

胆甾醇琥珀酰基白芨多糖的制备及其理化性质研究

毕亚静^{1,2}, 王艳萍², 刘福强², 赵楠², 刘丹², 韩丹¹, 刘天娇¹ (1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000; 2. 解放军208医院, 吉林 长春 130062)

[摘要] 目的 对白芨多糖疏水改性,并测其分子量和研究其理化性质。方法 以白芨多糖为原料,合成胆甾醇琥珀酰基-白芨多糖;用红外光谱对结构进行表征;用高效凝胶渗透色谱法测分子量。结果 合成了胆甾醇琥珀酰基白芨多糖;分子量为650 kDa;其理化性质:pH 6.89;黏度130 mPa·s;等电点5.07;溶解度0.9 g。结论 合成方法可行,得率稳定,为进一步扩大试验提供了研究基础。

[关键词] 白芨多糖;胆甾醇琥珀酰基;合成;理化性质

[中图分类号] R283 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)03-0220-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.03.018

Preparation and physical chemistry properties research of cholesterol succinyl *Bletilla striata* polysaccharide

BI Ya-jing^{1,2}, WANG Yang-ping², LIU Fu-qiang², ZHAO Nan², LIU Dan², HAN Dan¹, LIU Tian-jiao¹ (1. School of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. The 208th Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

[Abstract] **Objective** To determination the molecular weight and studies on its properties after hydrophobic modification of *Bletilla striata* polysaccharide. **Methods** *Bletilla striata* polysaccharide were used as the starting materials, which reacted with cholesterol succinate to afford a derivate of cholesterol succinate polysaccharide, characterize its structure by infrared spectroscopy, determine its molecular weight by Sephadex chromatography (HPGPC). **Results** A cholesterol succinate polysaccharide was synthesized; molecular weight 650 kDa, pH 6.89, viscosity 130 mpa, isoelectric point 5.07, solubility 0.9 g. **Conclusion** The method of synthesis was feasible and stable, which provided valuable research base for expand test.

[Key words] *Bletilla striata* polysaccharide; cholesterol succinate; synthesis; physical and chemical properties

白芨 (*Bletilla striata* L.) 为兰科植物白芨的干燥块茎,具有收敛止血,清热利湿,消肿生肌之功效^[1]。白芨多糖为白芨中提取的天然多糖,结构为葡萄甘露聚糖^[2]。

白芨多糖是一种天然的水凝胶,还是一种天然高分子化合物。天然的白芨多糖水溶性强,其骨架易于溶蚀,控释作用较差,并且分子中缺少疏水区域,限制其使用。本实验用白芨多糖进行胆甾醇琥珀酰基修饰,使之增加疏水性,形成既有亲水性和一定亲脂性分子,为进一步扩大利用奠定基础。

1 仪器和材料

1.1 仪器 UV-3 系列紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); PHS-3C 酸度计(上海虹益仪器有限公司); NDJ-1 旋转式黏度计(上海精密科学仪

器有限公司); 6700FT-IR Spectrometer (PT. Contitus CO. LTD. Nicolet 公司); LC-10ATvp 高效液相色谱仪(包括 LC-10AtvP 泵和 SPD-10AVD 紫外可见光检测器, Shimadzu 公司)。

1.2 试剂 白芨多糖(实验室自制); 葡聚糖标准品(Sigma 公司); 琥珀酸酐(国药集团化学试剂公司); 胆甾醇(北京鼎国生物技术公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 合成

2.1.1 合成步骤 胆甾醇琥珀酸酯的合成^[3]: 取胆甾醇和琥珀酸酐各 10 g, 溶解于 150 ml 除水吡啶中, 室温反应 72 h, 反应液滴入冰盐酸溶液[盐酸-冰-水(12:50:40)]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, 80℃下干燥, 得白色针状胆甾醇琥珀酸酯(CHS)纯品。具体反应见图 1。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173559)。

[作者简介] 毕亚静(1986-), 女, 硕士研究生. Tel: 15844025375, E-mail: biyajing709929123@163.com.

