文章编号:1000-5404(2012)14-1397-04

论著

脂酰丙氨酸酯同系凝胶因子的合成与成胶因素的评价

叶连宝,秦凌浩,王晓明,胡巧红 (510006 广州,广东药学院药科学院)

[摘要] **目的** 合成十四、十六、十八酰丙氨酸甲酯,并对其胶凝能力进行考察。**方法** 以丙氨酸甲酯,十四、十六、十八酰氯为原料,合成十四、十六、十八酰丙氨酸甲酯,采用IR、^{1}H-NMR、MS确证其结构,对不同溶剂、不同温度及不同链长的胶凝能力进行研究。**结果** 该类凝胶因子可以在大多数的有机溶剂中形成凝胶,十四、十六、十八酰丙氨酸甲酯在注射用大豆油和中链脂肪酸三甘酯(medium chain triglycerides, MCT)中的最低成胶浓度分别为11.9、7.2、8.5 mg/ml和18.7、12.3、13.4 mg/ml;3种凝胶因子在大豆油中的胶凝焓变分别为74.74、51.70 kJ/mol和61.61 kJ/mol。**结论** 合成得到目标化合物具有较好的胶凝能力,可以作为局部给药的长效药物载体。

[关键词] 脂酰丙氨酸酯;凝胶因子;合成;评价
[中图法分类号] R914.5;R917;R961 [文献标志码] A

Synthesis of acyl alanine methyl ester gelator and assessment of its gelation factors

Ye Lianbao, Qin Linghao, Wang Xiaoming, Hu Qiaohong (School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510006, China)

[**Abstract**] **Objective** To synthesize the N-tetradecanoyl, N-hexadecanoyl and N-octadecanoyl alanine methyl ester gelators and investigate their gelation ability. **Methods** N-tetradecanoyl, N-hexadecanoyl and N-octadecanoyl alanine methyl ester gelators were synthesized using alanine methyl ester, N-tetradecanoyl chloride, N-hexadecanoyl chloride and N-octadecanoyl chloride. Chemical structures of the gelators were confirmed by MS, IR, and ^{1}H-NMR, respectively. Gelation ability of different solvents, temperatures and chain lengths was studied. **Results** The synthesized N-tetradecanoyl, N-hexadecanoyl and N-octadecanoyl alanine methyl ester gelators could produce gel in many organic solvents. Their minimum gel concentration in soybean oil and medium chain triglycerides(MCT) was 11.9, 7.2, 8.5 mg/ml and 18.7, 12.3, 13.4 mg/ml, respectively, and their enthalpy (ΔH) in soybean oil was 74.741, 51.70 kJ/mol and 61.61 kJ/mol, respectively. **Conclusion** The synthesized N-tetradecanoyl, N-hexadecanoyl and N-octadecanoyl alanine methyl ester gelators have a good gelation ability, and can thus be used as a local long-acting drug carrier.

[**Key words**] acyl alanine methyl ester; gelator; synthesis; evaluation

Supported by the Innovative Foundation of Distinguished Young Talents in Higher Education of Guangdong Province ([2009]400), the Project of Department of Science and Technology of Guangdong Province (2010A030200038), and the Project of Science and Technology of Guangzhou(2010Y1-C841). Corresponding author: Hu Qiaohong, E-mail: 123628284@qq.com

研究[1-4]表明,某些小分子化合物在浓度很低的情况下,可以通过分子间氢键、π-π堆积、范德华力和静电作用等分子间作用力自组装形成三维网状结构,使大部分的非水溶剂形成凝胶,这类凝胶与使用水溶性高分子材料制备的亲水凝胶不同,因此被称为有机凝胶或超分子凝胶(superamolecular gel),而这些小分子化合物被称为凝胶因子。超分子凝胶因子具有热敏性和分子识别功能,因此在手性药物的分离和作为药物载体方面具有很高的应用价值,尤其是将超分子凝胶作为药物的载体更可以显著避免传统亲水凝胶所特有的药物突释现象,降低用药风险并达到长效治疗的作用[5]。

目前报道的小分子凝胶因子主要包括氨基酸类化合物[6]、胆固醇类化合物[7]、酰脲类化合物和糖类衍生物[8]等,而氨基酸类凝胶因子由于具有良好的生理相容性和可生物降解特性受到了广泛的关注。本研究将合成一系列可生物降解的脂酰丙氨酸酯凝胶因子,并对该类凝胶因子的表征和成胶能力进行考察,为今后使

