

# 壳聚糖基卡托普利的合成及其释药研究\*

李和平<sup>1†</sup>, 肖青<sup>2</sup>, 秦龙<sup>1</sup>

(1. 长沙理工大学 化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114;

2. 云南水利水电职业学院 基础教育部, 云南 昆明 650499)

**摘要:**克服水溶性药物的突释现象, 可减少给药次数, 提高疗效. 本研究以卡托普利为模型药物, 壳聚糖为载体, 采用耦合的方法, 设计合成了壳聚糖-卡托普利和壳聚糖-赖氨酰-卡托普利两种新的键连型壳聚糖基载药体系, 产物结构经 IR、<sup>1</sup>H NMR 和 MS 表征; 并测试了两种化合物在 PBS 缓冲溶液(pH=7.4)和 HCl-KCl 缓冲溶液(pH=1.2)中 72 h 的累积释药率: 壳聚糖-卡托普利的累积释药率分别为 59.2% 和 78.4%, 壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的累积释药率分别为 55.2% 和 76.4%. 结果表明, 两种键连型载药体系均消除了突释现象, 具有很好的缓释效果, 这将有望成为水溶性药物的理想载药体系.

**关键词:**卡托普利; 壳聚糖; 合成; 缓释

**中图分类号:** TB383

**文献标志码:** A

## Synthesis of Chitosan-based Captopril Derivatives and Its *in vitro* Release

LI Heping<sup>1†</sup>, XIAO Qing<sup>2</sup>, QIN Long<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114, China;

2. Department of Basic Education, Yunnan Water Resources and Hydropower Vocational College, Kunming 650499, China)

**Abstract:** In order to overcome the burst release of water-soluble drugs, reduce dosing frequency and improve curative effect, two new bond-linking type drug-loaded control-releasing systems: Chitosan-Captopril and Chitosan-Lysyl-Captopril were synthesized from captopril as a model drug and chitosan as carriers. The products were characterized by IR, <sup>1</sup>H NMR and MS. The accumulation of drug release rates of Chitosan-Captopril are 59.2% in PBS buffer (pH=7.4) and 78.4% in HCl-KCl buffer (pH=1.2). The accumulation of drug release rates of Chitosan-Lysyl-Captopril are 55.2% in PBS buffer (pH=7.4) and 76.4% in HCl-KCl buffer (pH=1.2). The results show that the two kinds of drug-loaded systems eliminate the phenomenon of burst releasing and have excellent sustained release properties, which are expected to become the ideal control-releasing system of water-soluble drugs.

**Key words:** captopril; chitosan; synthesis; slow-releasing

卡托普利是一种有效的血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂, 用于治疗高血压和充血性心脏衰

竭<sup>[1]</sup>. 但游离态的卡托普利容易氧化<sup>[2]</sup>, 且由于卡托普利的水溶性较好导致其生物半衰期仅为 1.6~

\* 收稿日期: 2017-01-22

基金项目: 湖南省教育厅科研重点资助项目 (17 A002), Key Project of Hunan Provincial Education Department of China (17 A002); 国家自然科学基金资助项目 (21275022), National Natural Science Foundation of China (21275022)

作者简介: 李和平 (1968-), 男, 湖南邵阳人, 长沙理工大学教授, 博士

† 通讯联系人, E-mail: lihpb@csust.edu.cn

1.9 h,需要日服3~4次,摄入总量达到37.5~75.0 mg<sup>[3]</sup>.临床上为了保持有效治疗浓度,通常采用增加剂量以延长体内作用时间,从而导致“波峰波谷”现象,可能引起眩晕、头疼、胃肠道紊乱等不良反应.因此,通过控制药物释放速率来减少峰谷差异及给药次数,减轻不良反应的意义重大.

