

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2016.02.011

三肽纤维素酯的制备及应用研究



Li Yang

李杨^{1,2}, 朱进科¹, 李连杰¹, 蒋登高^{1*}

(1. 郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450003)

摘要: 以微晶纤维素为原料, 苄氧羰基-L-脯氨酸(FMOC-L-Pro-OH)、苄氧羰基-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸(FMOC-L-Val-L-Phe-OH)和3,5-二硝基苯甲酸为衍生化试剂, 经酰氯化、酯化、肽链的延长和氨基的修饰等反应, 合成了末端氨基被修饰的三肽纤维素酯(TPC)。通过实验证实三肽若要与纤维素成酯, 必须采用先酯化后肽链延长的方式, 其中关键步骤为酯化反应, 其反应条件为: 纤维素在LiCl/DMAc溶液中的质量浓度为20 g/L, 温度100℃, $n(\text{酰氯}):n(\text{纤维素中羟基总量})$ 为3:1, 反应时间20 h。再通过肽链延长、氨基修饰反应, 最终可得到取代度为2.15的三肽纤维素酯。经过FT-IR、TG、XRD和元素分析等多种分析手段测试可知, 3,5-二硝基苯甲酸对肽链末端进行了成功的修饰, 该反应路径可行。酯化反应的产物根据沉淀析出液不同, 内部氢键产生也不相同, 可得到功能不同的三肽纤维素酯。TPC的应用实验结果表明, 以甲醇为沉淀析出液的纤维素酯, 是良好的肠溶包衣材料, 具有遮光性强崩解迅速的特点, 但其生理毒性有待进一步研究; 以水为沉淀析出液的纤维素酯, 被制成手性涂敷柱后, 综合了刷型固定相与纤维素固定相的两大优势, 拆分能力强大高效, 耐化学性极佳, 适用范围比以往涂敷柱更广泛, 尤其适用于四氢呋喃流动相体系。

关键词: 微晶纤维素; 肽; 衍生物; 酯化; 合成

中图分类号: TQ35

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2016)02-0071-08

引文格式: 李杨, 朱进科, 李连杰, 等. 三肽纤维素酯的制备及应用研究[J]. 林产化学与工业, 2016, 36(2): 71-78.

Preparation and Application of Tripeptide-cellulose Ester

LI Yang^{1,2}, ZHU Jin-ke¹, LI Lian-jie¹, JIANG Deng-gao¹

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: Tripeptide-cellulose ester (TPC) was synthesized by sequent acyl chlorination, esterification, peptide elongation and amino modification using microcrystalline cellulose as raw material and N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-proline (FMOC-L-Pro-OH), N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-valinamide-L-phenylalanine (FMOC-L-Val-L-Phe-OH), 3,5-dinitrobenzoic acid as derivatization reagents. The experimental results showed that during the synthesis process, esterification, a key step, was performed firstly, and followed by the extension of peptide chain. The effects of various experimental factors on esterification and substitution degree (D_s) were investigated. The optimal condition was described as that the mass concentration of avicel in LiCl/DMAc 20 g/L, the molar ratio of $-C(O)Cl$ to the hydroxyl content of cellulose 3:1, reaction temperature 100℃ and reaction time 20 h. By the further peptide elongation and amino modification, the tripeptide-cellulose ester with D_s 2.15 was synthesized. The structure and properties were then characterized by using Fourier transform infrared spectroscopy, elemental analysis, X-ray diffraction and thermogravimetric analysis. The results showed that the modification of peptide by 3,5-dinitrobenzoic acid was successful and the synthesis process was feasible. With the alteration of precipitants, the intramolecular hydrogen bond was different and the obtained derivatives had different characteristics and functionalities. The tripeptide-cellulose ester precipitated in methanol was good enteric-coating material with good shading effect and rapid disintegration, but the physiological toxicity needed further study. The tripeptide-cellulose ester (using water as the precipitant) could be coated onto silica gel to get a chiral stationary phase, which has a wider application than previous coated-cellulose chiral stationary phase. In addition, the stable

收稿日期: 2015-02-15

作者简介: 李杨(1983—), 男, 河南郑州人, 主管药师, 博士生, 主要从事手性和高分子合成研究工作

* 通讯作者: 蒋登高, 教授, 博士生导师, 主要从事手性及生物高分子材料研究

chemical resistance of tripeptide-cellulose ester was particularly suitable for the mobile phase including tetrahydrofuran.

