

· 论著 ·

原料纯度对白及多糖疏水改性反应取代度的影响

赵雪竹^{1,3}, 刘洋², 王艳萍³, 刘福强³, 张琦³, 刘丹³, 赵楠³, 韩丹³, 赵庆兰^{1,3} (1. 延边大学药学院, 吉林延吉 133000; 2. 沈阳军区长春干休所, 吉林长春 130000; 3. 解放军 208 医院, 吉林长春 130062)

[摘要] 目的 通过纯化反应原料之一胆甾醇琥珀酸酯(CHS), 提高疏水改性白及多糖的胆甾醇基取代度。方法 利用重结晶法纯化 CHS, 并采用差示量热扫描法(DSC)及 X 射线衍射法(XRD)对 CHS 纯品进行表征; 用高效液相色谱法(HPLC)测定纯化前后产品中游离胆甾醇的含量; ¹H-NMR 法测定 CHS 纯化前后改性白及多糖的胆甾醇基取代度。结果 重结晶后的 CHS 纯度较高, 具有晶体性质, 可明显提高改性白及多糖的胆甾醇基取代度。结论 纯化方法简便、可行, 为提高改性白及多糖胆甾醇基取代度提供研究基础。

[关键词] 原料纯度; 胆甾醇琥珀酸酯; 取代度

[中图分类号] R94

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)03-0221-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.008

Effect of raw material purity on the degree of substitution of hydrophobically modified *Bletilla striata* polysaccharide

ZHAO Xuezu^{1,3}, LIU Yang², WANG Yanping³, LIU Fuqiang³, ZHANG Qi³, LIU Dan³, ZHAO Nan³, HAN Dan³, ZHAO Qinglan^{1,3} (1. School of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Changchun Sanatorium for Retired Cadres, Shenyang Military Region, Changchun 130000, China; 3. No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

[Abstract] **Objective** To improve the degree of substitution of the cholesteryl by purifying cholesteryl succinyl ester (CHS), one of the raw materials. **Methods** CHS was purified by recrystallization, the pure CHS structure was characterized by differential scanning calorimetry (DSC) and X ray diffraction (XRD), the free cholesterol content of the pure and crude were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), the degree of substitution of the cholesteryl was determined before and after the purified by ¹H-NMR. **Result** CHS was purer after recrystallization, with property of crystal, which could significantly improve the degree of substitution of the cholesteryl. **Conclusion** The method of purification was simple and feasible, which was the basis of improving hydrophobically modified *Bletilla striata* polysaccharide's degree of substitution of the cholesteryl.

[Key words] the purity of raw materials; cholesteryl succinyl ester; substitution degree

白及多糖主要由 β -1,4-甘露糖和 β -1,4-葡萄糖组成^[1], 结构中含有丰富的活性羟基, 具有亲水性, 引入疏水性的胆甾醇基, 使其呈两性, 继而制备纳米粒, 可具有载药、增溶、缓释等功能, 是目前国内外的研究热点^[2,3]。疏水改性反应中胆甾醇基取代度对纳米粒的功能影响甚大, 而影响取代度的因素较多, 主要是反应物即原料的纯度, 本试验先是纯化 CHS, 并对其纯品进行表征, 利用 HPLC 法测定纯化前后产品中游离胆甾醇的含量; 再利用 ¹H-NMR 法测定 CHS 纯化

前后改性白及多糖的胆甾醇基取代度。

1 仪器与材料

1.1 仪器 79-1 型磁力加热搅拌器(江苏省金坛市友联仪器研究所); ZK-82B 型真空干燥器箱(上海实验仪器总厂); SHZ-D 循环水式真空泵(巩义予华仪器有限公司); 400 MHz 液态核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); 98-1-C 型数字控温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司); LC-10AVT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Pyris Diamond TG/DTA 热重/差热综合热分析仪(美国 PE 公司); D8-ADVANCE 广角 X 射线衍射仪(德国 BRUKER 公司)。

1.2 试剂 白及多糖(实验室自制); 胆甾醇(上海惠世生化制剂有限公司); 琥珀酸酐(天津市光复精细化工研究所); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173559)