目前,调节卡托普利释放速率的方式主要是将其制成包衣片、微丸或微囊等缓释剂型<sup>[4]</sup>:1)将卡托普利与难溶于水的高分子化合物混合压缩成丸剂.如将卡托普利与羟丙基甲基纤维素,以及CaHPO<sub>4</sub>和PEG 6000等辅料混合均匀,然后压缩成小块<sup>[5]</sup>.卡托普利的溶解速率决定于高分子化合物的疏水性、浓度大小等因素.2)在丸剂外再包一层难溶于水的高分子化合物做成包衣片.在卡托普利丸剂外再包一层乙基纤维素或羟丙基甲基纤维素等高分子化合物,该类包衣片的卡托普利释放速率主要依赖于包衣层的物理-化学特性,如包衣层厚度、空隙大小和空隙率等<sup>[6]</sup>.3)以介孔硅等无机纳米粒子作为固载材料,制备成微或纳囊<sup>[7]</sup>.介孔硅的孔径及比表面积大小显著影响其载药量及卡托普利的释放速率.这些方法都降低了卡托普利的溶解速率,延长了释药时间,但也增大了卡托普利的氧化程度,因此,合成共价键联型卡托普利是解决易氧化及峰谷差异的最理想选择.

壳聚糖具有良好生物相容性和生物降解能力<sup>[8-9]</sup>,本文首次以壳聚糖为高分子骨架共价键联卡托普利,同时解决游离卡托普利的突释问题和易氧化问题;且基于赖氨酸具有预防心脑血管疾病产生的功效<sup>[10]</sup>,以其作为桥联基团,有利于进一步增强卡托普利的疗效.并对两种化合物在PBS缓冲溶液(pH=7.4)和HCl-KCl缓冲溶液(pH=1.2)中72 h的累积释药率进行了初步研究.

## 1 实验

### 1.1 试剂与仪器

卡托普利:99.5%,常州制药厂有限公司.EDC·HCl:98.5%,阿拉丁试剂公司.NHS:98%,阿拉丁试剂公司.HOBt:99%,阿拉丁试剂公司.DMAP:99%,阿拉丁试剂公司.壳聚糖:DD为98.87%(经微波间歇加热法脱乙酰处理),M<sub>n</sub>为411 KDa.其余试剂均为AR级,实验用水无特别说明均为蒸馏水.

液-质联用仪:Agilent 1100型,美国安捷伦公司.红外光谱仪:Nicolet Avator 360型,美国Nicolet公司.冷冻干燥机:FD-1A型,北京博医康实验

仪器有限公司.透析袋:截留分子量8 000~14 000,北京鼎国生物技术责任有限公司

### 1.2 实验过程

#### 1.2.1 壳聚糖-卡托普利的合成

称取卡托普利0.108 6 g、EDC·HCl 0.115 0 g、NHS 0.069 g、DMAP 0.012 2 g于100 mL三颈烧瓶中,将上述混合物用3 mL DMF溶解,25 °C搅拌活化4 h.将0.12 g(0.75 mmol-NH<sub>2</sub>)壳聚糖用适量0.1 M的盐酸溶解,加入活化溶液中,用三乙胺调节溶液的pH 8~9,室温下反应48 h,蒸馏水透析3 d,冷冻干燥.产物为白色海绵状固体,产率46.2%.IR(KBr):3 382.4 cm<sup>-1</sup>(O-H和N-H混合伸缩振动),2 973.5 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>3</sub>不对称伸缩振动),2 925.3 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>2</sub>不对称伸缩振动),2 880.2 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>3</sub>对称伸缩振动),1 683.9 cm<sup>-1</sup>(酰胺I带C=O伸缩振动),1 635.8 cm<sup>-1</sup>(酰胺II带N-H变形振动),1 424.5 cm<sup>-1</sup>(S-CH<sub>2</sub>特征吸收),1 330.5 cm<sup>-1</sup>(酰胺III带C-N伸缩振动),1 153.7 cm<sup>-1</sup>(C-O-C伸缩振动),1 080.1 cm<sup>-1</sup>(壳聚糖C-N伸缩振动),755.1 cm<sup>-1</sup>(C-S振动).

#### 1.2.2 壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的合成

中间体卡托普利酰赖氨酸的合成:卡托普利0.108 6 g、EDC·HCl 0.115 0 g、HOBt 0.081 g、DMAP 0.012 2 g混合于100 mL三颈烧瓶中,用3 mL蒸馏水溶解,25 °C搅拌活化4 h.将赖氨酸0.065 8 g用2 mL蒸馏水溶解,加入活化溶液中,用NaHCO<sub>3</sub>粉末调节溶液的pH 8~9,室温反应24 h,无需分离提纯待用.