[基金项目] 广东省高校优秀青年创新基金(育苗工程项目)(广东省教育厅粤财教[2009]400号);广东省科技计划项目粤科规划字(2010A030200038);广州市科技计划资助课题(2010Y1-C841)
[通信作者] 胡巧红,E-mail: 123628284@qq.com

用该类凝胶因子制备超分子凝胶提供相关的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

FA1104W电子天平(上海精密科学仪器有限公司);SZCL恒温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);Spectrum 100傅里叶变换红外测定仪(PerkinElmer,英国);AVANCE Ⅲ 500 MHz核磁共振谱仪(Bruker,瑞士);Q-Tof Micro四级杆-飞行时间串联质谱仪(Waters,美国);丙氨酸甲酯盐酸盐(优级纯,上海凯赛化工有限公司);十四,十六,十八酰氯(纯度98%,无锡贝诺精细化工有限公司);三氯甲烷(天津市富宇精细化工有限公司);三乙胺(天津市大茂化工有限公司);无水硫酸钠,环己烷,乙酸乙酯(天津市百市化工有限公司);丙酮,二甲基亚砜(广州化学试剂厂);注射用大豆油(铁岭北亚药用油公司);中链脂肪酸三甘酯(MCT,德国lipoid公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 超分子凝胶因子的合成与精制 按照文献[9]所列方法进行丙氨酸甲酯凝胶因子的合成。称取3 g丙氨酸甲酯于250 ml三颈瓶,并加入100 ml三氯甲烷,密闭容器,开始搅拌,继续加入5 ml三乙胺,搅拌30 min,待白烟消失,通入一定量的氮气,再加入12 ml十四酰氯,密闭容器,继续搅拌反应5 h。

反应完全后,依次用50 ml蒸馏水、50 ml饱和NaCl溶液、50 ml饱和$NaHCO_3$溶液、50 ml稀盐酸溶液、50 ml蒸馏水进行萃取,分离有几层,用无水硫酸钠干燥,减压回收溶剂,得到白色粗品,再用正丁醇与乙酸乙酯(1∶1)进行重结晶。十六酰、十八酰丙氨酸甲酯按上述方法进行合成,所需原料量按各式量进行计算。

1.2.2 凝胶因子的结构确证 将所得同系物凝胶因子在120 ℃烘干2 h,研磨粉碎过100目筛网,取粉末适量经KBr压片后在400~4 000 cm^{-1}扫描,得各同系物凝胶因子的红外光谱。

取上述烘干粉碎粉末室温下进行^{1}H-核磁共振分析,接收时间3.2 s,脉冲宽度30°,时间2.0 s,谱宽5 208 Hz,DMSO-d6溶解测定,得各同系物凝胶因子的^{1}H-核磁共振谱图。

取上述烘干粉碎粉末室温下进行质谱分析,波长337 nm,加速电压20 kV,检测电压1.6 kV,正离子模式测定并记录结果。

1.2.3 凝胶因子对不同溶剂的凝胶化研究 在10 ml具塞试管中加入1 ml有机溶剂和适量凝胶因子,加热至固体全部溶解,然后使其冷却至37 ℃,倒置试管观察是否形成凝胶,若未形成凝胶,则继续加入凝胶因子重新加热溶解观察,记录凝胶因子对于不同有机溶剂的成胶性能和最小胶凝浓度。

1.2.4 凝胶因子碳链长度对成胶性能的研究 以注射用大豆油和MCT为溶剂,按照1.2.3中的操作步骤,记录十四酰、十六酰和十八酰丙氨酸甲酯的最小胶凝浓度,用以考察同系物中不同的碳链长度对于溶剂成胶能力的影响。

