

龙胆苦苷结构修饰工艺优化及产物的理化特性分析

陈银芳¹, 王焱², 宋小玲³, 王跃生^{4*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029;
3. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006; 4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立龙胆苦苷乙酰化结构修饰的技术工艺并考察其乙酰化产物的理化特性。方法:以反应时间、反应温度、乙酸酐与龙胆苦苷的摩尔比为考察因素,通过正交试验优选龙胆苦苷乙酰化结构修饰的技术工艺,并对显著影响因素进行单因素试验考察;通过表观油/水分配系数、稳定性试验及粉体学基本性质等的考察探讨龙胆苦苷乙酰化产物的理化特性。结果:最佳乙酰化工艺为以吡啶为催化剂,乙酸酐为乙酰化剂,乙酸酐-龙胆苦苷(10:1),20℃反应12h;乙酰化产物得率94.02%。纯化物经紫外光谱、质谱等鉴定为四乙酰化龙胆苦苷,其在水中的表观油/水分配系数(P)的 $\lg P = 1.40$, P 随pH增大而降低;乙酰化龙胆苦苷对高温和酸敏感、对高湿和强光不敏感、流动性欠佳。结论:龙胆苦苷的乙酰化结构修饰工艺稳定可控。其乙酰化产物体内吸收特性优于龙胆苦苷本身,可有效提高后者的生物利用度。

[关键词] 龙胆苦苷;理化性质;乙酰化;结构修饰

[中图分类号] R283.6;R284.1;R817.9+2;R914.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0013-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180013

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160727.1604.010.html>

[网络出版时间] 2016-07-27 16:04

Optimization of Structural Modification Technology of Gentiopicroside by Orthogonal Test and Analysis of Physicochemical Characteristics of Its Derivant

CHEN Yin-fang¹, WANG Yan², SONG Xiao-ling³, WANG Yue-sheng^{4*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing 100029, China;

3. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;

4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the structural modified technology of gentiopicroside, and investigate the physicochemical properties of its acetylated product. **Method:** Orthogonal test was adopted to optimize the structural modified technology of gentiopicroside with reaction time, reaction temperature and molar ratio of acetic anhydride-gentiopicroside as factors, then single factor test was designed for optimizing the most significant factor. The apparent oil/water partition coefficient, stability test and powder properties were studied for investigating the physicochemical properties of the acetylated product. **Result:** Optimum acetylation process was established with pyridine as catalyst, acetic anhydride as acetylation agent, molar ratio of acetic anhydride-gentiopicroside (10:1), reaction at 20℃ for 12 hours. Yield of the acetylated product was 94.02%. The reaction product, purified by silica gel column chromatography, was determined to be tetra-acetylated gentiopicroside by ultraviolet spectrum and mass spectrum; $\lg P$ of the apparent oil/water partition coefficient (P)

[收稿日期] 20151021(006)

[基金项目] 江西省卫生计生中医药科研计划项目(2012A150)

[第一作者] 陈银芳, 硕士, 讲师, 从事中药分析研究, Tel:0791-87118919, E-mail:chenyinfang_1984@126.com

[通讯作者] *王跃生, 博士, 教授, 从事中药制剂研究, Tel:0791-87118919, E-mail:wylw915@163.com

was 1.40, P reduced with increasing pH value. Tetra-acetyl gentiopicroside was sensitive to high temperature and acid, not sensitive to high humidity and strong light. Tetra-acetyl gentiopicroside had poor liquidity. **Conclusion:** The optimized technology for structural modification of gentiopicroside is stable and controllable. Absorption characteristics of the acetylated product *in vivo* is better than that of gentiopicroside, which can improve its bioavailability.

[Key words] gentiopicroside; physicochemical properties; acetylation; structural modification

龙胆苦苷具有保肝利胆抗炎作用,是龙胆属植物的主要药效成分之一,广泛存在于东北龙胆、秦艽、红花龙胆、坚龙胆等植物中。研究表明龙胆苦苷注射给药可明显降低急慢性肝损伤动物的血清转氨酶,减轻肝组织的片状坏死、肿胀及脂肪变性,促进肝脏的蛋白质合成。龙胆苦苷大剂量注射给药具有一定的退黄作用^[1-2]。在利胆方面,静注龙胆苦苷能增加大鼠胆汁分泌、促进狗的胆囊收缩^[3]。在抗炎方面,注射龙胆苦苷能对抗氢化可的松引起的小鼠胸腺及脾脏萎缩,也能对抗免疫反应引起的肝损伤,降低血清转氨酶水平。

