

5R-5-羟基雷公藤内酯醇的晶型制备与表征

刘瑞丽, 杨亚玺, 陈东英*

(中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 本文对用于治疗类风湿性关节炎的候选新药 5R-5-羟基雷公藤内酯醇 (LLDT-8) 进行了晶型研究。采用蒸发结晶和溶剂结晶法对 LLDT-8 进行了晶型制备筛选, 并采用粉末 X 射线衍射 (p-XRD)、差示扫描量热分析 (DSC)、热重分析 (TG)、红外光谱 (IR) 以及单晶 X 射线衍射分析技术对制备得到的 LLDT-8 样品进行了晶型表征。结果表明上述制备方法得到的 LLDT-8 晶体样品, 其 p-XRD、IR、DSC 和 TG 图谱均一致, 其中粉末 X 射线衍射八强峰位于 7.58°、8.14°、8.66°、15.46°、16.46°、29.54°、31.16° 和 38.26°; 红外光谱吸收峰位于 3 471.3、2 962.2、2 887.0、1 762.6、1 677.8、1 432.9、1 365.4、1 247.7、1 080.0、1 031.7 和 877.5 cm^{-1} ; DSC 结合 TG 分析结果显示 LLDT-8 在 271.2 °C 左右发生分解。单晶 X 射线衍射分析表明 LLDT-8 晶体属单斜晶系, 空间群为 P2 (1); 晶胞参数 $a = 11.460$ 1 (11), $b = 6.320$ 5 (6), $c = 13.028$ 1 (12), $\alpha = 90.00$, $\beta = 115.557$ (2), $\gamma = 90.00$; 分子间形成氢键。进一步通过不同极性溶剂中的匀浆实验进行晶相的稳定性实验, 其粉末 X 射线衍射图谱未发生变化, 说明其晶型未发生转变, 表明现有晶型具有较好的稳定性, 有利于保证临床疗效的一致性。

关键词: 5R-5-羟基雷公藤内酯醇; 晶型制备; 晶型表征; 候选药物; 稳定性

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1357-04

Polymorphism of the 5R-5-hydroxytriptolide

LIU Rui-li, YANG Ya-xi, CHEN Dong-ying*

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: 5R-5-hydroxytriptolide (LLDT-8) is a new drug candidate which is in clinical trial treating rheumatoid arthritis. Polymorph screening of the compound was carried out in this study. Polymorph of LLDT-8 was prepared by evaporative crystallization and antisolvent crystallization methods and was characterized by powder X-ray diffraction (p-XRD), infrared spectrometry (IR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TG). It was found that p-XRD patterns, DSC curves, TG curves and IR spectra of the LLDT-8 samples prepared by the above recrystallization methods were all consistent. The 2θ of main peaks in the p-XRD patterns appeared at 7.58°, 8.14°, 8.66°, 15.46°, 16.46°, 29.54°, 31.16° and 38.26°, while the infrared absorption peaks appeared at 3 471.3, 2 962.2, 2 887.0, 1 762.6, 1 677.8, 1 432.9, 1 365.4, 1 247.7, 1 080.0, 1 031.7 and 877.5 cm^{-1} . LLDT-8 was decomposed at 271.2 °C based on the determination from DSC and TG. It was showed in single crystal X-ray diffraction study that LLDT-8 crystal was monoclinic with the space group being P2 (1). The cell parameters were found to be: $a = 11.460$ 1 (11), $b = 6.320$ 5 (6), $c = 13.028$ 1 (12), $\alpha = 90.00$, $\beta = 115.557$ (2) and $\gamma = 90.00$. The crystal was a hydrogen-bonded dimer. The slurry experiments, which were further conducted in solvents with different polarities, confirmed the stability of solid state of LLDT-8 based on the p-XRD determination. The polymorph of LLDT-8 made assurance of its efficacy consistence during its clinical trials.

收稿日期: 2011-04-12.