1.2.5 不同温度下凝胶因子胶凝性能的研究 分别考察十四酰、十六酰和十八酰丙氨酸甲酯在37、40、45、50 ℃和55 ℃下注射用大豆油中的最小胶凝浓度,对于超分子凝胶体系,其凝胶因子浓度的对数值(lnC)和凝胶相变温度的倒数T_{GS-1}呈线性关系并符合下面的公式:

$$\ln c = -\frac{\Delta H}{RT_{GS}} + A$$

其中c为凝胶因子浓度;△H为凝胶相变过程的焓变;R为气体常数;T_{GS}为相变温度。根据不同胶凝温度下3种凝胶因子的浓度求出上述方程,并对凝胶的焓变进行分析。

2 结果

2.1 凝胶因子的合成与表征

同系物凝胶因子为白色或类白色针状结晶,产物收率为74.5%。

由图1所示,3 320 cm^{-1}处的单峰为仲酰胺的特征性吸收峰;2 918 cm^{-1}、2 849 cm^{-1}处的吸收峰为长链烷烃C-H反对称和对称伸缩振动吸收;1 745 cm^{-1}与1 646 cm^{-1}处的吸收峰均为C=O的伸缩振动吸收,1 646 cm^{-1}处的是酰胺键的羰基吸收峰;1 540 cm^{-1}处的吸收峰为N-H的弯曲振动吸收;719 cm^{-1}处的弱吸收峰为烷基长链($n>5$)的特征吸收峰。

由图2所示,十四酰丙氨酸甲酯的相对分子质量为313,质谱上显示的单峰数值336为目标产物和Na离子相对分子质量之和,表明实验合成得到的化合物符合要求。

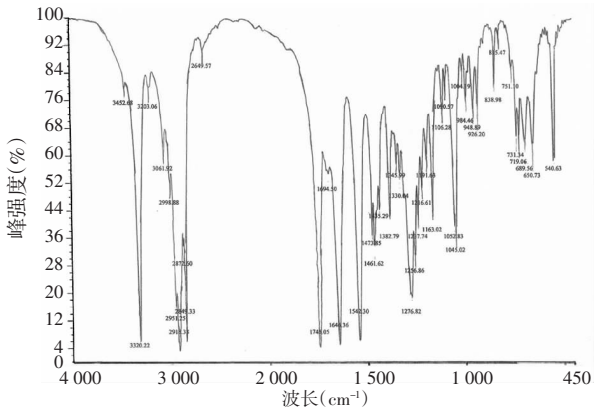


图1 十四酰丙氨酸甲酯红外光谱分析

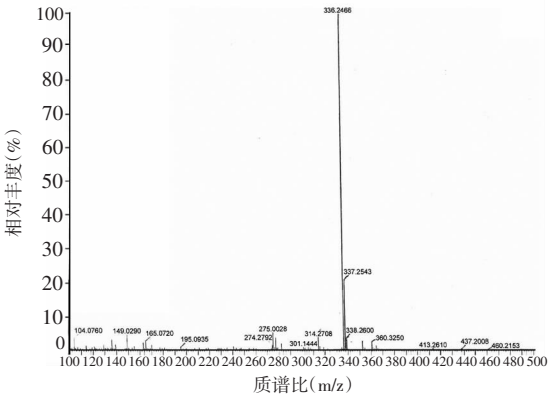
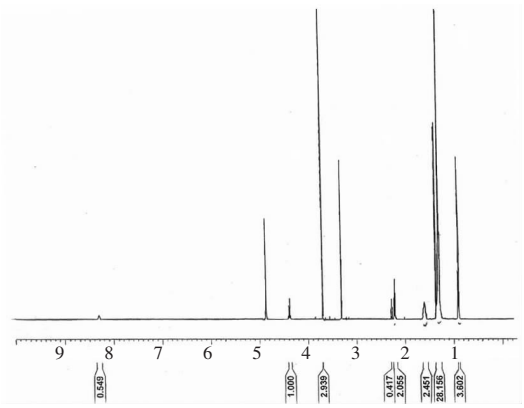


图2 十四酰丙氨酸甲酯质谱分析

由图3所示,氢位移0.85~0.95(t,3H)为长链烷基中末端甲基上的3个氢;1.30(宽峰,28H)为长链烷基中间亚甲基上的氢;1.35~1.37(d)可推知为丙氨酸甲酯上的端基甲基;1.57~1.64(m,2H)为长链烷基中从羰基处开始第2个碳上的氢;2.20~2.23(t,2H)为长链烷基中从羰基处开始第1个碳上