龙胆苦苷属裂环烯醚萜苷类化合物,易溶于水、甲醇及乙醇等溶剂^[4],在 23 °C 下表观油/水分配系数(P)的 $\lg P = -1.21$,亲水性较强,而亲脂性较差^[5],影响透皮吸收和口服吸收。而且龙胆苦苷口服给药时,半衰期短、清除快速、平均滞留时间短、生物利用度低(仅 39.6%)^[6-7],导致保肝利胆效果降低。为改善其生物利用度,本实验对龙胆苦苷糖基上的羟基进行修饰,引入酯基,适当增加其脂溶性,以延长其在生物体内的滞留时间^[8]和半衰期,提高龙胆苦苷在保肝利胆抗炎等方面的疗效。

1 材料

SCL-10AVP 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),TSQ Quantum Ultra 型质谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国密理博公司),AR-5120 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。龙胆苦苷(自制,纯度 91.74%),乙酸酐、吡啶(上海申博化工有限公司),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 龙胆苦苷乙酰化结构修饰产物的制备

2.1.1 乙酰化剂的选择 苷类成分糖基中羟基全乙酰化常用乙酸酐或乙酰氯在适当的催化剂作用下形成乙酸酯^[9]。依据文献^[10],本文选用乙酸酐作为乙酰化试剂。

2.1.2 催化剂的选择 精密称取一定量龙胆苦苷和一定体积乙酰化剂,催化剂分别为高氯酸、浓硫酸

和吡啶,分别置于圆底烧瓶中,搅拌使龙胆苦苷全部溶解。恒温反应一定时间至龙胆苦苷反应完全,减压回收溶剂,干燥得粗品,平行 2 份。取适量粗品,加乙腈溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,在相同色谱条件下进样分析,结果表明吡啶为催化剂时,2 份产物的 HPLC 相同,试验重复性好、催化效率高。

2.1.3 反应产物的纯化 称取龙胆苦苷乙酰化反应产物 2.0 g,柱色谱硅胶(200 ~ 300 目)40 g,将硅胶于等体积起始洗脱剂三氯甲烷浸泡后湿法装柱。龙胆苦苷乙酰化产物中加入适量乙腈,微热使溶解,水浴挥掉部分乙腈,加入反应产物 2 倍量硅胶,拌匀,蒸除溶剂,置于研钵中研匀,将拌样硅胶加入色谱柱。加三氯甲烷 3 BV 洗脱,用三氯甲烷-甲醇(70:1)5 BV 洗脱,每 1 BV 收集 1 次洗脱液,洗脱液旋转蒸发至干,用乙腈溶解残余物,进行 HPLC 检测。乙腈复溶液 80 °C 水浴再蒸干,收集固体。结果表明三氯甲烷洗脱液部分未检测到物质。三氯甲烷-甲醇(70:1)洗脱液的第 1,2 BV 洗脱部分未检测到物质,第 3,4,5 BV 检测到物质,但只有第 4 BV 和 5 BV 复溶液蒸干后,得到淡黄色和黄色固体,经 HPLC 检测,均只有 1 个色谱峰,纯度 >98%。

2.1.4 反应工艺条件优化 影响四乙酰化龙胆苦苷合成的因素有反应时间、反应温度、乙酸酐与龙胆苦苷的摩尔比等,压力对反应可能也有一定影响,但压力难以控制,故将反应安排在常压下进行,暂不将压力作为考察因素。选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。取龙胆苦苷 9 份,每份 1.0 g,置于 50 mL 圆底烧瓶中,按设计的条件进行反应,以乙酰化产物得率为评价指标,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,各因素主次为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 C 对试验结果影响显著,而因素 A , B 则无显著性差异。为了节约原料和能源,工艺初步确定为反应时间 12 h,反应温度 20 °C,因素 C 作进一步考察。固定反应时间 12 h,反应温度 20 °C;分别称取龙胆苦苷 1.0 g,置于 50 mL 圆底烧瓶中,乙酸酐-龙胆苦苷选择 4:1,7:1,10:1,15:1,20:1。结果表明,随乙酸酐-龙胆苦苷从 4:1 增加到 20:1 的

表 1 四乙酰化龙胆苦苷合成条件的正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of synthesis conditions of tetra-acetylated gentiopicroside

No.	A 时间 /h	B 温度 /°C	C 乙酸酐-龙胆苦苷	D 空白	乙酰化产物得率/%
1	12	20	4:1	1	53.34
2	12	30	10:1	2	94.96
3	12	40	20:1	3	98.82
4	24	20	10:1	3	98.91
5	24	30	20:1	1	98.23
6	24	40	4:1	2	60.67
7	36	20	20:1	2	96.78
8	36	30	4:1	3	58.87
9	36	40	10:1	1	95.94