Key words: microcrystalline cellulose; peptide; derivatives; esterification; synthesis

微晶纤维素是一种纯化的、部分解聚的纤维素,广泛应用于制药、化妆品、食品等行业。在制药工业中,微晶纤维素常用作吸附剂、助悬剂、稀释剂、崩解剂等,不仅可用于湿法制粒也可用于干法直接压片,还有一定的润滑和崩解作用,在片剂制备中广泛使用^[1]。近年来,微晶纤维素还常被衍生化后,用来作为手性色谱柱制备时的填料,可拆分近60%的手性化合物^[2]。肽广泛存在于生物体内,是机体完成各种复杂生理活性必不可少的参与者,具有天然的机体亲和性和专一性,种类繁多,来源丰富^[3]。同时,多肽也是手性色谱柱中刷型固定相的主要填料,在手性拆分领域具有重要的作用。以肽链修饰纤维素,可以结合二者的长处,修饰方式很多,视用途不同,合成方式及修饰基团也不同^[4-7],但目前用于制药工业及手性拆分领域的合成路径,却鲜见报道。纤维素衍生物一直是生产片剂包衣的首选材料,其中肠溶包衣材料要求较高,其要求是成膜性好、在小肠液(pH值6.8)中溶散性佳,无毒,有利于小肠的吸收^[8]。如能将无毒的肽链修饰纤维素制成包衣,其透过性、安全性和亲和性必将优于现今的成品;此外,纤维素类手性固定相具有载样量大,拆分种类多等优势,是工业手性制备的首选色谱柱。肽链刷型固定相由于载样量不高,因此很少用于工业制备色谱柱,如果能与纤维素结合,既能满足高载样量又能综合二者的拆分能力,必将给手性拆分领域尤其是工业手性制备带来新的发展。因此,本研究以微晶纤维素为原料,以苄甲氧羰基-L-脯氨酸、苄甲氧羰基-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸、3,5-二硝基苯甲酸为衍生化试剂,通过氨基酸中羧酸的酰氯化、在均相体系——LiCl/DMAc溶液中与纤维素的酯化反应、肽链的延长和氨基的修饰,制备得到三肽纤维素酯(TPC),并考察了反应条件对产物的影响,对其应用性也进行了初步研究,旨在为制备出具有药学实用性和手性拆分潜质的高分子新材料提供理论指导。

1 实验

1.1 原料、试剂与仪器

微晶纤维素, Merck公司; 苄甲氧羰基-L-脯氨酸(FMOC-L-Pro-OH)、3,5-二硝基苯甲酸(DNB)、1-羟基苯并三唑(HOBT)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI)、N,N-二异丙基乙胺(DIEA)、苄甲氧羰基-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸(FMOC-L-Val-L-Phe-OH); 无水N,N-二甲基乙酰胺(DMAc)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、氯化锂(LiCl)、甲醇,均为分析纯。

Thermo Nicolet 370型红外光谱仪,美国赛默飞世尔科技有限公司; TGA Q500型热重分析仪,美国Waters公司; X'Pert PRO型X射线衍射仪,荷兰帕纳科公司; VARIO EL III型元素分析仪,德国ELEMENTAR公司。

1.2 三肽纤维素酯(TPC)的合成

前期实验过程中发现,三肽由于结构庞大,即使酰氯化后与纤维素仍难以反应,产率、取代度过低。因此,本研究先以一个氨基酸酯化纤维素后,再接上二肽,最终合成三肽纤维素酯。具体合成路线如图1所示。

1.2.1 FMOC-L-Pro-OH的酰氯化(1) 将10 g FMOC-L-Pro-OH加入装有搅拌器、温度计、回流冷凝管的500 mL三口烧瓶中,再加200 mL二氯甲烷搅拌均匀后,取50 mL SOCl₂溶于50 mL二氯甲烷中,在冰浴中缓慢加入烧瓶中,0.5 h内滴加完毕,通入氮气保护,升温至40℃,反应20 h。减压蒸去溶剂及过量的SOCl₂,得淡黄色块状固体,即产物(1)——苄甲氧羰基-L-脯氨酰氯(FMOC-L-Pro-Cl),收率91%。

1.2.2 苄甲氧羰基-L-脯氨酸纤维素酯(2)的合成 取纤维素1 g置于无水DMAc溶液中,130℃下溶胀3 h后,缓慢冷却至100℃,然后加入适量无水LiCl,缓慢降至室温,搅拌至纤维素完全溶解为止。然后加入FMOC-L-Pro-Cl(预先溶解于30 mL DMAc中)溶液并以适量吡啶作为缚酸剂,升温至100℃反应20 h。反应结束后,冷却,将反应液倾入大量甲醇(或水)中,析出淡黄色沉淀,沉淀洗涤(甲醇中析出物

