SA的线性回归方程为: $A=19.5210C+0.5506$ ($r=0.9999$)。结果表明,在0.5~50.0 μg/ml浓度范围内,线性关系良好。

2.2.5 检测限与定量限 精密吸取“2.2.3”项下配制的储备液,稀释不同倍数,进样分析。结果表明,其检测限($S/N=3$)为18.9 ng/ml;定量限($S/N=10$)为62.9 ng/ml。

2.2.6 回收率试验 精密配制2.0、20.0和50.0 μg/ml(低、中、高)3个浓度TP-SA溶液各5份,按“2.2.2”项下色谱条件分别进样,记录色谱峰面积,代入标准曲线求得浓度,与实际浓度相比,计算回收率。结果表明,各浓度的平均回收率均在98%~102%之间,RSD值<3%。

2.2.7 精密度试验 精密配制2.0、20.0和50.0 μg/ml(低、中、高)3个浓度TP-SA溶液各5份,按“2.2.2”项下色谱条件于1 d内连续进样5次,记录色谱峰面积,计算日内精密度;连续进样5 d,计算日间精密度。结果表明,日内及日间精密度良好,RSD值均<3%。

2.3 TP-SA油-水分配系数的测定 参照文献[6,7]设计实验,采用摇瓶法进行油-水分配系数的测定。方法如下:配制pH值分别为2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0的各磷酸盐缓冲液(分别用0.1 mol/L磷酸二氢钾、磷酸和氢氧化钠溶液配制)。取适量TP-SA溶解于水饱和的正辛醇中,制成药物的正辛醇溶液。精密量取该溶液0.4 ml置于5 ml EP管中,分别加入正辛醇饱和的水、不同pH的磷酸盐缓冲溶液4 ml,37℃恒温水浴振荡器中振摇24 h直至平衡,以3 000 r/min离心10 min,分离油、水两相。精密量取油相和水相溶液,用甲醇进行适当稀释,分别注入高效液相色谱仪,按“2.2.2”项下色谱条件测定药物含量,计算出TP-SA在正辛醇-水体系中的油-水分配系数 $\log P=2.33$ 。TP采用相同方法测得 $\log P=0.49$,结果表明,该前药亲脂性明显增强。不同pH值磷酸盐缓冲溶液中的油-水分配系数见图3,可见溶液的pH值对TP-SA的油-水分配系数($\log P$)影响不

大,药物能以稳定的分子状态大量分布在油相中。

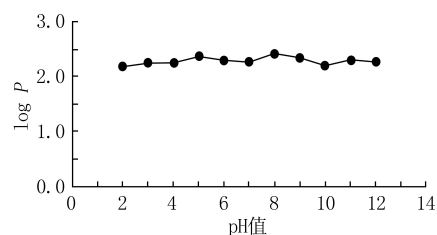


图3 雷公藤甲素-硬脂酸酯在37℃条件下正辛醇缓冲液中的油-水分配系数

2.4 TP-SA成药性研究

2.4.1 脂质体的制备 参照文献[8]及前期预试基础,选定处方:磷脂2%、胆固醇0.2%,制备0.05%~0.2%范围内不同载药量的脂质体。制备方法:称取处方量磷脂、胆固醇、TP-SA溶于适量无水二氯甲烷中,45℃条件下旋蒸除去溶剂,使脂质成分在瓶壁内形成均匀类脂薄膜,然后往圆底烧瓶中加入处方量蒸馏水水化薄膜得脂质体混悬液,经细胞破碎仪超声3 min,过0.22 μm滤膜,即得TP-SA脂质体。TP脂质体采用同样处方工艺制备。结果见表1。

表1 载药量对脂质体外观的影响

脂质体	载药量(%)		
	0.05	0.1	0.2
TP-SA	半透明,淡蓝色乳光明显	半透明,淡蓝色乳光明显	半透明,淡蓝色乳光明显
TP	轻微浑浊,放置0.5 h内可见大量微粒悬浮	制备过程中可见大量微粒悬浮	—

注:“—”表示无法制备

2.4.2 乳剂的制备 参照文献[9]及前期预试基础,选定处方:中链油5%、卵磷脂3%、油酸0.03%,制备0.05%~0.2%范围内不同载药量的脂肪乳。制备方法:称取处方量中链油、TP-SA、油酸,加热搅拌使溶解,得油相;称取处方量卵磷脂于适量蒸馏水中,剪切使分散溶解,得水相;将油相和水相在约70℃条件下混合,剪切乳化得初乳;用蒸馏水定容,调pH至7.0~7.5;将初乳置于高压均质机中,在10 000~15 000 psi均质压力下进一步乳化,过0.22 μm滤膜除菌,即得TP-SA脂肪乳。TP脂肪乳采用同样处方工艺制备。结果见表2。

