

# 抗凝血纤维素硫酸酯制备过程的优化

邱常玲, 王兆梅, 郭祀远, 冯敏登

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 对抗凝血纤维素硫酸酯制备过程进行五因素二次旋转正交实验和统计优化分析。结果表明, 纤维素硫酸酯制备条件为酯化剂制备温度 20 °C、酯化剂用量 6.8 mol/molAGU、反应温度 12 °C、反应时间 3.5 h、pH 8.0, 该条件下制备的纤维素硫酸酯对全血复钙时间 (RT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 和凝血酶时间 (TT) 的延长作用最强, 即纤维素硫酸酯抗凝血活性最好。

**关键词:** 纤维素硫酸酯; 抗凝血; 优化

中图分类号: TS201.6; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)11-0054-05

## Process Optimization for the Preparation of Anticoagulant Cellulose Sulfate

QIU Chang-ling, WANG Zhao-mei, GUO Si-yuan, FENG Min-deng

(College of Light Industry & Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The preparation of anticoagulant cellulose sulfate was investigated by five factors quadri-rotation orthogonal experiments and statistical optimization analysis. The results showed that the optimum preparation temperature of esterifying agent, esterifying agent dosage, reaction temperature, reaction time and pH value were 20.0 °C, 6.8 mol/mol AGU, 12 °C, 3.5 h and 8.0, respectively, under which, the cellulose sulfate had the highest effect on the prolongation of the RT, APTT and TT, meaning that the best anticoagulant activity of cellulose sulfate was achieved.

**Keywords:** cellulose sulfate; anticoagulant; optimization

纤维素硫酸酯 (Cellulose Sulfate, CS) 是纤维素经硫酸酯化修饰得到的半合成硫酸酯多糖。研究表明, CS 在体外具有突出的抗凝血作用, 其抗凝血活性比肝素钠更为有效, 是一种很有开发前途的类肝素抗凝血药物<sup>[1]</sup>。但并不是所有方法制备的 CS 都具有抗凝血活性。Groth 等人研制的 CS 抗凝血活性较突出, 但由于其方法需在超低温条件下制备中间原料, 所以成本较高<sup>[2]</sup>; 以醋酸纤维素为原料, 经过脱羧过程和硫酸酯化反应制备的 CS 抗凝血活性不强<sup>[2]</sup>。许泓瑜等人的研究表明硫酸酯化的条件影响硫酸酯的结构, 从而影响硫酸酯抗凝血活性。可见, 寻找合适的纤维素原料和硫酸酯化方法是制备具有高度抗凝血活性的 CS 的关键。本文以微晶纤维素为原料, 微晶纤维素是天然纤维素经过稀酸水解至极限聚合度的固体产物, 其分子量分布在较窄的范围内, 是较为均一的多糖。微晶纤维素的数均分子量为 30000~50000, 在抗凝血多糖类肝素的分子量范围 (5000~50000) 之内, 因此, 是较为理想的抗凝血药物制备原料。本文重点探讨具有抗凝血活性 CS 的制备条件与抗凝血活性的关系, 以

寻找制备具有高度抗凝血活性的 CS 的制备条件。

### 1 实验材料与方法

#### 1.1 实验材料

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。

#### 1.2 主要仪器与设备

CA-1500 型全自动血凝仪, 真空干燥箱, 增力搅拌器等。

#### 1.3 纤维素硫酸酯的制备

纤维素硫酸酯的制备过程分为以下四个步骤<sup>[3]</sup>:

(1) 纤维素的浸润: 将充分干燥好的纤维素, 加入一定量的无水 DMF, 在一定条件下浸润。

(2) 酯化剂的制备: 将带有冷凝管和机械搅拌装置的四颈烧瓶置于盐水冰浴中, 加入无水 DMF, 在氮气保护下边搅拌边缓慢滴加氯磺酸, 即得到  $\text{ClSO}_3\text{H}$ -DMF 酯化剂。

收稿日期: 2007-7-16

(3) 硫酸酯化反应: 向浸润后的纤维素加入一定量酯化剂并搅拌反应。反应完成后, 将产物倒入醋酸钠-乙醇溶液, 搅拌过滤, 用无水乙醇洗涤沉淀, 即得纤维素硫酸酯。

(4) 产物后处理: 将制得的纤维素硫酸酯用蒸馏水溶解, NaOH 调节 pH 后进行透析, 将透析液减压蒸发浓缩后真空下干燥即获得透明薄膜状产物, 即纤维素硫酸酯的钠盐 (在下文中简称纤维素硫酸酯, 用 Na-CS 表示)。

#### 1.4 实验设计

本研究采用多因素二次旋转正交组合设计方法, 以临床上常用的凝血指标全血复钙时间 (RT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 和凝血酶时间 (TT) 作为评价抗凝血活性的指标<sup>[5]</sup>, 选择考察的主要因素及其范围为: 酯化剂制备温度 0~40 °C、酯化剂用量 1.5~7.5 mol/mol AGU、反应温度 0~60 °C、反应时间 1~5 h、产物 pH 5.0~10.0。