洗涤时忌水), 30 ℃ 真空干燥或冷冻干燥过夜后, 得产物 (2) —— 苄氧羰基-L-脯氨酸纤维素酯。

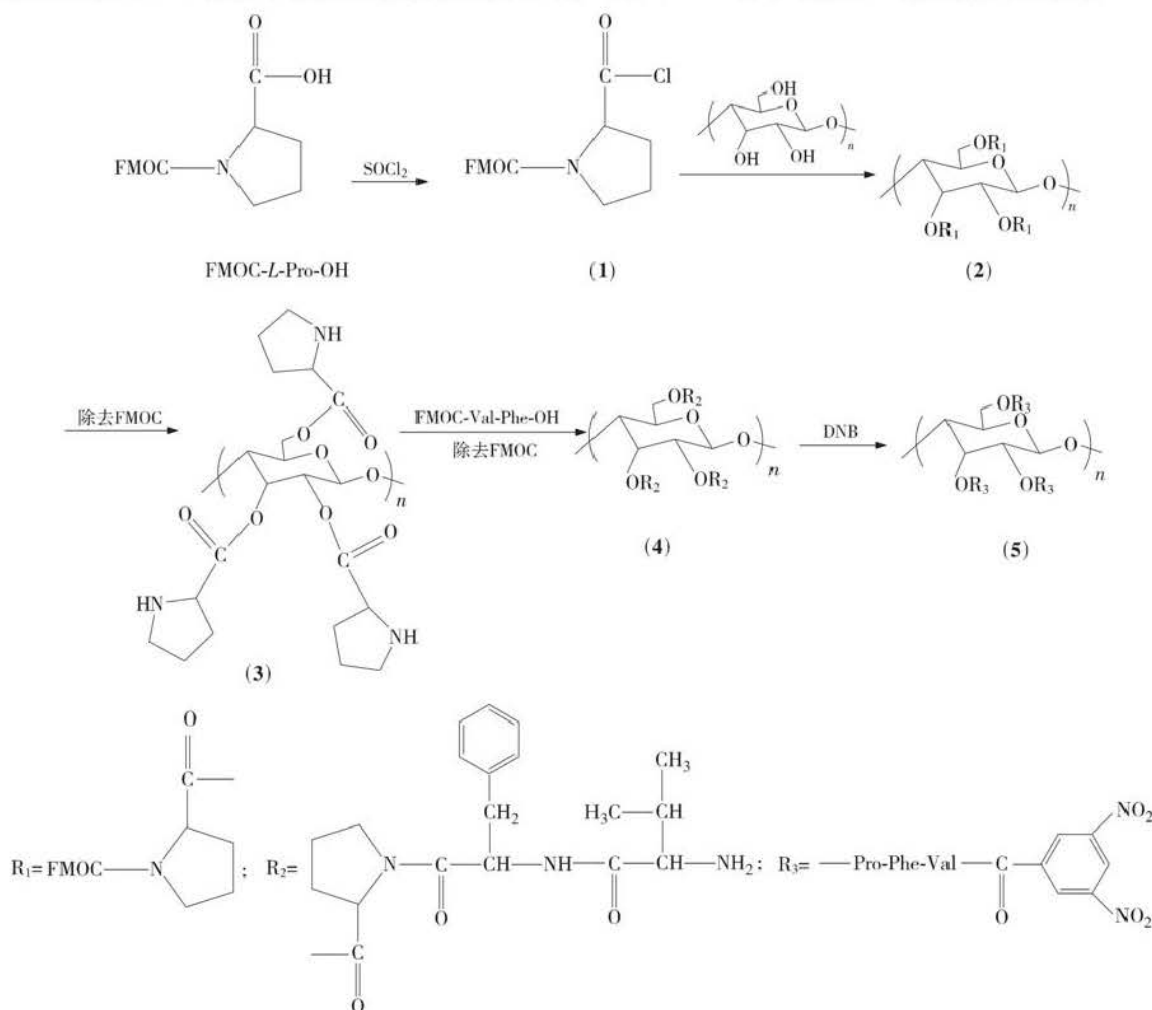


图1 三肽纤维素酯的合成

Fig.1 Synthesis of tripeptide-cellulose

1.2.3 脱 Fmoc 保护基 (3) 取产物 (2) 3 g, 置于 100 mL 50% 乙醇胺的二氯甲烷溶液中, 室温搅拌 3 h, 过滤, 洗涤, 干燥后, 得产物 (3) —— L-脯氨酸纤维素酯。

1.2.4 肽链的延长 (4) 产物 (3) 置于适量的二氯甲烷中, 加入一定量的 EDCI、DIEA 充分搅拌 1 h, 之后置于冰浴中, 加入一定量的 Fmoc-L-Val-L-Phe-OH 和 HOBT, 搅拌 2.5 h, 移去冰浴, 在 30 ℃ 下反应 24 h。洗涤、干燥后, 将产物置于 200 mL 的 50% 乙醇胺的二氯甲烷溶液中, 室温搅拌 3 h, 过滤, 洗涤, 干燥后, 得产物 (4) —— L-缬氨酰-L-苯丙氨酰-L-脯氨酸纤维素酯。

1.2.5 氨基的修饰 (5) 将产物 (4) 置于适量的 DMF 中, 加入一定量的 EDCI、DIEA 充分搅拌 1 h, 之后置于冰浴中, 加入一定量的 DNB 和 HOBT, 搅拌 2.5 h, 移去冰浴, 在 30 ℃ 下反应 24 h。洗涤、干燥后, 得棕色的固体, 即目标产物 TPC (5)。

1.3 结构与性能表征

红外光谱 (FT-IR) 分析采用 KBr 压片法制备样品, 于红外光谱仪上进行测试; 热重分析 (TGA) 采用热重分析仪进行测试, 氮气流速: 40 mL/min, 升温速率: 10 ℃/min, 温度范围: 25 ~ 850 ℃; X 射线衍射 (XRD) 采用铜靶, 镍片消除干扰, 管电压 40 kV, 管电流 40 mA, 扫描范围 5 ~ 60°; 元素分析测定条件为炉温 1150 ℃, 还原管 850 ℃。