2.4.3 包封率的测定 脂质体包封率:参照文献[10],建立Sephacrose CL-4B凝胶柱法对TP-SA脂质体和游离药物的洗脱曲线。取TP-SA脂质体

1 ml上柱进行柱层析,收集样品流份,按“2.2.2”项下色谱条件测定游离药物浓度 $C_{\text{游离}}$,另取 TP-SA 脂质体适量,异丙醇破乳后稀释至适宜浓度,0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样,按“2.2.2”项分析(该方法下脂质成分无干扰),计算脂质体中总药物浓度 $C_{\text{总}}$ 。以公式 $EE(\%) = (C_{\text{总}} - C_{\text{游离}}) / C_{\text{总}} \times 100\%$ 计算包封率。测定结果见表 3。

表 2 载药量对脂肪乳外观的影响

脂肪乳	载药量(%)		
	0.05	0.1	0.2
TP-SA	半透明液体,无可见微粒	半透明液体,无可见微粒	半透明液体,无可见微粒
TP	在油相中溶解不充分,无法制备	—	—

注:“—”表示无法制备

脂肪乳包封率:参照文献[9],取 TP-SA 脂肪乳 4 ml 于超速离心管中,40 000 r/min 离心 2 h,取下层澄清溶液 1 ml 过 0.22 μm 微孔滤膜,取滤液 20 μl 注入高效液相色谱仪,按“2.2.2”项下色谱条件测定水相中药物含量 $C_{\text{水}}$ 。另取 TP-SA 脂肪乳适量,异丙醇破乳后稀释至适宜浓度,0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样,按“2.2.2”项下方法分析(该方法下脂质成分无干扰),计算脂肪乳中总药物浓度 $C_{\text{总}}$ 。以公

式 $EE(\%) = (C_{\text{总}}V_{\text{总}} - C_{\text{水}}V_{\text{水}}) / C_{\text{总}}V_{\text{总}} \times 100\%$ 计算包封率。式中 $C_{\text{总}}$ 为脂肪乳中药物总浓度; $V_{\text{总}}$ 为脂肪乳总体积; $C_{\text{水}}$ 为水相中药物质量浓度; $V_{\text{水}}$ 为水相体积。测定结果见表 3。

表 3 不同载药量的雷公藤甲素-硬脂酸酯脂质体和脂肪乳的包封率测定结果($\bar{x} \pm s$)

制剂	包封率(%)		
	0.05	0.1	0.2
脂质体	97.70 \pm 1.45	97.26 \pm 0.40	98.01 \pm 0.89
脂肪乳	97.39 \pm 1.12	98.50 \pm 1.20	96.77 \pm 0.91

2.4.4 粒径及多分散系数 采用 Malvern Zetasizer Nano S 粒径分析仪测定“2.4.1”及“2.4.2”项下制备脂质体及脂肪乳的粒径。测定的粒径范围为 0.6 nm~6 μm 。结果见表 4。图 4 分别为载药量 0.2% 的脂质体(A)及脂肪乳(B)的粒径分布图。

2.4.5 初步稳定性考察 按照“2.4.1”和“2.4.2”方法制备载药量为 0.2% 的 TP-SA 脂质体和脂肪乳各 3 批,进行初步稳定性考察。分别存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中和室温(25 $^{\circ}\text{C}$)条件下,观察制剂稳定性,考察指标包括外观、粒径、包封率及药物含量变化。结果表明,在 1 周的考察期内,脂质体和脂肪乳外观无肉眼可见明显变化,其他考察指标见表 5、表 6。

表 4 不同载药量的雷公藤甲素-硬脂酸酯脂质体和脂肪乳的粒径分布

制剂	载药量(%)					
	0.05		0.1		0.2	
	粒径(l/nm)	多分散系数(PDI)	粒径(l/nm)	多分散系数(PDI)	粒径(l/nm)	多分散系数(PDI)
脂质体	93.5	0.203	90.2	0.214	92.7	0.225
脂肪乳	106.8	0.265	112.7	0.254	109.9	0.273