基金项目: “新药研究国家重点实验室”资助项目 (SIMM0909KF-11); 国家科技重大专项“重大新药创制”课题综合性大平台资助项目 (2009ZX09301-001).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50806053, E-mail: dychen@mail.shnc.ac.cn

Key words: 5R-5-hydroxytriptolide; crystalline polymorph preparation; crystalline polymorph characterization; drug candidate; stability

固体药物由于空间排列和晶胞参数不同而形成的多晶现象 (polymorphism)^[1, 2], 可能造成外观、熔点、溶解特性、稳定性和生物利用度等方面显著不同, 最终可能导致药物疗效及安全性出现差异^[3-6]。晶型筛选是药物多晶型研究的重要组成部分, 并且贯穿于药物研发的各个阶段。药物晶型的筛选制备方法多样, 通常可以分为溶液结晶法和固体结晶法^[7-10]。近年来也出现了一些新的技术, 如毛细管结晶技术^[11], 激光诱导结晶技术^[12]以及超声结晶技术^[13]等等。溶液结晶技术是晶型筛选中的常用结晶技术, 包括蒸发结晶和溶析结晶等方法。蒸发结晶广泛应用于晶体制备过程, 当其他方法无法诱导结晶时, 该方法也是实验室固体回收的默认方法。溶析结晶通过在结晶溶液中加入溶析剂 (又称反溶剂) 使其达到过饱和而析出晶体。在溶析结晶中通常要求溶析剂与原溶剂能够互溶, 而结晶物质仅能极微溶解或不溶于溶析剂。

在获得药物的晶型后, 对其进行表征至关重要。常规的表征手段包括粉末 X 射线衍射法、单晶 X 射线衍射法、热分析法 (差热分析法、差示扫描量热法以及热重分析法)、红外分光光度法、拉曼光谱法、热台显微镜法、固态核磁共振法、溶解度测定法等^[14-16]。其中 X 射线衍射分析方法能够较全面地提供固体晶型药物分子结构、分子排列规律、分子构象变化、分子间作用力, 能够直观显示晶型的指纹性特征, 这些信息是有效进行晶型专利保护的必要条件。

药物晶型可以分为稳定晶型、亚稳定晶型和不稳定晶型。稳定晶型由于在制剂和储存过程中不易发生转晶, 通常认为具有较好的成药性。匀浆法是考察晶型稳定性的一种有效方法。通过匀浆过程中溶剂介导的相变, 亚稳定晶型将逐渐溶解, 当溶液浓度达到或超出稳定晶型的溶解度时, 稳定晶型即可成核生长^[17-20]。通过检测匀浆前后晶型变化来考察晶型的稳定性。

5R-5-羟基雷公藤内酯醇 (LLDT-8, 图 1) 是从药用植物雷公藤中提取分离再经修饰优化而得到的二萜化合物^[21]。初步研究表明 LLDT-8 具有体内、外免疫抑制活性高、毒性低、体内代谢过程和分布明确等优点, 是治疗类风湿性关节炎的新型免疫抑制剂, 目前正在临床试验阶段。本文通过对 LLDT-8 进行晶型筛选研究, 包括对其进行晶型筛选制备和晶型表征,

以及匀浆稳定性考察, 希望对该候选药物的晶型性质进行较为充分的了解。

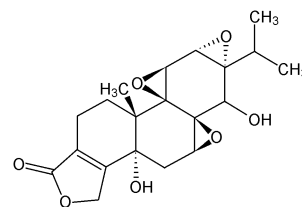


Figure 1 Chemical structure of 5R-5-hydroxytriptolide (LLDT-8)

材料与方法

药品与试剂 LLDT-8 原料药由本所李援朝教授提供。乙腈、甲醇、丙酮、乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、异丙醇、二氯甲烷、石油醚均为分析纯试剂 (中国医药集团化学试剂公司)。

晶体制备 蒸发结晶法: 称取适量 LLDT-8 原料药样品, 甲醇、丙酮、二氯甲烷和乙醇作为溶剂使溶解, 室温下自然挥发溶剂至溶剂挥发完, 将所得固体于 42 °C 真空干燥 24 h。溶析结晶法: 分别选择甲醇、丙酮和二氯甲烷作为溶剂, 将 LLDT-8 原料药样品溶解后, 滴加水、乙酸乙酯或石油醚作为溶析剂至有固体析出, 静置析晶 2 h。采用 80-1 型离心机 (上海医疗器械厂) 离心 5 min, 转速为 2 000 r·min⁻¹。将上清液移除后得到的固体于 42 °C 真空干燥 24 h。