取代度(D_s)是指每个葡萄糖单元上被取代的羟基的数目,其计算公式如下^[9]:

$$D_s = (m_{AC} - m_A) / (336n_A)$$

式中: m_A —纤维素原料的质量,g; m_{AC} —产物(2)的质量,g;336—Fmoc-Pro-OH 取代基的相对分子质量; n_A —纤维素原料中含有葡萄糖单元的物质质量。

1.4 三肽纤维素酯的应用实验

1.4.1 光敏实验 选取见光易分解的原料药奥美拉唑为测试药物,以甲醇为沉淀析出液,真空干燥得到的 TPC 为包衣材料,配合其它辅料对其进行肠溶包衣并压片(压片制备由 LR 制药股份有限公司协助完成)。以 LR 公司生产的奥美拉唑肠溶片(包衣材料为邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCP),外包装为不透明铝塑,避光)为对照样同时进行光敏实验。将 TPC 包衣片试验品与去除外包装的 HPMCP 市售对照品各 20 片同时置于光照强度为 5 000 lx 的日光灯下,照射 2 h 后,按照《中国药典》2010 年版二部标准,采用液相色谱法,以 C_8 柱为固定相,0.01 mol/L 的磷酸二氢钠(用磷酸调节 pH 值至 7.6)-乙腈(体积比 75:25)为流动相,检测波长 302 nm,检测奥美拉唑的含量。

1.4.2 释放度实验 为了保证肠溶片只在 pH 值 6.8 的肠液中崩解释放,而不被 pH 值 1.2 的胃液破坏,药品检验中专门设计了释放度实验,在体外以 pH 值 1.2 的盐酸溶液模拟胃液,以 pH 值 6.8 的磷酸盐缓冲液模拟肠液。在河南省食品药品检验所的协助下分别取上述 TPC 包衣片试验品与 HPMCP 市售品各 6 片,按照《中国药典》2010 年版二部中奥美拉唑肠溶片的释放度检测方法,采用篮法,100 r/min,以释放度的平均值为指标,进行该项对比实验。

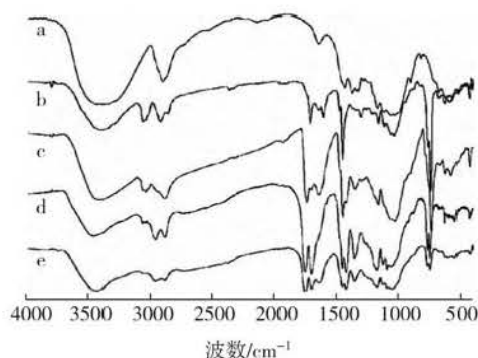
1.4.3 手性拆分能力测试 在郑州英诺生物科技有限公司的帮助下,将以水为沉淀析出液,真空干燥得到的 TPC 制成涂敷柱,与手性柱中著名的纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)涂敷柱(Chiralcel OD)在高效液相色谱仪上做手性拆分对比实验,以 21 种手性药物(20 个双光学异构体,1 个四光学异构体的萘羟心安)为测试对象,以正己烷-乙醇为流动相,流速 0.5 mL/min,在各手性药物最大检测波长处测定。

2 结果与分析

2.1 不同条件对三肽纤维素酯合成的影响

2.1.1 减压蒸除溶剂对酰氯化(1)的影响 酰氯化(1)的结果直接关系到整个实验的成败。其合成看似简单,但产物的最终形态却很关键。反应结束后如用水泵蒸除溶剂和残留的 $SOCl_2$,由于减压程度不够,得到的酰氯为淡黄色油状黏稠胶体(残留的 $SOCl_2$ 与酰氯形成了共沸物), $SOCl_2$ 的存在将直接影响下一步的实验:使反应液呈酸性,导致纤维素降解,无法在甲醇中沉淀,甚至在水中也仅得到微量的沉淀。由红外光谱图(见图 2 中曲线 b)可知,此种胶体得到的产物(2)在结构上就与其他条件得到的产物不同,应该是结构被酸性破坏所致。因此,经过反复实验后,为了更有效地除去二氯甲烷和 $SOCl_2$,必须使用减压程度足够的油泵,以产物(1)为干燥的淡黄色固体为准。

2.1.2 沉淀剂对产物(2)的影响 考察了水和甲醇 2 种沉淀剂对产物(2)的影响。由于水能使纤维素分



a. 微晶纤维素 microcrystalline cellulose; b. 残留 $SOCl_2$ residue; c. 水中沉析物 water-insoluble fraction; d. 甲醇沉析物真空干燥 methanol-insoluble fraction dried under vacuum; e. 甲醇沉析物冷冻干燥 methanol-insoluble fraction dried using freeze-drying

图 2 微晶纤维素与中间产物(2)的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of microcrystalline cellulose and intermediate (2)

子链间形成氢键交联,而醇是单官能团化合物,形成的氢键较少且不形成交联^[10]。因此,水中得到的析出物比在甲醇中得到的析出物要多。水和甲醇 2 种沉淀剂得到的析出物,通过相同的后续步骤最终都