表 2 乙酰化产物得率的方差分析

Table 2 ANOVA of yield of acetylated product

方差来源	SS	MS	F	P
A	19.216	9.608	1.393	>0.05
B	6.833	3.417	0.495	>0.05
C	3 146.410	1 573.205	228.011	<0.01
D(误差)	13.799	6.900		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

过程中, 收率呈上升趋势, 从 4:1 增加到 7:1 的过程中, 收率上升较快, 而从 7:1 增加到 20:1 的过程中, 得率上升缓慢。主要是因为相同条件下, 增加投料可加速反应进程, 得率就增加; 但投料增加到一定量时, 反应进程加速较缓慢, 收率增加量小。故确定乙酸酐-龙胆苦苷(10:1)。取同一批龙胆苦苷 3 份, 每份 1.0 g, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加乙酸酐 10 mL 使溶解, 加入吡啶 5 mL, 室温反应 12 h, 减压回收溶剂, 干燥, 得褐色固体, 即反应物粗品, 计算乙酰化产物得率 94.02% (RSD 0.8%)。

2.2 龙胆苦苷乙酰化产物结构的表征

2.2.1 紫外光谱测定 将龙胆苦苷及反应产物用乙腈溶解后, 于 200~400 nm 进行扫描, 结果显示二者均在 270 nm 附近有最大吸收, 而且紫外吸收图谱相似, 说明反应产物与龙胆苦苷的母体结构相似。

2.2.2 质谱鉴定 质谱条件为电喷雾离子源 (ESI), 采用多反应离子监测 (MRM) 模式进行正离子监测, 鞘气 (氮气) 流量 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 离子源喷雾电压 5.5 kV, 毛细管温度 300 °C。反应产物一级和二级图谱分别见图 1, 2。一级图谱中 m/z 524.83 (M^+), 547.14 ($+ \text{Na}^+$), 564.17 ($+ \text{K}^+$); 二级图谱

中 m/z 547.90 ($+ \text{Na}^+$), 503.07 ($- \text{COCH}_3$), 486.97 ($- \text{OCOCH}_3$), 353.13 ($- 4$ 个 $- \text{COCH}_3$)。根据文献[11-12]报道, 可验证反应产物为四乙酰化龙胆苦苷。

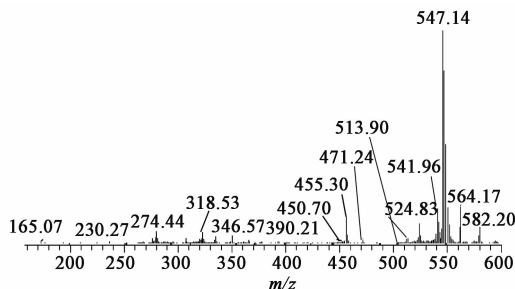


图 1 龙胆苦苷乙酰化产物的质谱一级扫描

Fig. 1 First scan of mass spectrometry of acetylated product of gentiopicroside

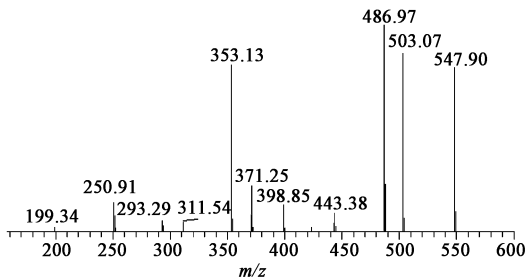


图 2 龙胆苦苷乙酰化产物的质谱二级扫描

Fig. 2 Secondary scan of mass spectrometry of acetylated product of gentiopicroside

2.3 乙酰化产物的理化性质研究

2.3.1 表观油/水分配系数的测定 量取水 200 mL 与正辛醇 200 mL 混合, 于磁力搅拌器上搅拌 24 h, 静置, 分液后得水饱和的正辛醇和正辛醇饱和的水。准确量取水饱和的正辛醇溶液 70 mL, 加入一定量四乙酰化龙胆苦苷, 超声使溶解, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进行 HPLC 检测。精密吸取经过滤的水饱和和正辛醇含药溶液 5 mL 至 12 个玻璃管中, 分别加入正辛醇饱和的水和 pH 1.2, 2.0, 5.0, 6.8, 7.8~8.0 磷酸盐缓冲溶液 5 mL, 每组 2 份, 置于振荡器中振荡, 温度 $(37 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$, 72 h 后分别吸取醇层及水层, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 检测。四乙酰化龙胆苦苷的表观油/水分配系数常用对数 ($\lg P$) = 1.40, 在 pH 1.2 条件下的 $\lg P = 1.63$, pH 2.0 条件下的 $\lg P = 0.94$, pH 5.0 条件下的 $\lg P = 0.75$, pH 6.8 条件下的 $\lg P = 0.64$, pH 7.8~8.0 条件下 $\lg P = 0.65$, 随着 pH 的增加, P 基本呈现略下降趋势。龙胆苦苷结构中引入 4 个乙酰基后, P 增大, 表明其生物膜的透过性有较大改善, 在体内可能有较好的吸收。