晶型表征 粉末 X 射线衍射 (p-XRD) 表征: 采用 D/MAX 2550 VB/PC 型转靶 X 射线多晶衍射仪 (Rigaku, 日本), Cu K α 辐射, 管压 40 kV, 管流 100 mA, 石墨单色器, 2 θ 扫描范围为 3°~50°, 扫描速度为 8°·min⁻¹, 步长为 0.02°。差示扫描量热分析 (DSC): 采用 DSC 204/1/G Phoenix 型差示扫描量热分析仪 (Netzsch, 德国), Al 坩埚, 升温范围为 30~300 °C, 升温速率为 10 °C·min⁻¹, 气氛为氮气。热重分析 (TG): 采用 TG 209 F3 型热重分析仪 (Netzsch, 德国), Al₂O₃ 坩埚, 升温范围为 30~300 °C, 升温速率为 10 °C·min⁻¹, 气氛为氮气。红外光谱 (IR) 表征: 采用 Magana FTIR 红外光谱仪 (Nicolet, 美国), KBr 压片。

单晶 X 射线衍射分析: 取 LLDT-8 在丙酮溶液中形成的无色透明固体, 将其切割成小块 (0.387 mm × 0.305 mm × 0.212 mm), 进行单晶 X 射线衍射分析。采用 Smart Apex II 单晶衍射仪 (Bruker, 德国), 用 CCD

面探测器收集衍射强度数据, 用经过石墨单色器的 $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0.071\ 073\ \text{nm}$) 辐射为光源, 在 293 (2) K 温度下收集衍射数据, 晶体结构采用 SHELXS-97 程序中的直接法解出。由理论加氢法确定氢原子的坐标, 其他非氢原子采用全矩阵最小二乘法和各项异性进行修正。将单晶数据文件导入 PLATON 程序拟合粉末 X 射线衍射图谱, 并与实测粉末 X 射线衍射图谱进行比对。

匀浆稳定性实验 将以上方法制备得到的 LLDT-8 样品混悬于水、乙腈、甲醇、丙酮、乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、异丙醇、二氯甲烷和石油醚中, 混悬液室温下磁力搅拌 14 天。离心 5 min, 转速 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。将上清液移除后所得固体于 $42\ ^\circ\text{C}$ 真空干燥 24 h, 采用 p-XRD 进行表征。

结果与讨论

1 LLDT-8 晶体制备的溶剂选择

经溶解性实验发现 LLDT-8 略溶于甲醇和丙酮, 微溶于二氯甲烷和乙醇, 极微溶解于乙酸乙酯, 难溶于水 and 石油醚。在蒸发结晶实验中, 选择对 LLDT-8 具有较好溶解性的甲醇、丙酮、二氯甲烷和乙醇作为溶剂, 室温下缓慢挥发溶剂, 得到无色透明固体。在溶析结晶实验中, 使用对 LLDT-8 具有较高溶解度的甲醇、丙酮和二氯甲烷作为溶剂, 溶解性较弱的水、乙酸乙酯或石油醚作为溶析剂。结果发现用丙酮和二氯甲烷作为溶剂, 石油醚作为溶析剂时, 可以析出无色透明结晶固体。而采用甲醇作为溶剂, 水、乙酸乙酯或石油醚为溶析剂; 丙酮作为溶剂, 水或乙酸乙酯作为溶析剂; 以及二氯甲烷为溶剂, 水或乙酸乙酯作为溶析剂时, 均不能析出固体。

2 晶型表征

2.1 粉末 X 射线衍射分析 LLDT-8 固体经 p-XRD 分析均呈现明显的衍射峰, 提示得到的 LLDT-8 样品均为晶体。经过图谱比对, 发现不同方法制备得到的 LLDT-8 样品衍射峰的位置和相对强度一致, 其粉末 X 射线衍射八强峰的 2θ 角分别位于 7.58° 、 8.14° 、 8.66° 、 15.46° 、 16.46° 、 29.54° 、 31.16° 和 38.26° (图 2)。