能得到三肽纤维素酯,经过溶解度实验发现,以水为沉淀剂制成的 TPC 极难溶解,常见的纤维素溶剂均不能将其溶解,在 LiCl/DMAc 溶液中也难溶,甚至是无法泡胀,尝试多种干燥方法后,仍不能将其改变,经过四氢呋喃和三氯甲烷浸泡后,红外图谱与元素分析仍与未处理前一致,耐化学性极佳。原因可能是纤维素衍生物在水中形成了氢键交联,尤其是产物中还有形成氢键能力较强的酰胺,一旦形成,很难消除,从而造成衍生物难溶。而以甲醇为沉淀剂制成的 TPC,室温下,在吡啶、丙酮、DMF、三氯甲烷等溶剂中均可得到透明溶液。比较图 2 中曲线 c 与曲线 d 可知,两者红外曲线基本一致,如均有 1750 cm^{-1} 的酯羰基、 1701 cm^{-1} 的酰胺羰基、 750 和 739 cm^{-1} 的芳环面外弯曲振动等特征吸收峰,唯一的差别是曲线 c 在 1644 cm^{-1} 处有纤维素的结晶水吸收峰^[1],而曲线 d 由于全部是无水反应,没有此吸收峰,结晶水的存在证明了内部氢键形成的原因,大量的内部氢键导致了最终产物在溶解性上的巨大差别。然而 2 种沉淀剂并无优劣之分,只是用途不同而已。

2.1.3 产物(2)干燥方式的影响 在甲醇中沉淀析出后,考察了冷冻干燥和真空干燥 2 种方式对产物(2)的影响。结果表明,冷冻干燥得到的产物均为良好的细软粉末,但由于冷冻干燥之前,需要用水洗涤沉淀,与水接触后,产物内部氢键大量形成,因此冷冻干燥后的产物均不溶于常见纤维素溶剂,其红外图见图 2 中曲线 e,与水中沉析得到的产物基本一致。而真空干燥则必须严格控制温度,以 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜,得棕色颗粒状固体,其在吡啶、丙酮、DMF、三氯甲烷等溶剂中的溶解度分别为 21%、15%、18%、16%。真空干燥如果温度过高则产物容易变黑,质地坚硬,不易研磨和溶解。

2.1.4 反应条件对中间产物(2)取代度的影响

表 1 反应条件对产物(2)取代度的影响

Table 1 Effect of reaction conditions on D_s of product (2)

条件 conditions		取代度 D_s
反应时间 reaction time	10h	1.21
	20h	2.15
	24h	2.12
反应温度 reaction temperature	60°C	0.87
	80°C	1.81
	100°C	2.15
$n(\text{酰氯}):n(\text{纤维素中羟基总量})$		1.5:1
$n(\text{酰氯}):n(\text{纤维素中羟基总量})$		3:1
$n(\text{酰氯}):n(\text{纤维素中羟基总量})$		5:1

纤维素在 LiCl/DMAc 溶液中的质量浓度为 20 g/L ,反应温度 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n(\text{酰氯}):n(\text{纤维素中羟基总量})$ 为 3:1 时,反应时间对取代度的影响见表 1。由表 1 可知,随着反应时间的延长,取代度逐渐增大,当超过 20 h 后,取代度反而减小,因此,反应时间以 20 h 为宜。由表 1 可以看出,随着反应温度的升高,取代度逐渐增大,但由于纤维素在 100°C 以上时,炭化变黑的可能性较大,因此,温度以 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为宜。根据参考文献^[12-13],酰氯与纤维素的羟基反应时,一般都要过量,才能保证衍生化的完全,当反应时间 20 h、反应温度 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,酰氯与纤维素中羟基总量物质的量之比对取代度的影响见表 1。由表 1 可知,随着酰氯用量的增加,取代度逐渐增大,但是 5:1 比 3:1 的取代度增大不明显,因此选择 $n(\text{酰氯}):n(\text{纤维素中羟基总量})$ 为 3:1。

2.2 三肽纤维素酯的表征

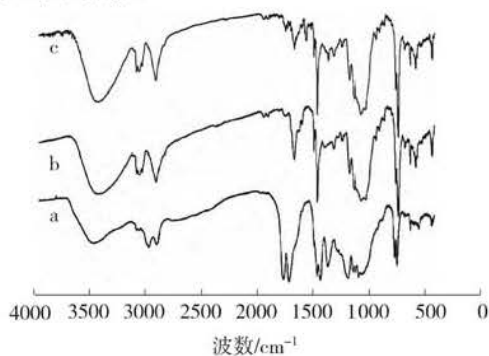
2.2.1 FT-IR 分析 中间产物及 TPC 的红外光谱如图 3 所示。由图 3 可知,曲线 a 与曲线 b 相比产生了较大差别:其中酯羰基(1733 cm^{-1})与酰胺羰基(1653 cm^{-1})均向低波数方向发生了偏移,这主要是由于肽链延长的结果。三肽末端的氨基经过修饰后,在红外曲线 c 中产生了一 NO_2 的非对称伸缩振动峰(1545 cm^{-1})和对称伸缩振动峰(1345 cm^{-1})^[14],这 2 个峰的存在,证明了 3,5-二硝基苯甲酸对肽链末端的成功修饰。