2.3.2 稳定性考察 龙胆苦苷乙酰化产物在高温条件下放置 10 d, 样品颜色加深、结团, 纯度 < 90%, 表明其对高温敏感。在高湿条件下放置 10 d, 外观未见明显改变, 纯度 > 97%, 且第 5, 10 天吸湿率均 < 0.1%, 表明其对高湿不敏感。在强光条件下放置 10 d, 外观未见明显改变, 纯度 > 94%, 表明其对强光不敏感。在 pH < 2.0 缓冲液中 12 h 内降解 > 50%, 随着酸度的增加, 龙胆苦苷乙酰化产物降解增加, 表明其在酸性条件下不稳定。

2.3.3 粉体学基本性质测定 龙胆苦苷乙酰化产物的振实密度 $0.5866 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 堆密度 $0.3476 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 休止角 50.34 度, 说明其流动性欠佳, 堆密度较小, 在制剂工艺中可能出现充填不均匀, 质量差异较大等问题。在处方设计时, 可通过造粒或加入适量辅料以改变粉体的流动性。

3 讨论

龙胆苦苷极性大, 难以在生物膜中进行有效的转运, 体内吸收生物利用度差, 使得其开发与应用受到极大限制。针对龙胆苦苷的结构特点, 本文对龙胆苦苷进行结构修饰, 设计合成了具有较强脂溶性的衍生物以改善其脂水分配系数, 提高体内生物利用度^[10]。

虽已有大量文献对龙胆苦苷共轭体系外的双键、苷键、羟基进行研究, 并开展了多个方向的结构修饰研究, 但都没有十分理想的技术路线方案。例如用 β -葡萄糖苷酶或黑曲水解龙胆苦苷苷键, 得到龙胆苦醛, 其抗炎镇痛效果比龙胆苦苷好, 但苷键水解所用 β -葡萄糖苷酶成本高, 黑曲成本相对较低, 同时其催化产物复杂。用双键还原得到的氢化龙胆苦苷镇痛效果略有降低, 而双键氢化采用钯-碳 (Pd-C) 高压加氢, Pd-C 活性很高, 在空气中可自燃, 实验时比较危险^[11]。本文在综合分析以往龙胆苦苷结构修饰研究基础上, 采用糖羟基全乙酰化得到的四乙酰化龙胆苦苷, 有文献研究已表明其体内各项生

物活性均有所提高^[12], 而且全乙酰化反应易控制、产率较高。

[参考文献]

- [1] 李艳秋, 赵德化, 潘伯荣, 等. 龙胆苦甙抗鼠肝损伤的作用 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22 (18): 1645-1649.
- [2] 佟丽, 陈育尧, 刘欢欢, 等. 龙胆粉针剂对实验性肝损伤的作用 [J]. 第一军医大学学报, 2001, 21 (12): 906-907.
- [3] 李飞艳, 邱赛红, 尹健康, 等. 常用苦寒药对大鼠胃肠激素影响的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27 (1): 9-11.
- [4] 郭海凤, 朴惠顺. 龙胆苦苷的提取工艺及药理作用研究进展 [J]. 延边大学医学学报, 2010, 33 (1): 70-73.
- [5] 陈长勋, 刘古文, 孙峥嵘, 等. 龙胆苦苷抗炎药理作用研究 [J]. 中草药, 2003, 34 (9): 814-816.
- [6] Wang C H, Wang Z T, Bligh S W, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of gentiopicoside following oral and intravenous administration in mice [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2004, 29 (3): 199-203.
- [7] 赵莹, 赵瑞芝, 陈有军, 等. 醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (17): 71-74.
- [8] 陈红莉, 姜标, 李援朝. 结构修饰策略改善药物血脑屏障通透性 [J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21 (6): 489-494, 506.
- [9] 于琰, 尹静梅, 贾颖萍, 等. 糖苷中间体全乙酰化 D-木糖的合成研究 [J]. 化工中间体, 2009, 5 (4): 19-21.
- [10] 黄海涛, 姜茹, 岳正刚, 等. 3-全乙酰化半乳吡喃糖基-5-氟尿嘧啶的合成及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27 (12): 1710-1713.
- [11] 陈雷. 龙胆苦苷衍生物合成及药理作用研究 [D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [12] 王海波. I. 金鸡纳生物碱衍生物的合成方法研究; II. 龙胆苦苷衍生物的合成及其对 CVB3 和 SIV 的体外抑制作用 [D]. 西安: 第四军医大学, 2008.

[责任编辑 刘德文]