将EDC·HCl 0.115 0 g、HOBt 0.081 g、DMAP 0.012 2 g用2 mL蒸馏水溶解,加入到上述中间体溶液中,25 °C搅拌活化4 h.将0.12 g(0.75 mmol-NH<sub>2</sub>)壳聚糖用适量0.1 M的盐酸溶解,加入活化溶液中,用NaHCO<sub>3</sub>粉末调节溶液的pH 8~9,室温下反应48 h,蒸馏水透析3 d,冷冻干燥.产物为白色海绵状固体. IR(KBr):3 391.8 cm<sup>-1</sup>(O-H和N-H混合伸缩振动),2 974.4 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>3</sub>不对称伸缩振动),2 933.5 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>2</sub>不对称伸缩振动),2 878.7 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>3</sub>对称伸缩振动),1 683.3 cm<sup>-1</sup>(酰胺I带C=O伸缩振动),1 635.6 cm<sup>-1</sup>(酰胺II带N-H变形振动),1 457.4 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>2</sub>变形振动),1 423.4 cm<sup>-1</sup>(S-CH<sub>2</sub>),1 385.6 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>3</sub>变形振动),1 331.7 cm<sup>-1</sup>(酰胺III带C-N伸缩振动),1 154.7 cm<sup>-1</sup>(C-O-C伸缩振动),1 078.3 cm<sup>-1</sup>(壳聚糖C-N伸缩振动),751.4 cm<sup>-1</sup>(C-S振动).

#### 1.2.3 体外释药研究

用卡托普利配制0 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20

mg/L、50 mg/L 的系列标准溶液,在 199 nm 处测定吸光度做出标准曲线。

称取两份 25 mg 壳聚糖-卡托普利放入透析袋中,分别加入 5 mL PBS (pH=7.4) 缓冲溶液和盐酸-氯化钾 (pH=1.2) 溶液,放入 200 mL 与透析袋中液体相同的透析介质液中 37 °C 恒温磁力搅拌 (50 r/min) 透析,每隔一段时间取 5 mL 缓冲液,同时补充同体积新鲜的透析介质,用 UV-Vis 紫外光谱仪测 199 nm 处的吸光度,代入标准曲线中得浓度,并按式(1)计算其累积释药率. 同法进行壳聚糖-赖氨酰-卡托普利体外缓释率的测定。

$$\text{累积释药百分率} = \frac{V_0 \times c_t + V \times \sum_{n=1}^{t-1} c}{W \times X} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $V_0$ 为介质溶液的总容积; $c_t$ 为释放各时间点测得介质溶液中的卡托普利浓度; $V$ 为每次取样的体积; $W$ 为待测样品的质量; $X$ 为测得样品的载药量。

### 1.3 测试与表征

#### 1.3.1 壳聚糖-卡托普利的结构表征

壳聚糖-卡托普利的结构特点是卡托普利的羧基和壳聚糖的氨基形成酰胺键. 与壳聚糖最明显的区别就是生成了酰胺键,这是证明目标化合物合成成功与否的重要标志. 相比于壳聚糖,目标产物有很明显的酰胺键特征吸收峰出现,包括  $1\ 683.9\ \text{cm}^{-1}$  处的酰胺 I 带 C=O 伸缩振动、 $1\ 635.8\ \text{cm}^{-1}$  处的酰胺 II 带 N-H 变形振动、 $1\ 330.5\ \text{cm}^{-1}$  处的酰胺 III 带 C-N 伸缩振动. 巯基的吸收峰一般出现在  $2\ 600\sim 550\ \text{cm}^{-1}$  的范围内,但一般很弱,有时候不出峰. 但在  $1\ 424.5\ \text{cm}^{-1}$  处出现了 S-CH<sub>2</sub> 和  $755.1\ \text{cm}^{-1}$  处的 C-S 特征吸收峰. 综上所述,可以证明目标产物壳聚糖-卡托普利的合成成功。