[作者简介] 赵雪竹, 硕士研究生. Tel: 15948230094; E-mail: xuezhu_20080808@126.com

[通讯作者] 张琦, 博士, 主管药师. 研究方向: 药学新技术. Tel: (0431)86988187; E-mail: zqi8229@126.com

亚胺盐酸盐(上海源叶生物科技有限公司);4-二甲氨基吡啶(上海展云化工有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 白及多糖疏水改性的过程^[4]

2.1.1 胆甾醇琥珀酸酯的合成 取胆甾醇和琥珀酸酐各 10 g 溶解于 140 ml 除水吡啶中,室温反应 72 h 后终止反应,反应液滴入冰盐酸溶液(盐酸-冰水=12:40:50)中,析出白色絮状沉淀。冷藏过夜,抽滤,收集沉淀。沉淀用蒸馏水洗至 pH>5,于乙酸乙酯-乙醇(3:1)中重结晶,真空干燥,得白色针状胆甾醇琥珀酸酯(CHS)纯品。反应式见图 1。

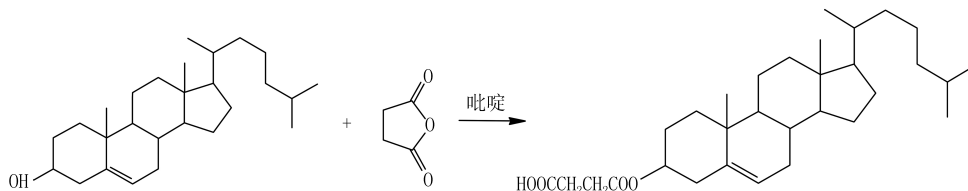


图 1 胆甾醇琥珀酸酯(CHS)的合成路线

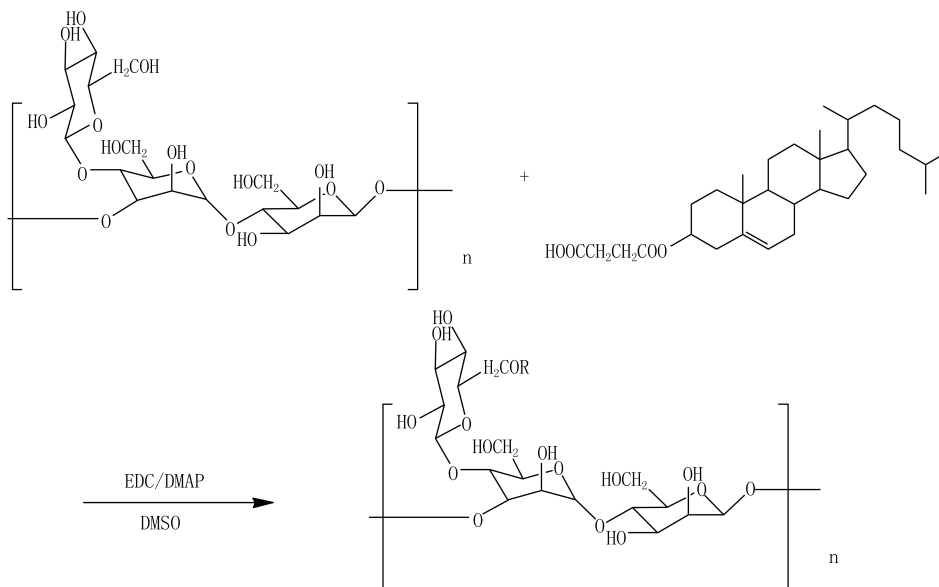


图 2 琥珀酰胆甾醇基白及多糖(CHSB)的合成路线(R=CHS)

2.2 CHSB 胆甾醇基取代度的测定 根据文献,胆甾醇基取代度常用的测定方法有硫酸铁铵比色法^[5]、HPLC 法^[6]及¹H-NMR 法^[5,6],但考虑到硫酸铁铵比色法、HPLC 法在前处理过程中不能保证全部的胆甾醇从白及多糖主链上脱离下来,测定的是脱离下来的游离胆甾醇,测定结果存在一定误差,而¹H-NMR法是对胆甾醇琥珀酰基-白及多糖进行全分子扫描,测定结果准确度较高,故本研究所列的取代度均为¹H-NMR 法测定获得的数值。