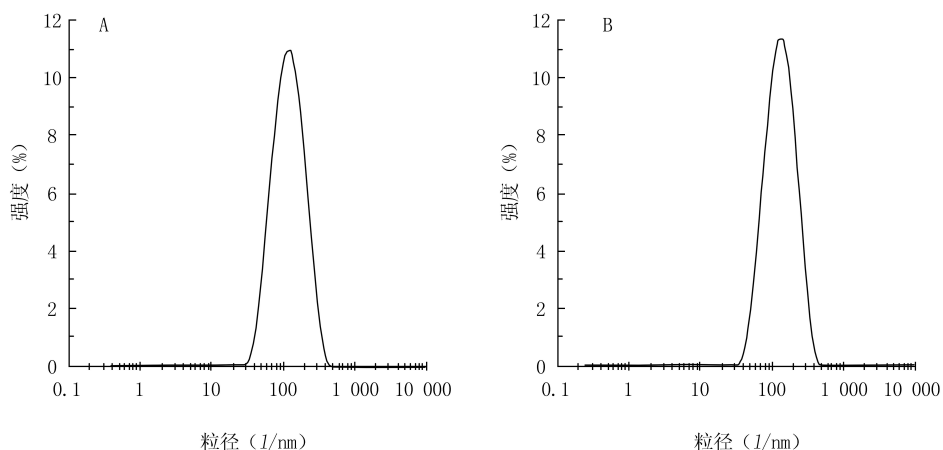


图 4 载药量 0.2% 的雷公藤甲素-硬脂酸酯脂质体(A)和脂肪乳(B)的粒径分布

表5 考察时间内4℃和25℃条件下脂质体的稳定性($\bar{x} \pm s$)

时间(t/d)	粒径(l/nm)		包封率(%)		药物含量变化(%)	
	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃	25℃
0	92.97±1.67		98.40±0.59		100.00	
3	96.53±0.92	95.01±1.17	98.63±1.37	96.46±1.57	100.59±0.91	97.89±1.59
7	91.83±1.59	94.20±1.46	97.29±1.20	96.78±0.74	98.60±1.16	98.47±1.71

表6 考察时间内4℃和25℃条件下脂肪乳的稳定性($\bar{x} \pm s$)

时间(t/d)	粒径(l/nm)		包封率(%)		药物含量变化(%)	
	4℃	25℃	4℃	25℃	4℃	25℃
0	109.92±1.08		98.21±0.75		100.00	
3	106.11±1.65	114.71±0.86	97.90±1.38	98.42±1.68	98.91±1.52	97.38±1.76
7	112.50±1.90	108.92±1.49	98.53±1.02	97.80±1.43	100.47±1.03	99.49±0.78

3 讨论

针对TP制剂成药性方面的不足,本研究通过对TP引入长链脂肪酸基团获得了脂溶性前药TP-SA。油-水分配系数结果显示其亲脂性有明显提高,对其制剂成药性提供了更大的可能性;比较相同处方下的制剂差异,TP难以制备脂质体和脂肪乳,而TP-SA制备成脂质体粒径约90nm,制备成脂肪乳粒径约110nm,两者包封率皆大于95%,且初步稳定性良好,更进一步说明其制剂成药性得以明显改善。

TP处于紫外末端吸收,常规紫外分析仪下监测反应,薄层点板色斑不明显,不利于产物的区分和鉴定。利用TP的显色原理^[11](在碱性醇溶液中,内酯的活性亚甲基与硝基苯母核缩合氧化生成醌式结构,产生紫红色反应),进行显色处理,肉眼可见紫红色斑点,目标产物颜色与杂质有区分,可方便快速鉴定。

C-14位羟基为TP主要活性位点之一^[12],对其进行酯化修饰,理论上还可以有效降低毒性,仍有待体内外进一步验证。

TP-SA及其相关纳米制剂的研究可为加快推进TP进一步开发提供有益参考。

【参考文献】

[1] Liu Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(3): 377-383.
[2] Wang CY, Bai XY, Wang CH. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development[J]. Am J Chin Med, 2014, 42(3): 543-559.

[3] Li XJ, Jiang ZZ, Zhang LY. Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(1): 67-79.
[4] Himes R, Lee S, Mcmenigall K, et al. Reduction in inflammation in the footpad of carrageenan treated mice following the topical administration of anti-TNF molecules formulated in a micro-emulsion[J]. J Control Release, 2010, 145(3): 210-223.
[5] Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(3-4): 160-166.
[6] 姚媛, 廖琼峰, 曾丽英, 等. 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯表观油水分配系数的测定及pH值对其的影响[J]. 中药材, 2009, 32(10): 1610-1612.
[7] 宋桂军, 柳茵, 冯芳, 等. 替米沙坦油水分配系数的测定及其意义[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1704-1706.
[8] 吕文莉, 郭健新, 平其能. 灯盏花素脂质体的制备及其理化性质的测定[J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 289-292.
[9] 何海冰, 殷春阳, 徐丽双, 等. 丁酸氯维地平亚微乳注射液的制备与理化性质考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(10): 760-766.
[10] 陶小妹, 张强, 顾红燕, 等. 共轭亚油酸-吉西他滨脂质体的制备、表征及体外抗肿瘤活性[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(10): 1177-1185.
[11] 庄莹, 宋敏, 杭太俊, 等. 雷公藤多苷片中雷公藤总内酯及雷公藤内酯醇的测定[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 36-40.
[12] Zhou ZL, Yang YX, Ding J, et al. Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms[J]. Nat Prod Rep, 2012, 29(4): 457-475.

[收稿日期] 2016-12-30 [修回日期] 2017-02-22
[本文编辑] 李睿旻