

抗凝血硫酸化微晶纤维素的制备

王兆梅 李琳 胡松青 李冰 郭祀远

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要:以微晶纤维素(MC)为原料,采用氯磺酸-DMF 硫酸化方法制备了具有抗凝血活性的硫酸微晶纤维素钠盐 Na-MCS,并研究了以提高产物抗凝血活性为目标的工艺,即在常温条件下向原料 MC 中加入适量的浸润试剂 DMF,并在真空下搅拌浸润;在盐水冰浴中制备氯磺酸-DMF 酯化试剂;将适量酯化试剂加入已浸润的 MC 中搅拌反应;调节反应产物的 pH 值,在去离子水中透析,减压浓缩后真空干燥。

关键词:微晶纤维素;硫酸化;抗凝血活性

中图分类号:TQ323.3

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2003)02-0030-04

Preparation of microcrystalline cellulose sulfate with anticoagulant activity

WANG Zhao-mei, LI Lin, HU Song-qing, LI Bing, GUO Si-yuan

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Sodium cellulose sulfate (Na-MCS) with anticoagulant activity was prepared from microcrystalline cellulose (MC) by the ClSO_3H -DMF sulfation method. The technological conditions for increasing anticoagulant activity of Na-MCS were as follows: add the soaking agent DMF with a suitable amount into the material MC; continuously stir under the vacuum condition; prepare the sulfation agent ClSO_3H -DMF in salt-ice bath; then add ClSO_3H -DMF with the suitable amount into soaked MC to react; control pH value of the product and then was dialyzed in de-ion water for 12 h; lastly concentrate the product in the vacuum drier.

Key words: microcrystalline cellulose; sulfation; anticoagulant activity

有关纤维素硫酸化的研究始于 20 世纪 60 年代,早期的纤维素硫酸化产物均存在取代度低且不溶于水的问题,主要利用其黏度效应在涂料中用作添加剂或用来制作微胶囊^[1]。一些具有生物活性的硫酸化纤维素的开发,使得硫酸化纤维素在医药方面的应用研究日趋活跃^[2-3]。硫酸化纤维素的应用受其理化性质的影响,而从制备工艺上看,这些性质主要受到纤维素原料的种类和制备条件的影响。目前用于制备硫酸化纤维素的原料种类有天然纤维素、三甲基硅烷纤维素、醋酸纤维素和硝酸纤维素等^[4-5]。根据对抗凝血药物肝素钠和其他类肝素药物的研究,抗凝血活性药物的相对分子质量最好在 1 万左右。在制备过程中纤维素分子链有降解的现象,而且以微晶纤维素为原料制备改性微晶纤维

素衍生物的研究和应用报道较少,因此笔者选择微晶纤维素为原料,以提高产物抗凝血活性为目标,首先研究具有药理特性的硫酸化微晶纤维素的制备工艺。

1 实验部分

1.1 主要实验材料与仪器

微晶纤维素(MC),聚合度 150,相对分子质量 3 万;氯磺酸,CP 级;N,N-二甲基甲酰胺(DMF),AR 级;人含钙凝血酶、兔脑凝血活酶和白陶土部分凝血活酶,法国进口试剂;正常人血浆;枸橼酸钠、醋酸钠、乙醇、氯化钙,AR 级,国产试剂。

CA-1500 型全自动血凝仪,滴液漏斗,真空干燥箱,增力搅拌器等。

收稿日期:2002-11-19

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(000453)

作者简介:王兆梅(1974-),女,博士生;李琳(1962-),男,博士,教授,博导,主要从事糖类药物的制备与生物利用的研究,通讯联系人,020-87112894, felinli@scut.edu.cn。

1.2 实验方法

1.2.1 Na-MCS 的制备

制备微晶纤维素的硫酸化产物 Na-MCS 的工艺过程分为 4 个阶段:MC 的浸润、酯化试剂的制备、硫酸化反应和产物后处理,其工艺流程见图 1。笔者以该工艺过程为基础,采用单因素试验法,考察浸润过程中 DMF 的用量、浸润外加条件、酯化试剂制备温度、硫酸化反应中酯化试剂的用量、反应时间、搅拌强度以及产物后处理时溶液 pH 值、透析时间对 Na-MCS 的抗凝血活性的影响。