#### 1.3.2 壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的结构表征

采用一锅法来合成目标化合物,关键是卡托普利赖氨酰中间体能成功合成,采集少量中间体经分离提纯用质谱表征,如图 1 所示. 图 1 的 MS:  $343.8\ [M-1]^+$  证明了卡托普利赖氨酰中间体的成功合成。

由于酰胺键在红外图谱中具有很特征的吸收峰,所以对产物进行了红外表征. 相比于壳聚糖,产物壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的红外图谱最明显的变化就是在  $1\ 683.3\ \text{cm}^{-1}$  处出现了很强的 C=O 伸缩振动吸收峰、 $1\ 635.6\ \text{cm}^{-1}$  处的 N-H 变形振动吸收峰和  $1\ 331.7\ \text{cm}^{-1}$  处的 C-N 伸缩振动吸收峰,这是酰胺的特征吸收峰,表明两种反应物之间发生了酰化反应. 在  $1\ 423.4\ \text{cm}^{-1}$  处出现的 S-CH<sub>2</sub> 和

$751.4\ \text{cm}^{-1}$  处的 C-S 特征吸收峰表明中间体成功接枝到壳聚糖上. 综上所述,可以证明目标产物成功合成。

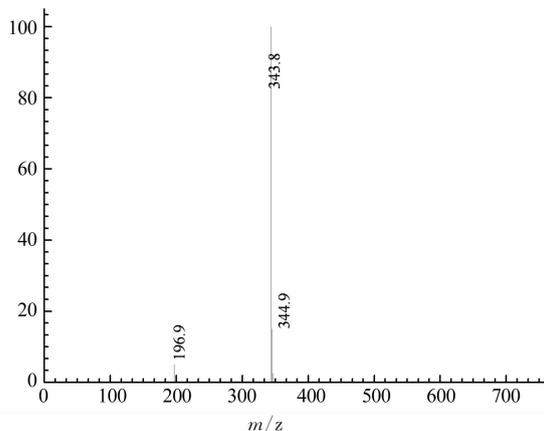


图 1 卡托普利赖氨酸的 MS 图  
Fig. 1 The MS of captopril-lysine

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳聚糖-卡托普利的合成

利用卡托普利的羧基和壳聚糖的氨基之间发生酰化反应,将卡托普利共价连接到壳聚糖上,合成壳聚糖-卡托普利,合成路线如图 2 所示。

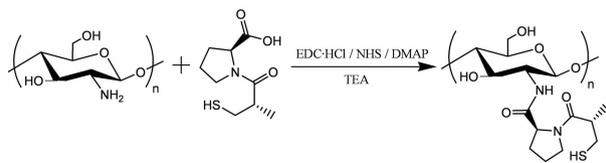


图 2 壳聚糖-卡托普利的合成路线  
Fig. 2 The synthetic route of chitosan-captopril

一般而言,酰化反应都是在室温下进行,本文研究了室温下催化剂、pH 值等条件对壳聚糖-卡托普利合成产率的影响. 当反应液 pH 为 8,室温下反应 24 h,探索了催化剂 (DMAP) 对产率的影响,结果发现当 DMAP 存在时,产率为 40.4%;而 DMAP 不存在时,产率仅为 15.8%. DMAP 对反应速率有很大的影响,这是因为 DMAP 结构上供电子的二甲氨基与吡啶环可以发生共振,能激活吡啶环上的氮原子进行亲核取代,显著地催化高位阻、低反应性的羧酸和胺的酰化反应. 壳聚糖与小分子之间的反应本来就比较困难,一方面是由于壳聚糖在各种溶剂中的溶解度较低,另一方面,大分子与小分子在反应液中碰撞的几率很小,即接触面很小,这也导致反应进程减慢,所以 DMAP 在该反应过程中起到了很关键的活化作用。