2.1.2 胆甾醇琥珀酰基-白及多糖的合成 取白及多糖样品 0.5 g 溶解于 50 ml 二甲基亚砜(DMSO)中,备用;取一定量的胆甾醇琥珀酸酯(CHS)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC) [EDC/CHS=1.2(mol/mol,催化剂)],4-二甲氨基吡啶(DMAP) [DMAP/CHS=1(mol/mol,催化剂)],溶解于 20 ml 的 DMSO(溶媒)中,室温搅拌,反应活化 2 h;将活化反应液滴入白及多糖溶液中,反应 48 h,停止反应。将反应液滴入 500 ml 无水乙醇中,析出白色沉淀,抽滤,分别用适量的乙醇、四氢呋喃和乙醚洗涤产物,80 °C 下真空干燥,即得胆甾醇琥珀酰基-白及多糖(CHSB)。改变 CHS 的用量,可制备不同取代度的 CHSB。反应式见图 2。

称取 5~10 mg CHSB 样品用氘代氯仿(CDCl₃)溶解后加入核磁管中,采用 400 MHz 液态核磁共振波谱仪测定样品核磁共振氢谱。由于白及多糖特征峰(δ/10⁻⁶):δ5.36 [H_(1,5)]和 δ4.62 [H_(1,4)]容易分辨,如图 3;CHSB 图谱中 δ2.61 (-OCH₂CH₂O-)容易分辨,如图 4,故可用峰面积(A)比值来计算胆甾醇在白及多糖上的取代度,通过公式(1)^[7]计算样品胆甾醇基取代度(DS)。

$$DS\% = \left[\frac{A_{\delta 2.61} / 4}{A_{\delta 5.36} + A_{\delta 4.62}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

$A_{\delta 2.61}$, CHSB核磁共振图谱中 $\delta 2.61$ 处的峰面积; $A_{\delta 5.36}$,白及多糖核磁共振图谱中 $\delta 5.36$ 处的峰面积; $A_{\delta 4.62}$,白及多糖核磁共振图谱中 $\delta 4.62$ 处的峰面积。

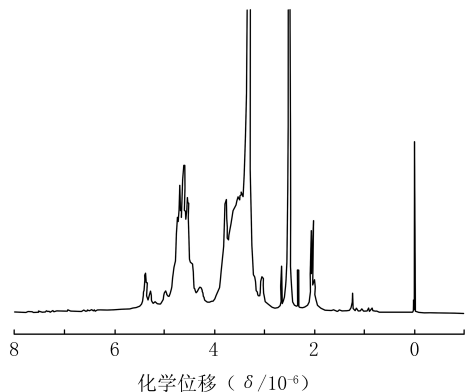


图3 白及多糖核磁共振图谱

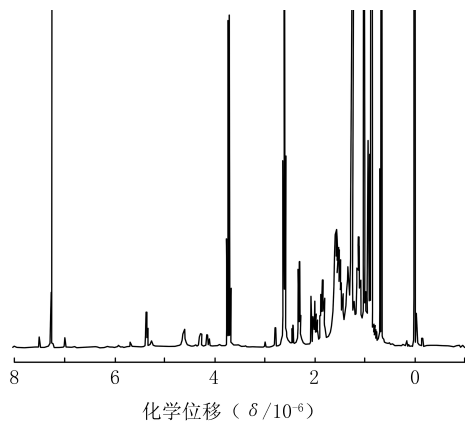


图4 CHSB核磁共振图谱

2.3 反应物(原料)的纯化

2.3.1 白及多糖的纯化 白及多糖在提取过程中经过了脱脂、醇沉、脱蛋白等纯化处理,纯度较高,且通过试验证明重复上述纯化步骤并没有对样品取代度有显著影响,故对白及多糖的纯化方法在此不做讨论。

2.3.2 CHS的纯化方法 本试验采用重结晶法对CHS粗品进行纯化:称取一定量CHS粗品,加入适量的乙酸乙酯-乙醇(3:1,V/V),冷凝回流加热至沸腾,趁热过滤。冷却滤液,析出晶体。抽滤,滤饼真空干燥,即得白色针状CHS纯品。

2.3.3 CHS的纯化结果

2.3.3.1 结晶产率(Y) 结晶产率通过公式2进行计算。结晶产率为45.23%。

$$Y = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (2)$$

m_1 ,重结晶前CHS的质量(g); m_2 ,重结晶后CHS的质量(g)。

2.3.3.2 纯化前、后CHS状态 图5、图6为纯化前、后CHS照片。可见,纯化前CHS肉眼观察为白色固体(图5),而重结晶后CHS镜下观察为白色针状晶体(图6)。