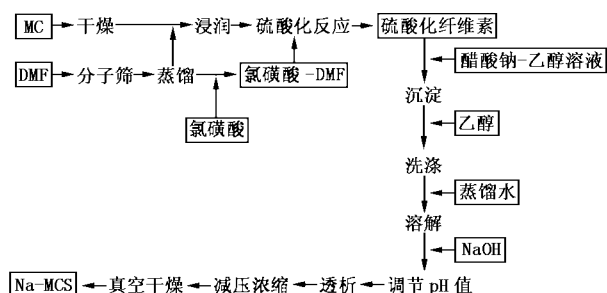


图 1 制备 Na-MCS 工艺流程图

1.2.2 Na-MCS 的抗凝血活性分析

(1) 血浆的制备:取健康的人类血液置于预先放有质量分数 8% 枸橼酸钠溶液的容器中,枸橼酸钠溶液与血液体积比为 1:19,边收集边轻轻振摇,收集完毕,迅速在 2 500 r/min 下离心 10 min,将血浆分成若干份注入容器内, - 20℃ 下冻结贮存,临用时置于 37℃ 恒温水浴中融化后用快速滤纸过滤,放入冰箱中备用。

(2) 活化部分凝血活酶时间(用 t_{APT} 表示)的测试:取质量分数为 0.001% 的 Na-MCS 50 μL 于塑料试管中,再向管中加入 0.5 mL 血浆,混匀后放入 CA-1500 型全自动血凝仪,仪器自动吸取血浆混合液 0.1 mL 和白陶土部分凝血活酶试剂 0.1 mL,37℃ 下孵育 3 min,再加入已孵育好的 0.025 mol/L 的氯化钙 0.1 mL,混合后自动记录血浆凝固时间。

(3) 凝血酶时间(t_{T})的测试:按照“APTT 测试方法”取样,仪器自动吸取 0.2 mL 血浆混合液,37℃ 下孵育 2 min,再加入已孵育好的人类含钙凝血酶试剂 0.2 mL,混合后自动记录血浆凝固时间。

(4) 凝血酶原时间(t_{P})的测试:按照“APTT 测试方法”取样,上机后自动吸取 0.1 mL 血浆混合液,37℃ 下孵育 2 min,再加入已孵育好的含钙兔脑凝血酶试剂 0.2 mL,混合后自动记录血浆凝固时间。

t_{APT} 、 t_{T} 和 t_{P} 是 3 个各自独立的基础性凝血途

径筛查指标。经测试,笔者所用血浆的 t_{APT} 为 26.3 s, t_{T} 为 10.6 s, t_{P} 为 11.5 s,各凝血指标均在正常值范围内。在血浆中加入其他物质,如果血浆 t_{APT} 值比正常值大于 7 s, t_{P} 、 t_{T} 值比正常值大于 3 s,则认为添加物能延长凝血时间,具有抗凝血作用,而且 t_{APT} 、 t_{T} 和 t_{P} 值越大,添加物抗凝血活性越强。

2 结果与讨论

2.1 MC 的浸润

对 MC 的浸润处理是为了克服多相反应的非均匀性和提高 MC 的反应性能。研究中发现,若不对 MC 作浸润处理,即使反应时间达到 4 h,仍有绝大部分原料未反应,可见浸润是 MC 硫酸化的首要预处理步骤。

2.1.1 DMF 用量的影响

图 2 为浸润过程 DMF 体积与 MC 质量之比 $V_{\text{DMF}}/m_{\text{MC}}$ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 下略)对 Na-MCS 抗凝血活性的影响情况。随着 $V_{\text{DMF}}/m_{\text{MC}}$ 的增大,3 个凝血指标均下降,尤其当 $V_{\text{DMF}}/m_{\text{MC}} > 10$ 时, t_{APT} 和 t_{T} 均急剧下降,其中,APTT 的变化最为明显,这可能是由于浸润试剂的用量过大降低了硫酸化反应过程 MC 的反应浓度,不利于反应进行。考虑到 $V_{\text{DMF}}/m_{\text{MC}}$ 小于 5 时会使 MC 浸润不均匀,选择 $V_{\text{DMF}}/m_{\text{MC}} = 5$ 作为 DMF 的浸润用量。

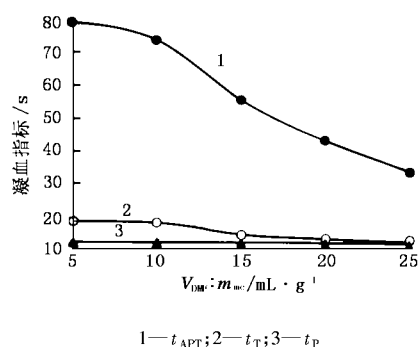


图 2 浸润过程 $V_{\text{DMF}}/m_{\text{MC}}$ 对 Na-MCS 抗凝血活性的影响

2.1.2 浸润外加条件的影响

浸润过程中外加条件对 Na-MCS 抗凝血活性的影响如表 1 所示。与对照组相比,外加真空(搅拌或真空加搅拌)后,产物对血浆凝血指标 t_{APT} 和 t_{T} 均显著延长,尤其是搅拌与真空联合用于 MC 浸润过程中时,对产物凝血活性的提高最为明显。这是因为浸润时外加真空有利于溶剂在 MC 中的渗透,搅拌不仅提供必要的能量,而且还促进溶剂向 MC 晶