由于壳聚糖的溶解度与 pH 有很大的关系,而壳聚糖的溶解度直接影响目标产物的生成,所以本

文探索了 pH 对反应产率的影响,在研究 pH 对反应产率的影响过程中,均以 DMAP 为催化剂,室温下反应 24 h,结果发现:当反应液 pH 为 7 时,产率为 30.6%;pH 为 8 时,产率为 38.8%;pH 为 9 时,产率为 37.4%。当 pH 为 7 时,产率最低,可能是因为中性条件下, $H^+$  和  $OH^-$  浓度最低,催化酰化速率慢,导致产率降低;当 pH 为 9 时,壳聚糖羟基和卡托普利羧基之间的酯化反应速率增大,与酰化反应构成竞争,导致目标产物产率降低。

## 2.2 壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的合成

壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的合成是通过两次酰化反应来实现的,首先合成卡托普利酰赖氨酸中间体,然后再利用中间体的羧基与壳聚糖的氨基之间发生酰化反应,将卡托普利酰赖氨酸共价连接到壳聚糖上,合成路线如图 3 所示。

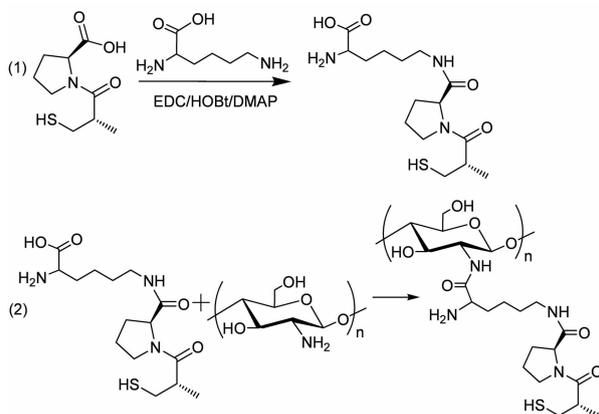


图 3 壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的合成路线

Fig. 3 The synthetic route of chitosan-lysyl-captopril

对卡托普利酰赖氨酸中间体的合成条件进行了优化:25 °C 时,反应时间对产率的影响如图 4 所示。

从图 4 可以看出,反应时间越长,产率越高。但反应 24 h 后继续延长反应时间,产率增大并不明显,且反应 24 h 时的产率也仅为 48.1%,说明直接缩合合成酰胺的反应速率较慢,综合产率和反应时间两个因素,得出最佳反应时间为 24 h。

一般而言,酰化反应都是在碱性的条件下进行的。况且我们用的缩合剂为 EDC 的盐酸盐,所以必须用碱将 N 上的盐酸盐中和掉,使其 N 游离出来,才能进行缩合。为了保证赖氨酸的氨基以游离的状态存在,反应也必须在碱性条件下进行, pH 对反应的影响如图 5 所示。

由图 5 可以看出,最佳 pH 为 8,当 pH=7 时,可能缩合剂的 N 没有被完全游离出来,导致缩合产率很低,当 pH=9~10 时,产率较 pH=8 有降低,但降低幅度并不大,所以弱碱性条件有利于该酰化反应进行,随着碱性增强,逆向水解反应速率逐渐增

大,导致产率降低,所以强碱性条件不利于该反应。

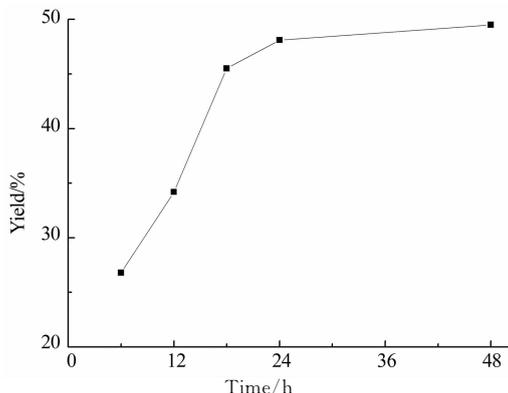


图 4 反应时间对产率的影响(25 °C, pH=8.0)

Fig. 4 Influence of time on yield (25 °C, pH=8.0)