2.2.2 元素分析 TPC 元素分析结果显示:N 10.13%,C 58.22%,H 0.78%。三肽纤维素酯的分子式按照取代度 2.15 计算后为 $(\text{C}_{62}\text{H}_{67}\text{O}_{22}\text{N}_{11})_n$,其 N 理论值为 11.69%,C 理论值为 56.49%,H 理论值为 0.84%,这与实际测量值差异较小。因此,TPC 的取代度与中间产物(2)相似,约为 2.15。

2.2.3 热重分析 微晶纤维素与三肽纤维素酯的 TGA 曲线如图 4 所示。由图 4 可知,微晶纤维素的起始分解温度为 $305.79\text{ }^{\circ}\text{C}$,分解的最终温度为 $382.77\text{ }^{\circ}\text{C}$;而三肽纤维素酯起始分解温度为 $210.99\text{ }^{\circ}\text{C}$,分解结束在 $347.65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。结果表明,由于取代基的引入,破坏了微晶纤维素原有的稳定结构,并且增大了

位阻,使其刚性减弱,稳定性下降,因此 TPC 的分解起始温度与结束温度均比微晶纤维素低很多。热重分析表明 TPC 较微晶纤维素热稳定性降低,超过 210 °C 即开始分解。

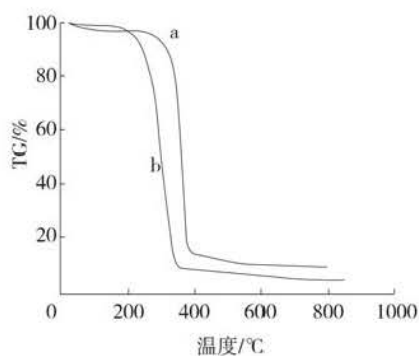
2.2.4 物理性考察 以甲醇为沉淀析出液,真空干燥得到的取代度为 2.15 的 TPC 成膜性良好,所得的薄膜为棕色,透明、韧性好、不易脆裂,尤其适合用作光敏药物的包衣材料。将其置于 pH 值 1 ~ 6.8 的磷酸盐缓冲液中考察其溶解性:以膜片破碎或溶胀、溶液浑浊为指征,判断其敏感的 pH 值。结果表明,其仅溶胀(近似溶解)于 pH 值 6.8 的缓冲液中,满足肠溶包衣的需求。取代度低于 1 的 TPC 在各种缓冲液中均不溶解。



a. 中间产物(2) intermediate (2); b. 中间产物(4) intermediate (4); c. TPC

图3 中间产物及 TPC 的红外光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of intermediates and TPC



a. 微晶纤维素 avicel; b. TPC

图4 TGA 曲线

Fig.4 TGA curves

2.2.5 XRD 分析 微晶纤维素与 TPC 的 XRD 图如图 5 所示。图 5 中曲线 a 的 2θ 在 14.6、16.2 和 22.3° 为微晶纤维素的特征衍射峰,其中 22.3° 的峰尖锐,表明晶态和非晶态差别明显。经过衍生化后的 TPC 曲线 b, 14.6、16.2 和 22.3° 的特征峰均消失,在 18.9° 附近出现了一个弥散峰。窄峰表示结晶度高晶格尺寸大,衍射峰宽则晶格尺寸小,衍射峰向低角度位移,则表示晶粒间距增大,晶体的完整性下降。曲线 b 中只有一个 18.9° 的弥散峰,表明该衍生物为完全无定形结构,也表明衍生化反应不仅发生在无定形区,也发生在结晶区,从而破坏了原有的晶体结构^[15]。

2.3 三肽纤维素酯的应用研究

2.3.1 光敏实验 光照前,试验品与对照品中含奥美拉唑分别为 99.05%、96.10% (平均值,下同),照射 2 h 后,奥美拉唑变为 98.85%、44.85%,分别下降了 0.20% 和 53.33%。可以看出,TPC 的遮光效果远远优于 HPMCP,有望成为新一代适用于避光药品生产的包衣材料。

2.3.2 释放度实验 经检测,TPC 包衣片和 HPMCP 在模拟胃液中均无释放,包衣材料完好,无差别。在 pH 值 6.8 的模拟肠液中,TPC 虽然没有 HPMCP 的溶解度高,但 TPC 能够较早的完全泡胀,使内部的药物较快的充分溶出,二者释放曲线如图 6 所示。由图 6 可知,TPC 包衣片在 10 min 内即达到最大释放量,远快于市售品 HPMCP 包衣片的 30 min。由于奥美拉唑主要针对疼痛难忍的胃溃疡及十二指肠溃疡患者且又具有浓度依赖性(体内达到一定浓度才起药效,浓度越高药效越好),因此能够更快达到最大释放量的 TPC 比 HPMCP 具有更大的优势,能够更快更有效地解除患者的痛苦。

2.3.3 手性拆分能力测试 传统的纤维素衍生物涂敷型手性色谱柱虽然拆分能力强,但由于纤维素衍生物的溶解性,致使一些溶解性较强的流动相不能使用,如:四氢呋喃、氯仿等,限制了其发展与应用;而键合型的纤维素衍生物手性色谱柱,虽然对流动相不再限制,但由于键合的过程中改变了纤维素结构,导致拆分能力比涂敷型色谱柱下降不少。以水为沉淀析出液得到的 TPC,耐化学性极佳,且综合了纤维素与肽链两大手性拆分基团,涂敷后既不改变纤维素结构,又可允许多种苛刻流动相的使用,为了考察其拆分能力,本研究将其与 OD 柱在拆分范围与拆分能力方面进行了比较实验。