格的渗透。

表 1 MC 浸润中外加条件对 Na-MCS 抗凝血活性的影响

外加条件	搅拌	真空	搅拌 + 真空	对照
t_{APT}/s	87.8	93.3	114.8	74.2
t_{T}/s	20.8	24.2	29.4	17.9
t_{P}/s	12.3	12.5	13.1	12.2

2.2 酯化试剂的制备

酯化试剂是影响 MC 硫酸化产物 Na-MCS 抗凝血活性的另一个重要的原料因素,酯化试剂的种类、浓度和酸度等均影响产物的活性。笔者主要探讨了酯化试剂制备温度对产物活性的影响,结果如图 3 所示。0℃时 3 个凝血指标均最大,随着酯化试剂形成温度的升高, t_{APT} 和 t_{T} 快速下降;当温度达到 30℃时, t_{APT} 、 t_{T} 和 t_{P} 与正常血浆相比,无明显延长,说明此时产物已无明显的抗凝血活性。由此可见,酯化试剂形成的温度对产物的抗凝血活性影响十分明显,而且在实验过程发现,当反应温度在 10℃以下时,随着反应进行,烧瓶内出现大量白色晶体,而当温度超过 10℃时,则无白色晶体,反应液呈淡黄色。这是由于酯化试剂的制备过程是一个强放热过程,实验温度较高的情况下反应迅速,引起反应溶液内部温度急剧上升,导致氯磺酸分解。因此为保证产物的活性,应尽可能在低温下制备酯化试剂,在实验中通过盐水冰浴和控制氯磺酸的滴加速度来控制反应温度和反应速度。

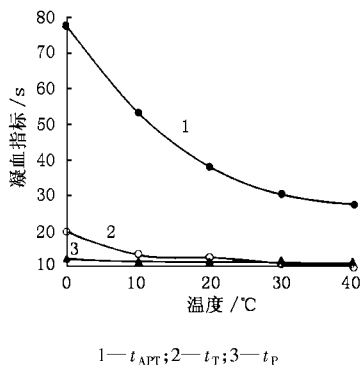


图 3 酯化试剂制备温度对 Na-MCS 抗凝血活性的影响

2.3 硫酸化反应

2.3.1 酯化试剂用量的影响

在理论上,MC 分子链上每个脱水葡萄糖单元 (AGU) 有 3 个可参与反应的羟基,图 4 为酯化试剂用量对 Na-MCS 抗凝血活性的影响。可看出当酯化试剂用量不足时,3 个凝血指标都较小,抗凝血活性

低;当酯化试剂用量适当过量时,凝血指标均达到各实验组中的最大值;而酯化试剂用量超过一定量时,凝血指标均有所下降。酯化试剂的用量从两方面影响 MC 的硫酸化过程,从而影响产物的抗凝血活性,一方面,当酯化试剂用量不足或适量时,可影响产物硫酸取代度的大小;另一方面,过量的酯化试剂会造成产物酸降解,使得分子质量降低,而取代度和分子质量都是影响产物 Na-MCS 抗凝血活性的重要结构因素。

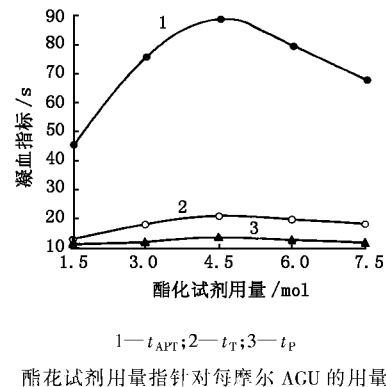


图 4 酯化试剂用量对产物 Na-MCS 抗凝血活性的影响

2.3.2 硫酸化反应温度的影响

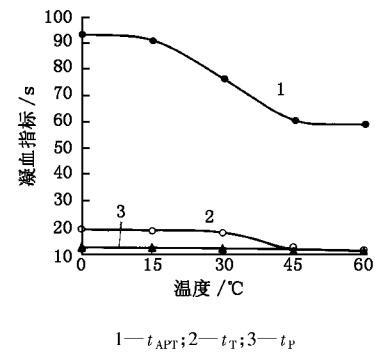


图 5 硫酸化温度对 Na-MCS 抗凝血活性的影响

硫酸化反应的环境温度对 Na-MCS 抗凝血活性的影响如图 5 所示。在较低温度下, t_{APT} 和 t_{T} 均较大,而当温度超过 30℃以后, t_{T} 无明显延长, t_{APT} 大幅下降,在实验温度范围内(0~60℃),温度越低,制得的 Na-MCS 抗凝血活性越强。MC 的硫酸化反应是一个放热过程,反应中温度过高时反应速度过快,引起反应液温度升高,导致反应物分解。考虑到硫酸化反应时间较长,温度过低不易控制,因此笔者在其他实验中采用的反应温度为 30℃。