表 1 因素水平编码表

$X_j$	因素				
	$Z_1$ (酯化剂制备温度/°C)	$Z_2$ (酯化剂用量/mol/mol AGU)	$Z_3$ (反应温度/°C)	$Z_4$ (反应时间/h)	$Z_5$ (pH)
上星号臂(r=2)	40	7.5	60	5	10.0
上水平(+1)	30	6.0	45	4	8.8
零水平(0)	20	4.5	30	3	7.5
下水平(-1)	10	3.0	15	2	6.3
下星号臂(r=-2)	0	1.5	0	1	5.0

#### 1.5 统计分析方法

为了寻找抗凝血活性最佳且具有一定实施频率的 Na-CS 制备条件, 本研究拟用统计频数的优化方法 (简称统计寻优)。根据文献中有关统计寻优的思想<sup>[4]</sup>, 在各因素的实验编码区间范围内, 对所建立的回归模型, 按一定的步长进行计算机模拟试验, 然后参照试验结果和实际需要, 设定一定的指标范围, 对模拟试验结果进行分析, 统计满足所设定指标要求的试验次数, 再将设定指标范围内试验参数组合按各因素下每个编码的大小和次数分别加以统计, 求取各因素的平均编码值及其 95% 的置信编码区间, 最后经过编码转换, 得到既能满足所设定指标要求、又有一定实施频率的各因素优化范围。

#### 1.6 Na-CS 的抗凝血活性分析

血浆的制备: 取健康人血置于放有 8% 枸橼酸钠溶液的容器中, 按 1 (枸橼酸钠):19 (血液) 的体积比混合, 轻摇后在 2500 r/min 下离心 10 min, 取上层液—血浆, 于 -20 °C 下冻结贮存。

(1) RT 的测试: 取小试管若干支, 分别加入 0.02% 的待测样品-生理盐水溶液 0.3 mL, 另取 ACD 全血, 分别在每支小试管内注入 1.0 mL, 立即混匀, 将小试管置于恒温水浴 (37±0.5 °C) 中孵育 1 min 后, 加入 0.025 mol/L 的氯化钙 0.1 mL, 记录各管的血液凝固时间, 即为添加待测样品后的全血复钙时间 RT<sup>[5]</sup>。

(2) APTT 的测试: 将待测样品用生理盐水配制成 0.001% 的溶液, 取 0.05 mL 于塑料试管中, 向各管

中加入 0.5 mL 血浆, 混匀后放入血凝仪, 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 °C 下孵育 3 min, 再加入 0.025 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液 0.1 mL, 混合后自动记录血浆凝固时间, 即为添加待测样品后血浆的 APTT<sup>[5]</sup>。

(3) TT 的测试: 按照 (2) 制样, 仪器自动吸取 0.2 mL 血浆混合液, 37 °C 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, 即为添加待测样品后血浆的 TT<sup>[5]</sup>。

RT、APTT 和 TT 是独立的基础性凝血途径筛查指标。在 ACD 全血和血浆中加入抗凝血物质, 如果 RT 超过正常值 180 s, APTT 大于正常值 7 s 或 TT 大于正常值 3 s, 则均可认为添加物能延长凝血时间, 即具有抗凝血作用。且 RT、APTT 和 TT 值越大, 表明所添加物质的抗凝血活性越强<sup>[5]</sup>。

#### 1.7 纤维素硫酸酯的结构表征

用 0.06 mol/L 巴比妥缓冲液 (pH8.5) 分别配制浓度为 25 mg/L 的天青 A 溶液和 2 mg/L 的样品溶液, 吸取样品液 40 μL 于试管中, 边振摇边加入 2 mL 天青 A 溶液, 混匀后, 以蒸馏水作空白, 用紫外-可见分光光度计在 450~650 nm 波长范围内进行扫描测试<sup>[6]</sup>。

取少量干燥的样品与 KBr 粉末混匀, 研磨后抽真空, 压片, 然后在 500~4000 cm<sup>-1</sup> 范围内进行红外光谱 (IR) 测试<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与讨论



mol/mol AGU、反应温度 12 °C、反应时间 3.5 h、pH 8.0, 在此反应条件下, RT 为 2680 s, 在所设定的指标范围[2500 s, 3000 s]以内, 说明优化结果可靠。其

它指标的优化与验证结果见表 5。经验证, 各指标的优化与验证结果吻合, 说明优化结果可靠。

表 5 制备纤维素硫酸酯优化结果的验证

优化条件				验证结果			
酯化剂制备温度/°C	酯化剂用量/mol/mol AGU	温度/°C	时间/h	pH	RT/s	APTT/s	TT/s
20	6.8	12	3.5	8.0	2680	83.1	17.6
8	5.5	20	4.0	7.8	2350	101.2	16.5
22	4.2	7.0	2.5	7.5	2120	77.2	25.6