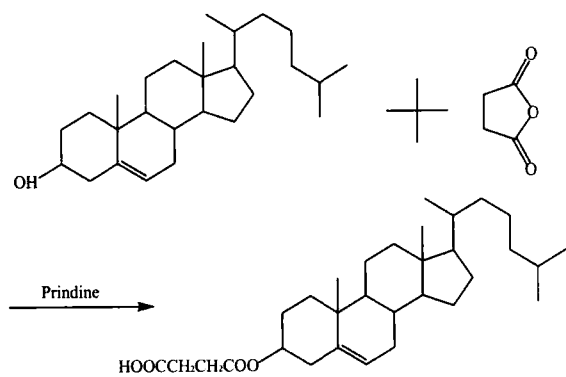


图1 胆固醇琥珀酸单酯(CHS)的合成

胆固醇琥珀酰基-白芨多糖的合成:取白芨多糖样品 0.2 g 溶解于 40 ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,备用。取胆固醇琥珀酸酯(CHS)0.6 g、一定量 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC), EDC/CHS = 1.2 mmol、三乙胺(Et₃N), Et₃N/CHS = 1 mmol,溶解于 30 ml 的 DMF 中,室温搅拌,反应活化 2 h;将活化反应液滴入白芨多糖溶液中,反应 48 h。将反应液加入 200 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沉淀,80 °C 下干燥,即得。反应式见图 2。

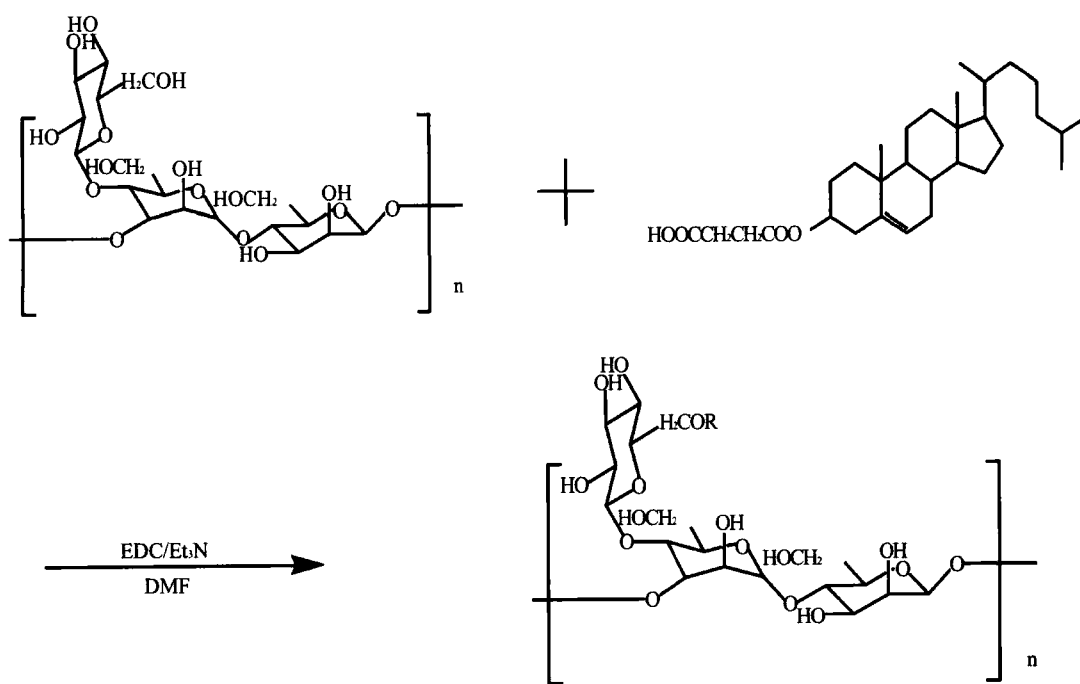


图2 胆固醇琥珀酰基白芨多糖(CHSB)的合成,R = CHS

2.1.2 合成工艺条件考察 经预实验得知,催化剂用量(m_{EDC}/m_{Et_3N} A)、活化时间(B)及反应时间(C)是合成胆固醇琥珀酰基白芨多糖的主要影响因素,以胆固醇琥珀酰基白芨多糖产率为考察指标,设计三因素、三水平正交实验,方案见表 1,试验安排见表 2。