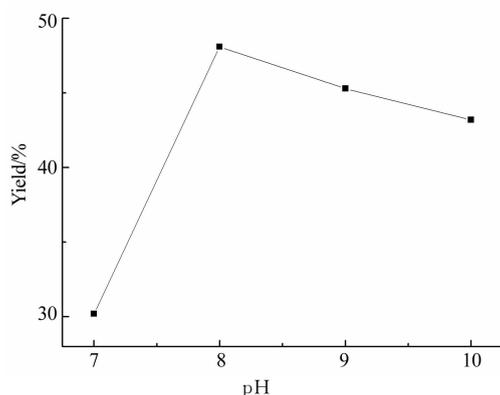


图 5 pH 对产率的影响(25 °C, 24 h)

Fig. 5 Influence of pH on yield (25 °C, 24 h)

## 2.3 体外释药研究

为了模拟小肠和胃液环境,分别采用 PBS 缓冲溶液(pH=7.4)和盐酸-氯化钾缓冲溶液(pH=1.2)作为释放介质。

壳聚糖-卡托普利体外释放实验结果如图 6 所示。由图 6 可知,在 PBS 缓冲液(pH=7.4)中,在 24 h 内,卡托普利的释放呈现良好的线性关系,48 h 以后,累积释药量增幅减小,这主要是因为水解接近平衡所致。在 PBS 缓冲溶液中 72 h 累积释药率为 59.2%。在盐酸-氯化钾介质(pH=1.2)中壳聚糖-卡托普利的释放行为与 PBS 介质中大致相同。在相同时间段的释药速度较快,72 h 的累积释药率达到 78.4%。这是因为酰胺键在强酸性介质中更易水解,况且在酸性介质中,除了化学键的水解释放出药物分子外,还有壳聚糖分子链本身的水解,使药物分子失去了高分子链形成的保护网,加速了酰胺键的水解和水解后药物分子向外扩散,48 h 以后,增加幅度不大。

壳聚糖-赖氨酰-卡托普利体外释放试验结果如图 7 所示。由图 7 可知,在酸性和碱性介质中均具有

很好的缓释效果,在两种介质释放的初始阶段,都没有出现很明显的突释现象.在 pH 为 1.2 的缓冲溶液中,48 h 内,卡托普利的释放呈现良好的线性关系,48 h 以后,累积释药量增幅减小,72 h 的累积释药率为 55.2%.在 PBS 缓冲溶液中,72 h 的累积释药率为 76.4%.

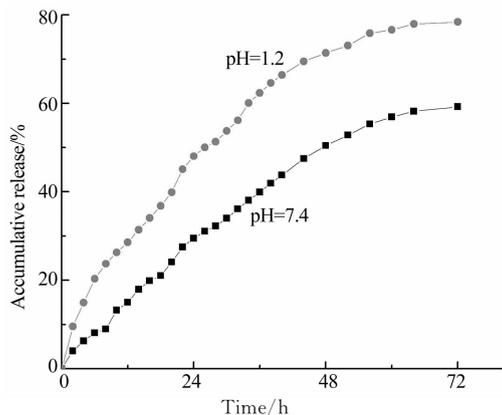


图6 壳聚糖-卡托普利的释药速率

Fig. 6 Accumulative release behavior of Chitosan-captopril

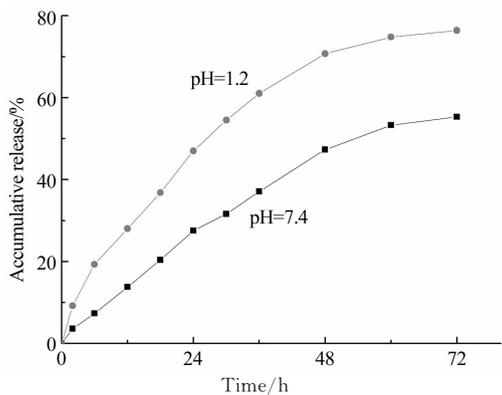


图7 壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的释药速率

Fig. 7 Accumulative release behavior of Chitosan-lysyl-Captopril

比较壳聚糖-卡托普利和壳聚糖-赖氨酰-卡托普利的体外释放,可以看出,两种共价键联缓释载药体系在体外均具有很好的缓释效果,释放的初始阶段并没有出现很明显的突释现象,克服了微球和微胶囊易于出现突释的缺点,同时,也就不会出现“波峰波谷”现象.比较两种缓释体系同时间的累积释药率可以看出,壳聚糖-赖氨酰-卡托普利比壳聚糖-卡托普利的要低,可能是因为化合物增加了一个酰胺键,更不易被水解的原因.