2.2 TG 和 DSC 分析 利用 TG 和 DSC 分析测定 LLDT-8 样品, 发现各样品的热力学行为表现一致。DSC 图谱 (图 3A) 显示 LLDT-8 样品在 $30\sim 300\ ^\circ\text{C}$ 内仅出现一个放热峰, 外推起始点位于 $264.9\ ^\circ\text{C}$, 峰值对应温度为 $269.1\ ^\circ\text{C}$ 。TG 图谱 (图 3B) 显示 LLDT-8 样品发生失重现象, 失重量为 20.6%, DTG 曲线峰

值对应温度为 $271.2\ ^\circ\text{C}$ 。综合分析, LLDT-8 样品在 $271.2\ ^\circ\text{C}$ 左右发生失重现象是由于热分解导致的。

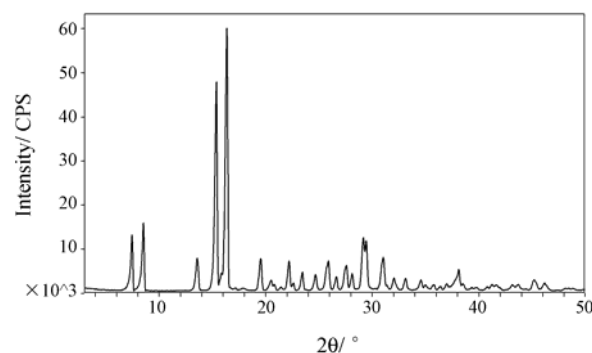


Figure 2 Powder X-ray diffraction pattern of LLDT-8

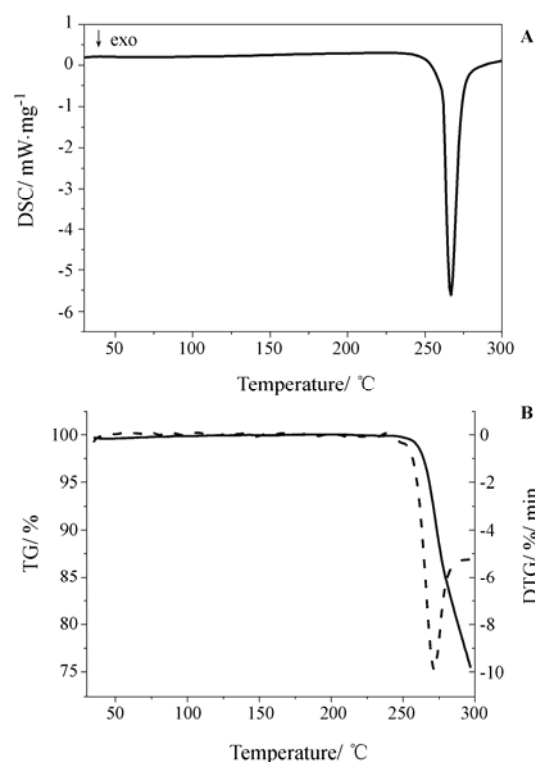


Figure 3 DSC curve (A), TG curve (solid line, B) and DTG curve (dash line, B) of LLDT-8

2.3 红外光谱分析 将以上不同方法制备得到的 LLDT-8 样品进行红外光谱检测。经图谱比对, 发现在上述条件下制得样品的红外吸收特征峰的位置和强度均一致, 其红外吸收峰位于 $3\ 471.3$ 、 $2\ 962.2$ 、 $2\ 887.0$ 、 $1\ 762.6$ 、 $1\ 677.8$ 、 $1\ 432.9$ 、 $1\ 365.4$ 、 $1\ 247.7$ 、 $1\ 080.0$ 、 $1\ 031.7$ 和 $877.5\ \text{cm}^{-1}$ 。

2.4 单晶 X 射线衍射分析 通过挥发丙酮溶剂可以得到表面光滑、颗粒尺寸较大的晶体, 进行单晶 X 射线衍射测定。结果表明, LLDT-8 晶体属单斜晶系, 空间群为 $P2(1)$; 晶胞参数 $a = 11.460\ 1(11)$, $b = 6.320\ 5$

(6), $c = 13.028$ 1 (12), $\alpha = 90.00$, $\beta = 115.557$ (2), $\gamma = 90.00$; 晶胞体积 $V = 851.34$ (14) Å^3 ; 晶胞内分子数 $Z = 2$; 分子间形成氢键。经 PLATON 程序拟合该单晶的粉末 X 射线衍射与实测粉末 X 射线衍射图一致。