2.3.3 搅拌速率的影响

硫酸化搅拌速率对 Na-MCS 抗凝血活性的影响如图 6 所示。与对照组(搅拌速率为零)相比,在反应过程中施加搅拌可明显提高产物的抗凝血活性,而且随着搅拌速度的增加,3 个凝血指标一致增大,尤其是当搅拌速率达到 900 r/min 时,产物可使凝血指标(尤其是 t_P)均显著延长。这是因为反应中外加机械搅拌可使反应物充分混和,提高了反应速率,获得较多有效产物。

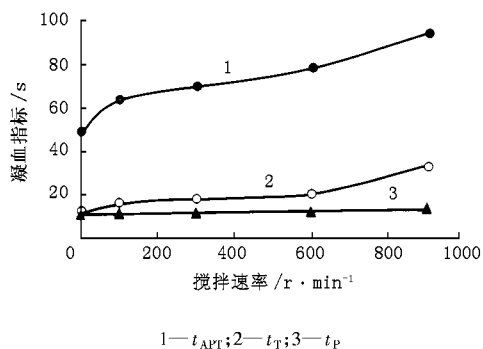


图 6 硫酸化搅拌速率对 Na-MCS 抗凝血活性的影响

2.4 产物后处理

2.4.1 反应产物 pH 值的影响

在酸性条件下时,反应产物主要以酸性硫酸化纤维素(H-MCS)的形式存在,在中性或碱性条件时,反应产物则主要以硫酸纤维素盐(如 Na-MCS)的形式存在。图 7 所示为 pH 值对产物抗凝血活性的影响,可以发现,Na-MCS 比 H-MCS 的抗凝血活性强,这可能是凝血系统的相关凝血酶受到酸碱条件的影响所致。

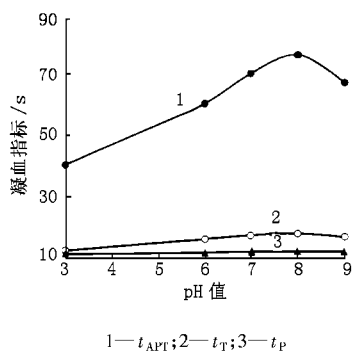


图 7 pH 值对产物抗凝血活性的影响

2.4.2 透析时间的影响

对产物的透析时间可以影响 Na-MCS 抗凝血活性,如图 8 所示。与未透析所获产物(透析时间为零)相比,透析后产物所对应的凝血指标均明显延长,当透析时间为 12 h 时,凝血指标均在实验组中达到最大,透析时间小于或大于 12 h,凝血指标均减小,这主要是因为适当透析可去除无活性的小分子杂质,提高有效成分的纯度,但透析时间过长,使得有活性的成分也渗入到透析介质中,因此产物的透析时间 12 h 较为合适。

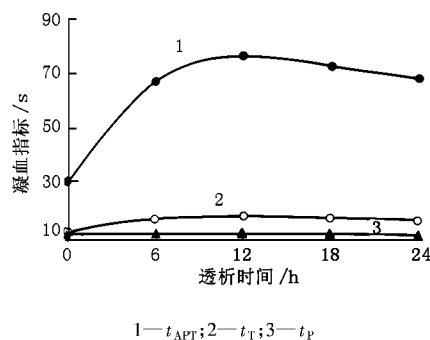


图 8 产物透析时间对 Na-MCS 抗凝血活性的影响

3 结语

以 MC 为原料,制备了具有一定抗凝血活性的硫酸化微晶纤维素钠盐 Na-MCS,在整个反应过程中,MC 表现出较高的反应性能,使反应能在较小的溶剂用量和缓和的条件下完成,是在天然纤维素、三甲基硅烷纤维素、醋酸纤维素和硝酸纤维素之后的又一种可作为制备硫酸纤维素的原料。

(致谢:广东省人民医院检验科曾淑燕主任医师。)

参考文献

- [1] Saak B, Puls J, Wagenknecht W. [J]. Carbohydr Polym, 2002, 48(2): 7-14.
- [2] Herold BC, Siston A, Bremer J, et al. [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1997, 41(3): 2776-2781.
- [3] Groth F, Wagenknecht W. [J]. Biomaterials, 2001, 22(20): 2719-2729.
- [4] Yamamoto T, Takayama K, Honma K, et al. [J]. Carbohydr Polym, 1991, 4(1): 53-63.
- [5] Wagenknecht W, Nehls I, Stein A, et al. [J]. Acta Polym, 1992, 43(3): 266-269