### 3 结论

合成了壳聚糖-卡托普利,产物经红外表征.对合成条件进行了优化,室温下在 pH 为 8,有催化剂 DMAP 存在时,反应 24 h 可得到较高的产率;合成

了卡托普利酰赖氨酸中间体,对中间体的合成条件进行了优化,在 25 °C, pH 为 8 的条件下,反应 24 h 可得到较高的产率,采用质谱对其结构进行表征.再将该中间体对壳聚糖进行修饰,合成了壳聚糖-赖氨酰-卡托普利,产物结构经红外表征.研究了两种载药体系的体外释药性能:壳聚糖-卡托普利在 PBS (pH=7.4) 和 HCl-KCl 缓冲溶液 (pH=1.2) 中 72 h 的累积释药率分别为 59.2% 和 78.4%.壳聚糖-赖氨酰-卡托普利在 PBS (pH=7.4) 和 HCl-KCl 缓冲溶液 (pH=1.2) 中 72 h 的累积释药率分别为 55.2% 和 76.4%.两种载药体系均具有很好的缓释效果,这将有望成为水溶性药物的理想缓释系统.

### 参考文献

- [1] WANG J K, GAO L, LIU Y. Solubility of captopril in 2-propanol, acetone, acetonitrile, methyl acetate, ethyl acetate, and butyl acetate[J]. Journal of Chemical and Engineering Data, 2010, 55: 966-967.
- [2] ASIRI A M, KHAN A P, KHAN A. Spectroscopic investigation on kinetics and mechanistic aspects to electron-transfer process into quinolinium dichromate oxidation of a high blood pressure drug captopril in acidic medium[J]. Journal of Molecular Liquids, 2015, 203: 1-6.
- [3] LEVY M, KOREN G, KLEIN J, et al. Captopril pharmacokinetics, blood pressure response and plasma renin activity in normotensive children with renal scarring[J]. Development of Pharmacology Therapy, 1991, 4: 185-193.
- [4] NUR A O, ZHANG J S. Recent progress in sustained: controlled oral delivery of captopril; an overview[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2000, 194(2): 139-146.
- [5] MANDAL A S, CHATTERJEE S, KUNDU S, et al. In vitro-in vivo correlation and bioavailability studies of captopril from novel controlled release donut shaped tablet[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 421(1): 145-150.
- [6] SAURI J, MILLAN D, SUNE-NEGRE J M, et al. Quality by design approach to understand the physicochemical phenomena involved in controlled release of captopril SR matrix tablets[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 477(1/2): 431-441.
- [7] QU F, ZHU G, HUANG S, et al. Controlled release of captopril by regulating the pore size and morphology of ordered mesoporous silica[J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2006, 92: 1-9.
- [8] KHLIBSUWAN R, PONGJANYAKUL T. Chitosan-clay matrix tablets for sustained-release drug delivery: Effect of chitosan molecular weight and lubricant[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2016, 35: 303-313.
- [9] 陈小华,熊轶娜,汪洁,等.壳聚糖/碳纳米管多孔膜的制备及其吸附与截留性能[J].湖南大学学报(自然科学版),2015, 42(6): 34-40.  
CHEN X H, XIONG Y N, WANG J, et al. Preparation of chitosan/multi-walled carbon nanotubes membrane and its performance of methyl orange adsorption and Cu<sup>2+</sup> rejection[J]. Journal of Hunan University(Natural Sciences), 2015, 42(6): 34-40. (In Chinese)
- [10] AIJALA M, SANTANIEMI M, BLOIGU R, et al. Leptin receptor Arg109 homozygotes display decreased total mortality as well as lower incidence of cardiovascular disease and related death[J]. Gene, 2014, 534: 88-92.