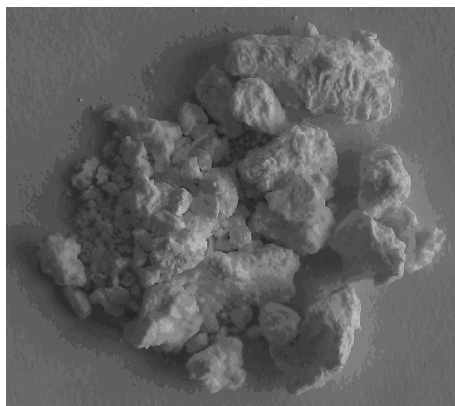


图5 纯化前CHS状态

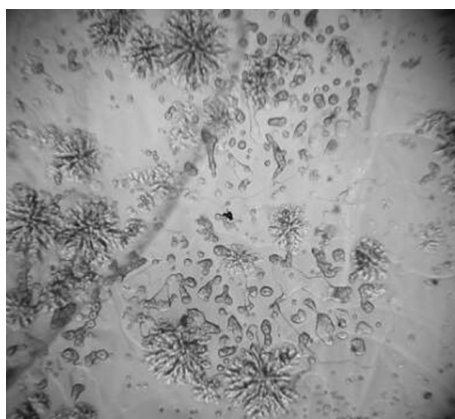


图6 纯化后CHS状态(EM,×100)

2.3.3.3 CHS的DSC分析^[8] 重结晶后的CHS具有晶体性质,采用差示量热扫描法进行样品分析,仪器使用前用钢校正,在氮气保护下测定样品。每次取样4~6 mg,以10 °C/min升温,加热样品至200 °C,记录样品DSC曲线。见图7。

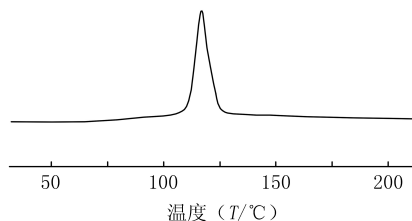


图7 样品DSC曲线

由图7可以看出,CHS为小分子结晶物质,在120 °C左右出现尖锐的熔点吸热峰,说明重结晶后CHS纯度较高。

2.3.3.4 CHS 的 X 射线衍射(XRD)表征 称取少量 CHS 置于样品板,采用 X 射线衍射仪测定样品的 X 射线晶体衍射图谱。检测条件:Cu 靶;检测波长:0.154 nm。见图 8。

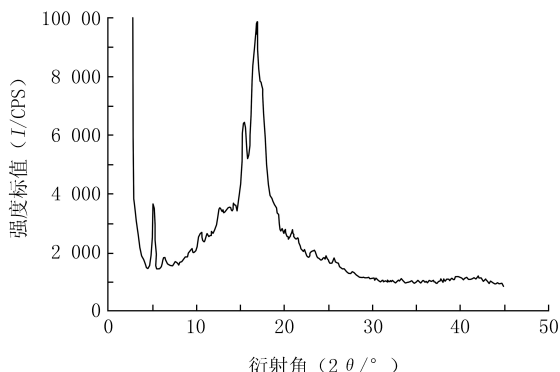


图 8 CHS 的 X 射线晶体衍射图谱

由图 8 可见,CHS 为小分子结晶物质,具有良好的晶型,故其 X 射线晶体衍射图谱出现较多的晶体衍射峰,分别在 2θ 为 6.38° 、 1.52° 、 14.40° 、 15.43° 、 16.83° 、 19.10° 、 20.98° 、 23.32° 出现 8 个特征峰,在 $25^\circ\sim 45^\circ$ 间还分布许多小晶体峰。与 DSC 分析结果相互验证,说明重结晶后的 CHS 具有晶体性质。

2.3.3.5 CHS 纯化前、后产品中游离胆甾醇含量测定 采用高效液相色谱法测定;色谱条件为 Diamonsil C_{18} 色谱柱 ($4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);柱温为 $30\text{ }^\circ\text{C}$;流动相为色谱纯甲醇;流速为 1 ml/min ;检测波长为 202 nm 。