的氢;3.71(s,3H)为与酯基相连的甲基上的氢,表现为单峰;4.35~4.42(m,1H)为与酰胺键的氮相连碳上的氢。根据红外光谱、质谱和核磁共振谱图可以认定,所得产物为目标产物。



位移(ppm)

图 3 十四酰丙氨酸甲酯核磁共振氢谱分析

2.2 凝胶因子对不同溶剂的胶凝作用

表 1 为十四酰丙氨酸甲酯对不同种有机溶剂的凝胶化作用,结果表明脂酰丙氨酸酯凝胶因子能在丙酮、DMSO、石油醚、甲苯等多种有机溶剂中形成凝胶,在柠檬酸三乙酯中的最低胶凝浓度为 11.6 mg/ml,注射用大豆油中 11.9 mg/ml,而在石油醚中是 33.2 mg/ml。由于作为药用载体的溶剂限制,后续对凝胶因子性质的考察以注射用大豆油作为溶剂系统。

表 1 37 ℃时十四酰丙氨酸甲酯对有机溶剂的凝胶化作用

溶剂	成胶性能	最小胶凝浓度(mg/ml)	溶剂	成胶性能	最小胶凝浓度(mg/ml)
丙酮	G	16.7	乙醇	S	
氯仿	S		甲醇	S	
N,N-二甲基乙酰胺	S		石油醚	G	33.2
乙酸乙酯	G	13.2	邻苯二甲酸二乙酯	G	24.3
正己烷	G	14.5	柠檬酸三乙酯	G	11.6
N-甲基吡咯烷酮	P		注射用大豆油	G	11.9
二甲亚砜	G	15.8	MCT	G	18.7

G:凝胶;P:沉淀;S:溶液

2.3 凝胶因子碳链长度的影响

由表 2 结果可知,因碳链长度不同,凝胶因子在注射用大豆油和 MCT 的成胶能力也不同,十四酰丙氨酸甲酯在大豆油体系和 MCT 中的最小凝胶浓度最大,而十六酰丙氨酸甲酯的凝胶浓度最小,说明在 3 种凝胶因子中,十四酰丙氨酸甲酯的成胶能力最差,而十六酰丙氨酸甲酯的成胶能力最强。

表 2 37 ℃下不同碳链的丙氨酸甲酯在大豆油和中链甘油三酯中的最小成胶浓度(mg/ml)

凝胶因子	注射用大豆油	MCT
十四酰丙氨酸甲酯	11.9	18.7
十六酰丙氨酸甲酯	7.2	12.3
十八酰丙氨酸甲酯	8.5	13.4

2.4 温度对凝胶因子胶凝性能的影响

随着温度的升高,在形成相同的凝胶条件下,凝胶因子的用量也会随之增大,根据在不同的温度下测定的最小胶凝浓度通过回归方程可以求出胶凝的焓变。3 种凝胶因子的浓度求出上述方程分别为:十四酰丙氨酸甲酯($\ln c = -8\,989.3\ T_{GS\text{-}1} + 31.3$, $R^2 = 0.960\,2$);十六酰丙氨酸甲酯($\ln c = -6\,218.2\ T_{GS\text{-}1} + 21.9$, $R^2 = 0.947\,8$);十八酰丙氨酸甲酯($\ln c = -7\,410.5\ T_{GS\text{-}1} + 25.9$, $R^2 = 0.922\,1$)。计算得到十四酰丙氨酸甲酯、十六酰丙氨酸甲酯、十八酰丙氨酸甲酯在注射用大豆油体系凝胶相变热焓 ΔH 分别为 74.74、51.70 kJ/mol 和 61.61 kJ/mol。

3 讨论

本实验合成了 3 种可生物降解同系物脂酰丙氨酸酯凝胶因子,并对其胶凝特性和在特定体系中的成胶能力进行了考察,结果表明该类凝胶因子可以在大多数的有机溶剂中形成凝胶,尤其是在注射用大豆油和 MCT 中的成胶性能较理想,表明其在作为药物载体方面的潜在应用特性。凝胶因子的胶凝浓度一般会随着碳链的增加而降低,但结果表明十八酰丙氨酸甲酯的胶凝浓度反而要高于十六酰丙氨酸甲酯,说明碳链的长度与凝胶因子的胶凝性能并非持续正相关。