拆分范围比较实验结果表明,在受试的 20 种手性化合物(双光学异构体)中,正相色谱条件下,分

离度达到 1.0 以上的,TPC 柱为 12 种,OD 柱为 4 种,且 TPC 对 20 种手性化合物均有拆分能力,但 OD 柱表现出拆分迹象的手性化合物只有 10 种,TPC 柱优于 OD 柱。

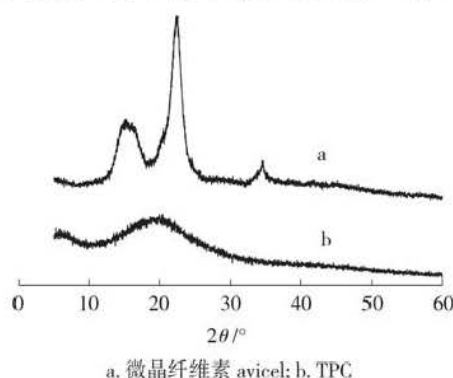


图 5 X 射线衍射图谱

Fig. 5 X-Ray diffraction spectra

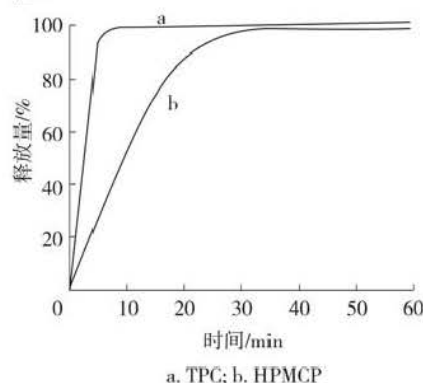


图 6 不同样品的释放曲线

Fig. 6 Dissolution curves of different samples

萘羟心安是用于手性拆分能力比较实验的实验对象,它是一种含有 4 个光学异构体的药物,在正己烷-乙醇为流动相时,TPC 无法获得有效拆分,OD 也仅能获得 3 个色谱峰(见图 7(a)),其中有 2 个异构体因同时洗脱而无法区分。为了使该药与质谱检测相适用,前人曾使用 Chiralcel AD 柱在反相色谱中对其获得过基本分离但分离度欠佳^[16]。本研究使用 TPC 柱以四氢呋喃-水-二乙胺(体积比 25:75:0.5)为流动相,顺利地将萘羟心安分离成 4 个峰,如图 7(b) 所示,分离度分别达到了 2.3、2.0 和 13.0,使之更加适用于质谱分析。而四氢呋喃在以往的涂敷柱中(包括 OD 或 AD 柱)是不能使用的。由此可知,TPC 的应用使纤维素衍生物涂敷柱适用范围得到了拓宽,并取得了比“手性第一柱”——OD 柱更加良好的效果。

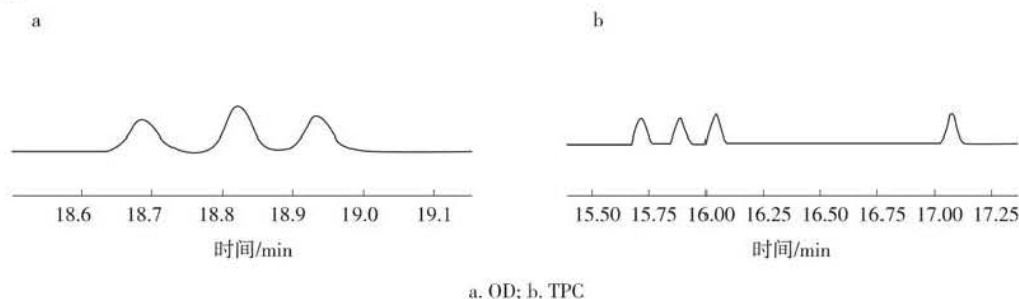


图 7 不同色谱柱对萘羟心安的手性拆分

Fig. 7 The chiral separations of nadolol in different columns

3 结 论

3.1 以微晶纤维素为原料,苄氧羰基-L-脯氨酸(FMOC-L-Pro-OH)、苄氧羰基-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸(FMOC-L-Val-L-Phe-OH)和 3,5-二硝基苯甲酸为衍生化试剂,经酰氯化、酯化、肽链的延长和氨基的修饰等反应,合成了末端氨基被修饰的三肽纤维素酯(TPC)。通过实验证实三肽若要与纤维素成酯,必须采用先酯化后肽链延长的方式,其中关键步骤为酯化反应,其反应条件为:纤维素在 LiCl/DMAc 溶液中的质量浓度为 20 g/L,温度 100 ℃, $n(\text{酰氯}):n(\text{纤维素中羟基总量})$ 为 3:1,反应时间 20 h。再通过肽链延长、氨基修饰反应,最终可得到取代度为 2.15 的三肽纤维素酯(TPC)。经过 FT-IR、TG、XRD 和元素分析等多种分析手段测试可知,3,5-二硝基苯甲酸对肽链末端进行了成功的修饰,该反应路径可行。