精密称取胆甾醇对照品适量,甲醇溶解,配制成 1 mg/ml 的对照品储备液。精密量取一定量的储备液,用甲醇稀释成质量浓度分别为 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 mg/ml 的胆甾醇对照品溶液,分别取 $20\text{ }\mu\text{l}$ 用高效液相色谱仪进行测定,以胆

甾醇峰面积(A)为纵坐标,胆甾醇质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程为 $A = 4.0 \times 10^6 C + 49\ 414$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,线性范围为 $0.1\sim 1.0\text{ mg/ml}$ 。

精密称取纯化前、后的 CHS 产品各 10 mg ,加入 2 ml 色谱纯甲醇,超声振荡溶解,离心,取上清液 $20\text{ }\mu\text{l}$ 进样,按上述色谱条件进行测定,记录峰面积。代入标准曲线,计算产品中游离胆甾醇含量。结果见表 1。

表 1 CHS 纯化前、后产品中游离胆甾醇含量(mg/10 mg)

序号	纯化前	纯化后
1	1.39	0.56
2	1.37	0.52
3	1.34	0.55
平均值	1.37	0.54

从表 1 中可以看出,纯化后产品中游离胆甾醇含量明显降低,表明产品纯度提高,符合下一步合成 CHSB 的需要。

2.3.4 CHS 纯化前、后改性白及多糖的胆甾醇基取代度对比 分别用纯化前、后的 CHS 合成 CHSB,并改变白及多糖与 CHS 的投料比,制备不同取代度的 CHSB,标记为 CHSB₁、CHSB₂、CHSB₃。采用 $^1\text{H-NMR}$ 法测定其取代度,结果见表 2 及图 9~图 11。

表 2 CHS 纯化前、后 CHSB 样品的胆甾醇基取代度对比(%)