表 1 因素水平

水平	A 因素	B 因素(h)	C 因素(h)
1	0.285/0.125	1.5	48
2	0.428/0.188	2.0	60
3	0.570/0.250	2.5	72

由表 2、3 可见,以产率为指标,影响产率的因素依次为 A > C > B,方差分析结果与直观分析结果一致,最佳合成工艺为 A₃B₂C₁,即催化剂用量(m_{EDC}/m_{Et_3N})0.57/0.25,活化时间 2 h,反应时间 48 h。

表 2 L₉(3³)正交试验结果

试验号	A	B	C	产率(%)
1	1	1	1	21.2
2	1	2	2	21.5
3	1	3	3	23.2
4	2	1	2	12.8
5	2	2	3	14.3
6	2	3	1	19.6
7	3	1	3	22.9
8	3	2	1	41.2
9	3	3	2	30.1
K ₁	65.9	56.9	82	
K ₂	46.7	77.0	64.4	
K ₃	94.2	72.9	60.4	
k ₁	22.0	19.0	27.3	
k ₂	15.6	25.7	21.5	
k ₃	31.4	24.3	20.1	
R	15.8	6.7	7.2	

表3 正交试验方差分析

因素	SS	自由度	MS	F	P
A	380.65	2	190.33	22.02	<0.05
B	75.21	2	37.61	4.36	>0.05
C	88.04	2	44.02	5.10	>0.05
D(误差)	34.58	2	17.29	1	
总计	578.48	8			

注: $F_{(2,2)} = 19.00, F_{0.01(2,2)} = 99.00, F_{0.1(2,2)} = 9.00, P < 0.05$ 。

根据正交试验选择的最佳工艺进行验证, 结果表明该工艺稳定可行, 结果见表4。

表4 最佳工艺验证实验结果

试验号	产率(%)
1	41.0
2	41.3
3	41.2

2.1.3 红外光谱分析 精密称取白芨多糖和制备的胆甾醇琥珀酰基白芨多糖各2 mg, 以KBr压片, 在4000~400/cm的范围内进行红外光谱扫描, 记录红外光谱图。结果见图3。

从IR谱图中可以看出, 白芨多糖在3500/cm⁻¹, 衍生物样品在约3450/cm⁻¹处有强的羟基O-H伸缩振动吸收峰, 在约2800/cm⁻¹处显示甲基或次甲基的C-H伸缩振动吸收峰。衍生物样品在1743/cm⁻¹有吸收说明有酰基修饰。810/cm⁻¹和870/cm⁻¹是甘露糖残基的特征吸收, 样品与白芨多糖红外数据相比较, 发现在1743/cm⁻¹和1180/cm⁻¹处的吸收峰显著增强, 此两处是琥珀酰基的C=O和C-O-C的特征吸收峰, 说明多糖的部分羟基被胆甾醇琥珀酰单脂酸所酯化, 由此可以推断白芨多糖的部分OH和胆甾醇琥珀酰基已连接在一起, 为目标产物。

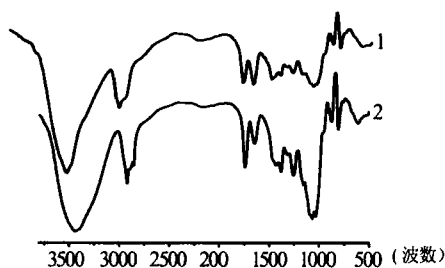


图3 白芨多糖(1)和胆甾醇琥珀酰基白芨多糖(2)红外光谱对比图

2.2 分子量测定 采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)对白芨多糖和修饰后的白芨多糖进行分子量测定。色谱条件为: TSK-gel G-4000PWXL 不锈钢色谱柱(7.8 mm × 300 mm), 流动相为0.2 M NaCl水溶液, 标准品、白芨多糖样品和胆甾醇琥珀酰基白芨多糖样品浓度均为2 mg/ml, 进样量为20