在同一个温度下,要破坏十四酰丙氨酸甲酯所成的凝胶比破坏十六酰丙氨酸甲酯和十八酰丙氨酸甲酯所成的凝胶需要更多的能量,即在相同温度下,十四酰丙氨酸甲酯所成的凝胶更稳定。上述 3 种凝胶因子在同一温度下,相同溶剂系统中,十四酰丙氨酸甲酯使注射用大豆油形成凝胶时所需的用量最多,凝胶因子的浓度最大,使得该体系中氢键效应大大增强。从而在相同温度下,十四酰丙氨酸甲酯所成的凝胶更稳定。在不同温度条件下对凝胶因子的考察结果表明凝胶因子的用量产生变化,其胶凝温度会随之变化,而根据这种特性可以将超分子凝胶体系设计为温敏性给药系统,使其在高于体温的条件下呈现液态,而进入人体组织后迅速胶凝形成固态,与传统的缓释亲水凝胶截然不同[10-11]。这种温敏的超分子凝胶会显著延长药物的给药时间,达到持续的释放效果,更由于其本身是强疏水性的,而避免了传统亲水凝胶的突释现象,尤其适用于小剂量长期连续给药的药物。

参考文献:

[1] Hirst A R, Escuder B, Miravet J F, *et al*. High-tech applications of self-assembling supramolecular nanostructured gel-phase materials: from regenerative medicine to electronic devices[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2008, 47(42): 8002-8018.

[2] Adams D J. Dipeptide and tripeptide conjugates as low-molecular-weight hydrogelators[J]. Macromol Biosci, 2011, 11(2): 160-173.

[3] Hirst A R, Coates I A, Boucheteau T R, *et al*. Low-molecular-weight gelators: elucidating the principles of gelation based on gelator solubility and a cooperative self-assembly model[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(28): 9113-9121.

[4] Samanta S K, Pal A, Bhattacharya S. Choice of the end functional groups in tri(p-phenylenevinylene) derivatives controls its physical gelation abilities[J]. Langmuir, 2009, 25(15): 8567-8578.
[5] 冯桂龙, 王宏, 杨亚江. 客体小分子在超分子有机凝胶体系中的扩散释放[J]. 化学学报, 2008, 66(5): 576-580.
[6] Hirst A R, Smith D K. Dendritic Gelators [J]. Top Curr Chem, 2005, 256: 237-273.
[7] Fages F, Vogtle F, Zinic M. Systematic design of amide- and urea-type gelators with tailored properties [J]. Top Curr Chem, 2005, 256: 77-131.
[8] Luboradzki R, Gronwald O, Ikeda M, *et al*. An attempt to predict the gelation ability of hydrogen-bond-based gelators utilizing a glycoside library[J]. Tetrahedron, 2000, 56(49): 9595-9599.
[9] 贾强, 王可可, 姚慧敏, 等. 氨基酸类凝胶因子的合成及其性质考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(1): 28-33.
[10] 李欣宇, 朱照静, 车坷科, 等. 布洛芬包合物凝胶体外释药行为及体内药代动力学研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1786-1789.
[11] 吴青, 朱照静, 李欣宇, 等. 地塞米松磷酸钠温度敏感原位凝胶的体外释药特性[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2142-2145.

(收稿:2011-12-28;修回:2012-02-12)
(编辑 张 维)

(上接1396页)

见表现为CRP升高(45例,83.3%)、白蛋白降低(38例,70.4%)、血小板增高(36例,66.7%)、CK-MB增高(35例,64.8%)。3例血培养阳性,其中2例为表皮葡萄球菌生长。心电图检查发现窦性心动过速(伴发热)38例(70.4%),ST-T(T波双向、低平或倒置)异常9例(16.7%),无明显异常者11例(20.4%)。超声心动图显示冠状动脉异常16例(29.62%),其中冠脉扩张15例(27.78%)。冠状动脉内径<3 mm 2例、≥3 mm~<4 mm 9例,≥4 mm~7 mm 4例,余1例(1.85%)内径正常(≥7 mm),但冠脉壁增厚,回声增强。另2例见心脏扩大,4例见心包积液。