	纯化前	纯化后
1	4.26	5.08
2	5.09	6.55
3	7.30	8.91

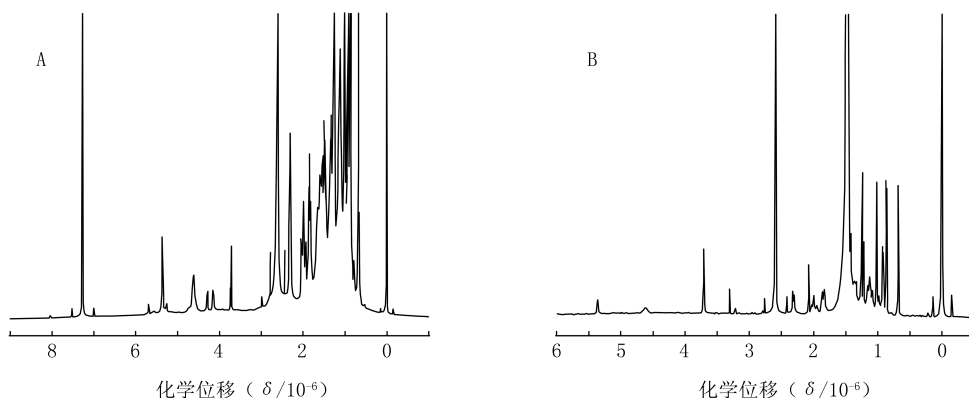


图 9 CHS 纯化前(A)、纯化后(B)同一投料比(10 : 4, mol/mol)合成的 CHSB₁ 核磁共振图谱

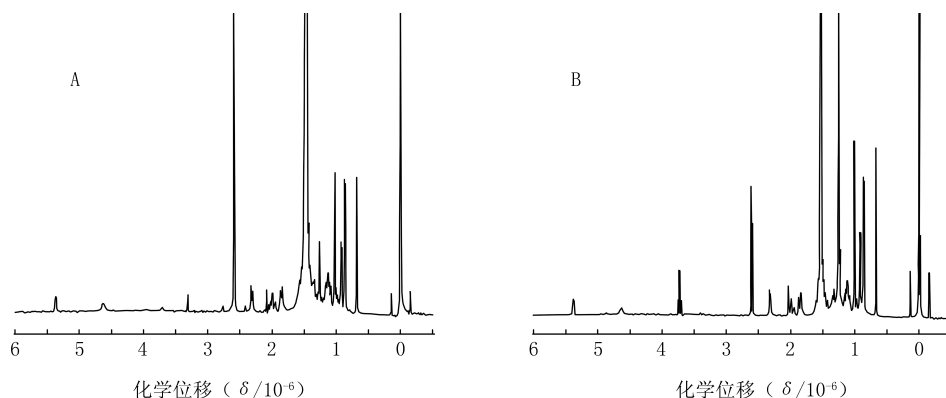


图 10 CHS 纯化前(A)、纯化后(B)同一投料比(10 : 6, mol/mol)合成的 CHSB₂核磁共振图谱

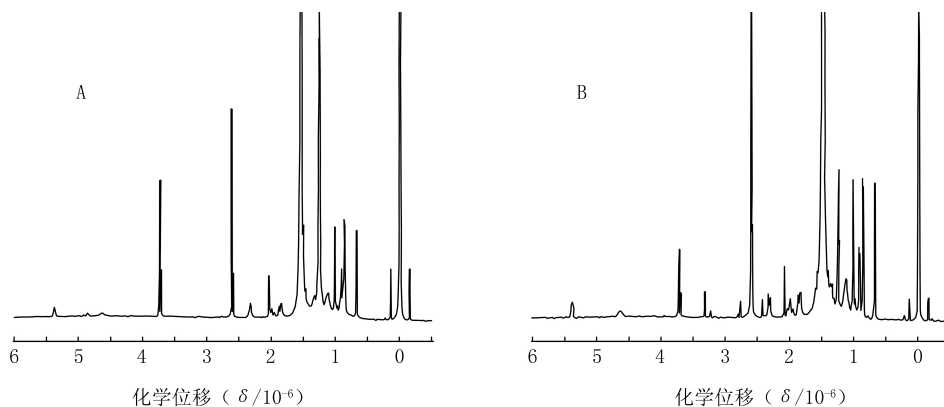


图 11 CHS 纯化前(A)、纯化后(B)同一投料比(10 : 8, mol/mol)合成的 CHSB₃核磁共振图谱

3 讨论

3.1 重结晶 CHS, 可提高样品胆甾醇基取代度, 是因为增大了反应物的浓度。在一定温度下, 对于某一反应, 反应物中活化分子的百分数是一定的。增加反应物浓度时, 单位体积内活化分子总数增多, 因此能使单位时间内反应物分子发生有效碰撞机会增多, 从而使反应速率加快。这就是著名的质量作用定律所表述的: 化学反应速率与反应物的物质的量浓度成正比^[9]。

3.2 反应物间的相互接触、碰撞是发生反应的先决条件^[9], 重结晶后的 CHS 与粗品相比, 纯度提高, 与白及多糖分子的接触机会增多, 使反应更加充分, 样品取代度有所提高。

3.3 胆甾醇基取代度的大小直接影响改性白及多糖的载药和进一步应用, 所以对其取代度的研究具有重要意义。本试验采取的原料纯化方法既简便可行, 又能提高样品的取代度, 为今后的试验奠定了良好的基础。

【参考文献】

[1] 孙达锋, 史劲松, 张卫明, 等. 白及多糖胶研究进展[J]. 食品科

学, 2009, 30(3): 296-298.
[2] Zhang MS, Sun L, Zhao WC, et al. Cholesteryl-modification of a glucomannan from *Bletilla striata* and its hydrogel properties [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9089-9100.
[3] 刘晨光, 董学猛, 金晓明, 等. 基于疏水化修饰水溶性多糖的纳米粒制备及应用研究进展[J]. *功能材料*, 2007, 38(A05): 1941-1946.
[4] 毕亚静, 王艳萍, 刘福强, 等. 胆甾醇琥珀酰基白及多糖的制备及其理化性质研究[J]. *药实践杂志*, 2013, 31(3): 220-223.
[5] 杨文智. 疏水改性普鲁兰多糖及其自组装载药纳米粒的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
[6] 李磊. 胆甾醇基-羧甲基可德兰衍生物自聚集纳米粒子的制备以及作为抗肿瘤药物载体的研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010.
[7] Na K, Park KH, Kim SW, et al. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdolan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2)[J]. *J Control Release*, 2000, 69: 225-236.
[8] 李霞, 刘晨光, 贺爱华. L-丙交酯的纯化研究[J]. *青岛科技大学学报(自然科学版)*, 2011, 32(5): 510-513.
[9] 许锦善. 无机化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 30-34.

【收稿日期】 2014-12-29 【修回日期】 2015-01-20

【本文编辑】 顾文华