3.2 酯化反应的产物根据沉淀析出液不同,内部氢键产生也不相同,可得到功能不同的三肽纤维素酯。

TPC 的应用实验结果表明,以甲醇为沉淀析出液的三肽纤维素酯,是良好的肠溶包衣材料,具有遮光性强崩解迅速的特点,但其生理毒性有待进一步研究;以水为沉淀析出液的三肽纤维素酯,被制成手性涂敷柱后,综合了刷型固定相与纤维素固定相的两大优势,拆分能力强大高效,耐化学性极佳,适用范围比以往涂敷柱更广泛,尤其适用于四氢呋喃流动相体系。

参考文献:

- [1] 毕殿洲. 药剂学 [M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2001:57-60.
BI Dian-zhou. Pharmacy [M]. 4th ed. Beijing:People's Medical Press, 2001:57-60.
- [2] 袁黎明. 手性识别材料 [M]. 北京:科学出版社,2010:220-221.
YUAN Li-ming. Chiral Recognition Materials [M]. Beijing:Science Press, 2010:220-221.
- [3] 武秀明,周成,王安明,等. 化学-酶法合成多肽的研究进展 [J]. 分子催化,2009,23 (5):477-481.
WU Xiu-ming, ZHOU Cheng, WANG An-ming, et al. Research progress of the synthesis of polypeptide in chemo enzymatic [J]. Journal of Molecular Catalysis, 2009, 23 (5): 477-481.
- [4] EDWARDS J, PREVOST N, SETHUMADHAVAN K, et al. Peptide conjugated cellulose nanocrystals with sensitive human neutrophil elastase sensor activity [J]. Cellulose, 2013, 20 (3): 1223-1235.
- [5] DEVARAYAN K, HACHISU M, ARAKI J, et al. Synthesis of peptide-cellulose conjugate mediated by a soluble cellulose derivative having β -Ala esters (II): Conjugates with O-phospho-L-serine-containing peptides [J]. Cellulose, 2013, 20 (1): 365-378.
- [6] OHKAWA K, NISHIBAYASHI M, DEVARAYAN K, et al. Synthesis of peptide-cellulose conjugate mediated by a soluble cellulose derivative having β -Ala esters [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 53: 150-159.
- [7] OHKAWA K, HACHISU M, DEVARAYAN K, et al. Design and synthesis of peptide-cellulose conjugate molecules aspects from energy/steric profiles [J]. Fibers and Polymers, 2013, 14 (12): 1970-1974.
- [8] RAJESH K. 生物药剂学在药物研发中的应用 [M]. 宁保明,译. 北京:北京大学医学出版社,2012:108-109.
RAJESH K. Biopharmaceutics Applications in Drug Development [M]. Translation by NING Bao-ming. Beijing: Peking University Medical Press, 2012:108-109.
- [9] BIANCHI E, BONAZZA A, MARSANO E. Free radical grafting onto cellulose in homogeneous conditions. 1. Modified cellulose-acrylonitrile system [J]. Carbohydrate Polymers, 1998, 36 (4): 313-318.
- [10] 许冬生. 纤维素衍生物 [M]. 北京:化学工业出版社,2001:20-21.
XU Dong-sheng. Cellulose Derivatives [M]. Beijing:Chemical Industry Press, 2001:20-21.
- [11] 熊磊,于伟东. 酸处理后纤维素分子结构的显微红外光谱分析 [J]. 纤维素科学与技术,2013,21 (2):60-61.
XIONG Lei, YU Wei-dong. Analysis of the cellulose macromolecule structure after acid treatment by FTIR microspectroscopy [J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2013, 21 (2): 60-61.
- [12] CHEN Jing, ZHANG Jin-ming, FENG Ye, et al. Synthesis, characterization, and gas permeabilities of cellulose derivatives containing adamantane groups [J]. Journal of Membrane Science, 2014, 469 (1): 507-514.
- [13] 骆微,李丽琴,孙高穹,等. 微波辅助离子液体法对纤维素的均相改性研究 [J]. 纤维素科学与技术,2014,22 (4):12-17.
LUO Wei, LI Li-qin, SUN Gao-qiong, et al. Homogeneous modification of cellulose by microwave assisted ionic liquid [J]. Journal of Cellulose Science and Technology, 2014, 22 (4): 12-17.
- [14] 宁永成. 有机波谱学谱图解析 [M]. 北京:科学出版社,2010:111-114.
NING Yong-cheng. Spectrum Analysis of Organic Compounds [M]. Beijing:Science Press, 2010:111-114.
- [15] 莫亚莉,刘娟,陈日清,等. 丙烯酸纤维素的制备与表征 [J]. 林产化学与工业,2013,33 (3):74-77.
MO Ya-li, LIU Juan, CHEN Ri-qing, et al. Synthesis and characterization of acrylate cellulose [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2013, 33 (3): 74-77.
- [16] 陈立仁. 液相色谱手性分离 [M]. 北京:科学出版社,2006:280-281.
CHEN Li-ren. Chiral Separations by High Performance Liquid Chromatography [M]. Beijing:Science Press, 2006:280-281.