3 匀浆稳定性实验

将 LLDT-8 晶体在水、乙腈、甲醇、丙酮、乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、异丙醇、二氯甲烷和石油醚 (极性参数范围为 10.20~0.01) 中进行匀浆, 以考察现有晶型的稳定性。与匀浆前样品 p-XRD 图谱相比较, 发现匀浆后各样品相应图谱并未发生变化, 说明其晶型未发生变化。

结论

综合分析结果, 不同方法制备得到的 LLDT-8 样品表现出一致的 X 射线衍射、热分析和红外光谱行为, 可以说明晶型一致。单晶模拟粉末 X 射线衍射与实测粉末 X 射线衍射图一致, 说明通过以上方法制备得到的 LLDT-8 晶体结构为单一晶型。

进一步通过匀浆实验显示了 LLDT-8 晶型在不同极性溶剂中未发生相变, 说明现有晶型较为稳定, 这将对保证该候选药物在制剂生产、储存过程中晶型的稳定性以及临床疗效的一致性都具有重要意义。

References

- [1] Haleblan J, McCrone W. Pharmaceutical applications of polymorphism [J]. J Pharm Sci, 1969, 58: 911-929.
- [2] Brittain HG. Theory and principles of polymorphic systems, [M]//Brittain HG. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. 2nd ed. New York: Informa Healthcare Press, 2009: 1-23.
- [3] Raw AS, Furness MS, Gill DS, et al. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs) [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56: 397-414.
- [4] Huang LF, Tong WQ. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56: 321-334.
- [5] Dharmendra S, William C. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56: 335-347.
- [6] Chemburkar SR, Bauer J, Deming K. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development [J]. Org Process Res Dev, 2000, 4: 413-417.
- [7] Llinàs A, Goodman JM. Polymorph control: past, present and future [J]. Drug Discov Today, 2008, 13: 198-210.
- [8] Aaltonen J, Allesø M, Mirza S, et al. Solid form screening — a review [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71: 23-37.
- [9] Cains PW. Classical methods of preparation of polymorphs and alternative solid forms [M]//Brittain HG. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. 2nd ed. New York: Informa Healthcare Press, 2009: 76-138.
- [10] Yang L, Ru ML, Lang MD. The crystalline polymorph control and selection of gabapentin with polymer heteronuclei [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 109-113.
- [11] Childs SL, Chyall LJ, Dunlap JT, et al. A metastable polymorph of metformin hydrochloride: isolation and characterization using capillary crystallization and thermal microscopy techniques [J]. Cryst Growth Des, 2004, 4: 441-449.
- [12] Myerson AS, Garetz BA. Method for using laser light to control crystal form: US, 6426406 [P]. 2002-07-30.
- [13] Ruecroft G, Hipkiss D, Ly T, et al. Sonocrystallization: the use of ultrasound for improved industrial crystallization [J]. Org Process Res Dev, 2005, 9: 923-932.
- [14] Giron D. Monitoring of polymorphism — from detection to quantification [J]. Eng Life Sci, 2003, 3: 103-112.
- [15] Lin KJ, Chen W, You QD. Detection of crystal polymorphs of nateglinide by DSC [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 46-49.
- [16] Yuan XB, Jiang DH, Shen HB, et al. Study on polymorphism of gossypol by infrared spectrophotometry and X-ray diffraction [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1991, 26: 152-155.
- [17] Miller JM, Collman BM, Greenea LR, et al. Identifying the stable polymorph early in the drug discovery-development process [J]. Pharm Dev Technol, 2005, 10: 291-297.
- [18] Zhang GGZ, Law D, Schmitt EA, et al. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56: 371-391.
- [19] Shan G, Igarashi K, Noda H, et al. Control of solvent-mediated transformation of crystal polymorphs using a newly developed batch crystallizer (WWDJ-crystallizer) [J]. Chem Eng J, 2002, 85: 169-176.
- [20] Maruyama S, Ooshima H. Mechanism of the solvent-mediated transformation of taltirelin polymorphs promoted by methanol [J]. Chem Eng J, 2001, 81: 1-7.
- [21] Li YC, Zou JP, Zhang F, et al. Tripterygiumforrestii triptolide derivatives and their application: CN, ZL03102976.0 [P]. 2005-10-19.