μl, 流速为0.5 ml/min, 柱温为40℃。

先将葡聚糖系列标准品按分子量由小到大依次进样, 然后将白芨多糖样品和胆甾醇琥珀酰基白芨多糖样品分别进样, 测定保留时间。根据Shimadzu HPLC system 数据处理系统得出白芨多糖和胆甾醇琥珀酰基白芨多糖的分子量。结果见图4。

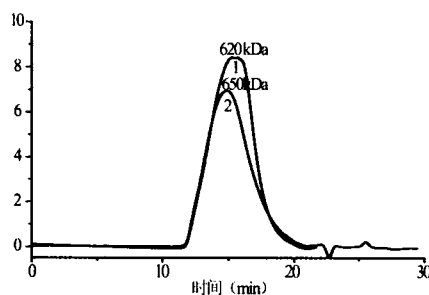


图4 白芨多糖(1)和胆甾醇琥珀酰基白芨多糖(2)HPGPC分子量分布曲线

在TSK-Gel G4000PWxl色谱柱有效分离范围之内, 白芨多糖分子量为620 kDa, 胆甾醇琥珀酰基白芨多糖样品的分子量为650 kDa。

2.3 理化性质研究

2.3.1 外观 白色粉末。

2.3.2 等电点的测定^[4] 精密称取干燥至恒重的胆甾醇琥珀酰基-白芨多糖0.02 g, 共6份, 分别溶于5 ml蒸馏水中, 磁力搅拌下用0.1 mol/L盐酸溶液调节pH < 2, 再用0.1 mol/L氢氧化钠标准溶液回滴至不同的pH值(4.10、5.07、5.71、7.00、7.85、9.09), 离心分离沉淀后, 上清液在630 nm波长处测定透光率(T), 根据上清液的T-pH曲线确定其等电点。见图5。产品的等电点为5.07。

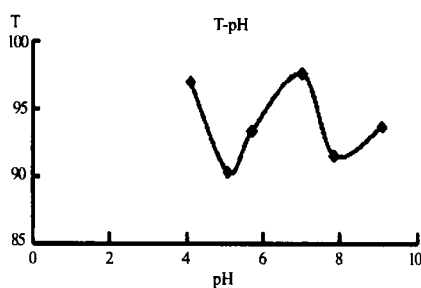


图5 T-pH曲线

2.3.3 溶解度的测定^[5] 室温下精取100 ml蒸馏水注入锥形瓶中, 将精密称取一定量的胆甾醇琥珀酰基-白芨多糖, 逐渐加入锥形瓶中至溶液变成水凝胶状态, 此时所加入的量即为产物的溶解度, 测得溶解度为0.9 g。

2.3.4 黏度的测定^[6] 将胆甾醇琥珀酰基-白芨多糖配成1%的水溶液, 20℃下用NDJ-1旋转式黏度

计测定溶液的黏度为 130 mPa · s。

2.3.5 pH 值的测定^[6] 将胆甾醇琥珀酰基-白芨多糖配成 1% 的水溶液, 20 °C 下用 pH 计测定溶液的 pH 值为 6.89。

3 讨论

合成胆甾醇琥珀酰基-白芨多糖, 其催化剂用量、活化时间和反应时间十分重要, 根据实验, 它们分别为 $m_{EDC}/m_{E_3N} = 0.57/0.25$ 、2 h 和 48 h, 结果得率最高。

白芨多糖进行了疏水改性, 形成了两亲性分子, 可以扩大其应用范围。因为白芨多糖可通过分子内及分子间的疏水作用力, 聚集形成各种超分子自组装体, 如胶束、单层膜结构、微管及纳米囊(粒)等^[7]。本试验将以紫杉醇为模型药物, 通过超滤法制备白芨胶纳米粒, 增加其溶解度, 延缓其释放, 并拓展其在药物递送领域的应用。