1.3 治疗与转归

54例KD患儿均在发热第5~10天采用静脉滴注丙种球蛋白(intravenous immunoglobulin,IVIG)1 g/(kg·d),连用2 d,同时加阿司匹林30~50 mg/(kg·d),分2~3次口服,热退后5~7 d改为3~5 mg/(kg·d)顿服,持续用药至症状消失、血沉正常及彩色B超示冠状动脉恢复正常,治疗期间无新增CAL病例。出院后随访半年无再发入院病例。

2 讨论

KD多见于5岁以下小儿。其中冠状动脉最易受累,可引起冠状动脉扩张,严重者发生冠状动脉瘤,进而导致冠状动脉狭窄、栓塞,引起心肌梗死、猝死等严重并发症。近年来,KD患儿逐渐增多,由于受累部位不同,临床表现形式不一,早期类似一般发热性疾病并缺乏特异性,因此很容易造成漏诊、误诊。从本组资料中可以发现,KD早期特征性表现按发生率高低依次为发热(100%)、唇红干裂(98.1%)、眼球结膜充血(96.2%)、多形性皮疹(94.4%),提示应想到该病的可能。而淋巴结肿大(98.1%)直径多<1.5 cm,相对于诊断标准意义不大。虽然肛周皮肤潮红脱屑及卡瘢反应发生率较低,但出现时间早,罕见于其他疾病,尤其卡瘢反应未见于其他发热性疾病,有较高的特异性,在早期诊断中有重要意义。

实验室检查表明KD早期即出现血白细胞总数升高,以中性粒细胞为主,CRP、ESR均显著升高增快,尤其白细胞总数可高达(20~30)×10^9/L,中性粒细胞占80%~90%,血小板在第7天可升至370×10^9/L,且有逐渐上升趋势,在早期诊断中具有重要参考价值。超声检查表明大多冠状动脉扩张出现在病程第10天左右,但病程早期可表现为管壁增厚及回声异常,提示有管壁水肿,对早期诊断有提示价值,后期应密切复查冠脉超声,注意发现冠状动脉更严重病变。

KD最严重的并发症是CAL,防止发生CAL是治疗KD的关键。KD治疗首选静脉输注丙种球蛋白和口服大剂量阿司匹林,在急性期的联合应用,能明显降低冠状动脉病变的发生率[6]。目前临床上多使用免疫球蛋白(IVIG)1 g/(kg·d),连用2 d,或2 g/kg×1次治疗。在近期与远期均可显著改善临床症状,疗效确切。Sakata等[7]则认为单剂1 g/kg治疗KD更有效。本研究中均在病程第5~10天内使用IVIG,剂量为1 g/(kg·d),连用2 d。随访1个月无CAL新发或复发。

综上所述,对持续发热患儿出现皮疹、球结膜充血、唇红干裂等临床表现,尤其伴肛周脱皮潮红、出现卡瘢反应、血小板明显升高,应想到该病的可能。结合ESR、CRP异常,超声心动图发现冠脉受损,可初步诊断为KD,应早期应用丙种球蛋白与阿斯匹林治疗,防止严重并发症的发生。

参考文献:

[1] Newburger J W, Takahashi M, Gerber M A, *et al*. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis, and Kawasaki disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association [J]. Pediatrics, 2004, 114(6): 1708-1733.
[2] Fukazawa R, Ogawa S. Long-term prognosis of patients with Kawasaki disease: at risk for future atherosclerosis? [J]. J Nippon Med Sch, 2009, 76(3): 124-133.
[3] Codispoti C, Boyd S, Sees D, *et al*. Symptomatic coronary obstruction due to Kawasaki disease in an adult [J]. Ann Thorac Surg, 2008, 85(3): 1081-1083.
[4] 翟秀全, 计晓娟, 余更生, 等. 定量组织速度成像联合组织追踪成像评价川崎病患儿左心收缩功能[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(19): 2066-2069.
[5] 张晓梅, 孙景辉. 川崎病诊治进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(1): 52-55.
[6] 邱汉银. 川崎病48例临床分析[J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(2): 44-45.
[7] Sakata K, Hamaoka K, Ozawa S, *et al*. A randomized prospective study on the use of 2 g-IVIG or 1 g-IVIG as therapy for Kawasaki disease[J]. Eur J Pediatr, 2007, 166(7): 565-571.

(收稿:2012-05-26;修回:2012-06-12)
(编辑 栾 嘉)