### 2.3 纤维素硫酸酯的结构表征

根据以上优化结果, 选取 APTT 最佳条件下制备的 Na-CS, 对其结构进行表征。

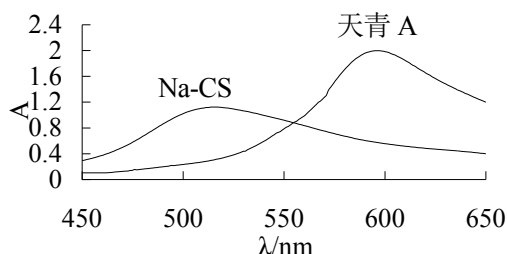


图 1 纤维素硫酸酯和天青 A 的紫外-可见吸收谱图

研究证实, GAGs (糖胺聚糖) 的阴离子特性使之与碱性染料发生特异性的静电结合, 从而引起染料溶液光吸收性质的改变, 这种改变主要表现在两个方面: 不含硫酸基的 GAGs, 如透明质酸、软骨素等可引起染料特征吸收变弱, 即所谓减色性; 含有硫酸基的 GAGs, 如硫酸软骨素、肝素等除了减色外, 还会在较短波长处产生新的吸收峰, 即为异染性, 其结果是溶液吸收峰的位移<sup>[7]</sup>。

图 1 为 Na-CS 与天青 A 结合的产物以及天青 A 分别在 450~650 nm 波长范围内的扫描谱图。由图 1 可知, 天青 A 在 595 nm 处出现最大吸收值 1.97, 而 Na-CS 与天青 A 复合物的最大吸收波长为 510 nm, 最大吸收值比天青 A 小。由此可见, Na-CS 能使天青 A 产生减色和异染现象, 表明 Na-CS 中含有带负电荷的硫酸酯基。

图 2 为 Na-CS 和 MC 的红外吸收谱图。从图 2 可以看出, 与原料 MC 相比, Na-CS 在  $\gamma_{OH}=3600\sim3200\text{ cm}^{-1}$  的羟基伸缩振动峰减弱, 说明在硫酸酯化过程中, MC 中的部分羟基被取代, Na-CS 在  $\gamma=850\sim820\text{ cm}^{-1}$  和  $\gamma=1240\text{ cm}^{-1}$  处出现了新的吸收峰, 它们分别代表 C-O-S 和 S=O 的伸缩振动, 这表明, MC 经过硫酸酯化修饰后, 其 AGU (葡萄糖单元) 中的羟基被硫酸酯基团取代。

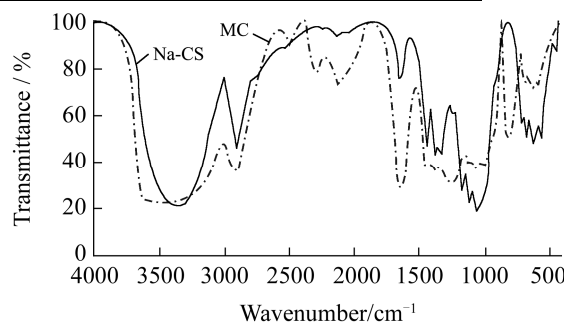


图 2 纤维素硫酸酯和微晶纤维素的 IR 谱图

### 3 结论

(1) 酯化剂制备温度、酯化剂用量、硫酸酯化反应温度、反应时间和产物 pH 均为影响纤维素硫酸酯抗凝血活性的主要因素, 通过多因素实验和统计优化分析得出最佳制备工艺参数: 酯化剂制备温度 20.0 °C、酯化剂用量 6.8 mol/mol AGU、反应温度 12 °C、反应时间 3.5 h、pH 8.0。该条件下制备的纤维素硫酸酯对 RT、APTT 和 TT 的延长作用最强, 即抗凝血活性最好。

(2) 利用紫外-可见吸收光谱、IR 检测分析, 表明 MC 中 AGU 上的羟基发生了硫酸酯化取代。

### 参考文献

[1] Tyan Yu-Chang, Liao Jiunn-Der, Wu Yi-Te. Anticoagulant activity of immobilized heparin on the polypropylene nonwoven fabric surface depending upon the pH of processing environment [J]. Journal of Biomaterials Applications, 2002, 17 (2): 153-178

[2] Groth T, waqenknecht W. Anticoagulant potential of regions-selective derivatized cellulose [J]. Biomaterials, 2001, 22(20), 2719-2729

[3] 王兆梅, 李琳, 胡松青, 等. 抗凝血硫酸化微晶纤维素的制备 [J]. 现代化工, 2003, 23(2): 30-33

(下转第 53 页)