【参考文献】

- [1] 刘逢芹, 夏丽娅. 中药白芨的现代研究概况[J]. 山东医药工业, 2000, 19(5): 32.
- [2] Wang QP, Zhang DH. The characters of *Blelita striata Reichb. f.* and its potential potential developing vaines [J]. Resercre Development&Market, 2000, 16(4): 216.
- [3] 江倩, 王银松. 新型两亲性小分子-N-胆甾醇基琥珀酰基氨基葡萄糖的合成及其自组装行为的初步研究[J]. 国际生物医学工程, 2009, 32(3): 142.
- [4] 韩笑, 谭天伟. 羧甲基壳聚糖制备新工艺研究[N]. 北京化工大学学报. 2000, 27(3): 1.
- [5] Rong HC. Conformational changes of chitosan molecules and the shift of break point of Mark Houwink equation by increasing urea concentration[J]. Appl Polym Sci, 2000, 75(4): 452.
- [6] 中国药典 2010 年版二部[S]. 2010: 附录 42.
- [7] Skiyoshi K, Sunamoto J. Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides[J]. Supramol Sci, 1996, 3(4): 157.

[收稿日期] 2012-12-26

[修回日期] 2013-05-01

(上接第 216 页)

表 4 两组患者不良反应比较 (n = 40)

组别	呼吸暂停	体动呛咳	舌后坠	恶心	呕吐	苏醒期躁动	术后腹痛
P 组	8	13	9	1	0	2	7
M 组	0 ¹⁾	1 ¹⁾	1 ¹⁾	0	0	0	0 ¹⁾

注: ¹⁾ $P < 0.05$, 与 P 组比较。

疗的微创方法, 而丙泊酚麻醉具有体动、呛咳发生率高的缺点, 影响了手术治疗的进程、增加术中出血量, 甚至可导致消化道穿孔发生等并发症; 而加大剂量或快速推注对呼吸循环的抑制较大, 联合使用阿片类镇痛药常会导致呼吸抑制等不良反应。本研究中虽然已经减慢丙泊酚注射速率, 但仍表现了 P 组部分患者诱导时发生的呼吸暂停与 SPO_2 的一过性降低, 虽经面罩辅助给氧后立即恢复正常, 而 ESD 在治疗时间上存在不确定性, 增加了麻醉管理难度, 虽然本组未发生麻醉及治疗相关并发症, 但仍增加了麻醉管理风险。

右美托咪定是一种高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂, 研究表明: 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的右美托咪定可引起患者血压明显升高且心率明显下降; 推荐剂量为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 而且 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 右美托咪定具有镇痛作用和稳定血流动力学效应, 可显著抑制伤害性刺激诱发的应激性反应^[4], 可以减少镇痛药物的用量并增强镇痛效果。右美托咪定起效时间 6 min; 其终末半衰期为 2 h^[5]。本组所有患者右美托咪定给药时间设定为 15 min、而所有手术时间均未超过 2 h, 故保证了整个手术期间的药效。结果显示, 与 P 组比较, M 组术中丙泊酚诱导剂量及总剂量、芬太尼剂

量均明显减少; 呼吸抑制、舌后坠、体动呛咳及术后腹痛不良反应发生率显著降低, 显示出小剂量右美托咪定复合丙泊酚的应用使术中麻醉质量与术后恢复质量均得到了改善。

综上所述, 小剂量右美托咪定复合丙泊酚在 ESD 中的应用可改善麻醉质量, 是安全有效的。是值得推广应用一种麻醉方法。

【参考文献】

- [1] Rosch T, Sarbia M, Schumacher B, et al. Attempted endoscopic enbloc resection of mucosal and Submucosal tumors using insulated-tip knives: a pilot series[J]. Endoscopy, 2004, 36: 788.
- [2] Gotoda T, Friedland S, Hamanaka H, et al. A learning curve for advanced endoscopic resection[J]. Gastrointest Endosc, 2005, 62: 866.
- [3] 于舒洋. 氟比洛芬用于无痛人流术疗效及安全性的临床研究[J]. 实用药物与临床, 2011, 14(2): 92.
- [4] 胡宪文, 张野, 孔令锁, 等. 不同剂量右美托咪定抑制气管插管诱发患者心血管反应效应的比较[J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 30(11): 1034.
- [5] Chrysostomou C, Schmit CG. Dexmedetomidine: sedation, analgesia and beyond[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008, 4(5): 619.

[收稿日期] 2012-10-17

[修回日期] 2013-04-08