

新型肌酐吸附剂的研究*

于九皋 杨冬芝**

(天津大学理学院 天津 300072)

摘 要 以玉米淀粉和3,5-二硝基苯甲酰氯为原料合成了一种新型肌酐吸附剂并采用红外光谱、元素分析、核磁共振等手段对产物化学结构进行了表征,考察了3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯对肌酐的静态吸附性能,建立了3,5-二硝基苯甲酸与肌酐络合产物的结构模型,初步探索了3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯对肌酐吸附机理.结果表明,3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯对肌酐有较好的吸附性能,吸附在4 h内完成,吸附容量随3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯的取代度的增大而提高;在肌酐溶液浓度为 $0 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,吸附容量亦随肌酐浓度增大而提高;吸附温度从 19°C 升高到 37°C 时,吸附容量呈现降低的趋势;吸附容量随溶液pH值的增长呈现先增加后降低的趋势,在 $\text{pH} = 8$ 左右达到最大;在肌酐溶液浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、吸附温度为 37°C 、介质 $\text{pH} = 7$ 的条件下,3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯对肌酐的最大吸附量达 $25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

关键词 肌酐, 吸附剂, 络合物, 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯

肌酐是尿毒症患者血液中积蓄的主要毒性成分之一,目前临床上降低患者血液中肌酐浓度的方法主要是通过血液透析、血液灌流及口服吸附剂.血液透析虽是目前临床常用的治疗手段,但价格昂贵,普通患者难以承受长期维持性血液透析.血液灌流和口服吸附剂均是通过吸附剂吸附肌酐,降低血液中肌酐浓度,延缓肾衰进程.目前常用的吸附剂主要有吸附树脂和各种包膜活性炭,但二者均是广谱型吸附剂,存在吸附容量低、吸附选择性和生物相容性差等缺点,临床应用效果不甚理想^[1].设计合成新的、对肌酐有特异性吸附作用的亲合型肌酐吸附剂将给尿毒症患者带来新的希望.文献[2~5]报道,苦味酸、3,5-二硝基水杨酸、3,5-二硝基苯甲酸、3,5-二硝基苯甲酰氯等均可与肌酐发生络合反应,形成1:1 σ 络合物.以此类反应为基础,设计合成了以天然高分子为载体的化合物,期望能作为具有肌酐亲合吸附作用的高分子吸附剂.

淀粉是一种高聚糖,主要由葡萄糖基通过 α -D-(1 $\rightarrow$ 4)苷键连接而成.通常,淀粉中含有两种不同的聚合物,即线型聚合物(直链淀粉)和分支型聚合物(支链淀粉).它是一种天然资源,具有无毒、无免疫原性、良好的生物相容性和降解性等诸多独特的性能,在食品、医药、化工、生物学医学工程等领域有广泛的应用价值^[6].因此,本文选择淀粉

为载体,以3,5-二硝基苯甲酰氯为功能基化试剂,合成出新型淀粉衍生物,并研究其对肌酐的吸附性能和吸附机理.

1 实验部分

1.1 原料

淀粉,含直链25%,支链75%(质量百分数),实验前,用异丙醇进行脱蛋白处理,并在 105°C 下干燥过夜,使其水分含量 $< 1\%$;3,5-二硝基苯甲酰氯、吡啶、肌酐、氢氧化钠、盐酸、乙醇、乙醚等均作为分析纯试剂.

1.2 仪器及装置

带有搅拌、控温及加热装置的500 mL三口反应瓶一套;美国Nicolet 170SXFT-IR红外光谱仪;德国Elemental Vavio EL元素分析仪;Varian Unity-Plus 400型核磁共振仪;Philips公司XL30扫描电镜.

1.3 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯(Starch 3,5-dinitrobenzoate, DNBZ-ST)的制备

在三口烧瓶中,加入1 g淀粉和27 mL吡啶,搅拌使淀粉充分分散, 115°C 下活化1 h,调节反应温度至 90°C ,分批加入适量的3,5-二硝基苯甲酰氯进行反应,反应2 h,冷却,产物用无水乙醇沉淀,抽滤后用无水乙醇反复洗涤直至用硝酸银溶液检验无 Cl^- 存在,滤饼经 70°C 真空干燥24 h,即得粉末状3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯约3 g,收率可

达 91%.

1.4 肌酐吸附性能的测定

用蒸馏水配制 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 Ac^- 浓度依次为 132.5、1.0、1.75、0.50、98.0、40.0 mmol/L 的透析液 (pH = 7)^[7]. 再将其配制浓度成浓度为 100 mg/L 的肌酐溶液.

精确称取 0.01 g 干基吸附剂, 加入上述肌酐溶液中, 在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温振荡培养箱进行吸附试验, 用苦味酸法^[8] 测定吸附前后滤液中肌酐浓度, 计算吸附量.

1.5 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯稳定性的测定

将 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯加入到含有肌酐的透析液中, 在 37°C 振荡吸附肌酐 10 h, 过滤出吸附剂, 采用紫外-可见分光光度计检测滤液, 考察 3,5-二硝基苯甲酰基是否脱落.

将 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯放置在密闭的塑料袋中, 室温保存, 在 4、8 及 12 个月时定期测定其对肌酐的吸附量.

2 结果与讨论

2.1 红外谱图分析

通过溴化钾混合压片法, 测试样品的红外光谱, 并与原淀粉进行对比, 发现原淀粉在 $3000 \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ 间有一强吸收峰, 属氢键缔合形成的 O—H 羟基伸缩振动吸收峰, 随着酯化的进行, 这一吸收峰强度逐渐减弱, 且在 1740 cm^{-1} 附近出现酯键 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动的吸收峰, 随着取代度的增加, 这一吸收峰变得尖锐而明显. 此外, 在 1548 、 1346 cm^{-1} 处出现与硝基有关的伸缩振动吸收峰, 及在 3100 、 1600 、 1079 、 719 cm^{-1} 处出现与苯环相关的吸收峰, 说明淀粉的功能基化反应已进行.

2.2 元素分析

淀粉葡萄糖单元上的羟基与 3,5-二硝基苯甲酰氯反应, 反应程度可以用取代度 (DS) 来表示. 取代度是淀粉分子中每个葡萄糖单元上的羟基被取代的程度, 即一个葡萄糖单元上含有取代基的平均数目.

样品在 100°C 干燥 24 h 后, 测定 C、H、N 3 种元素含量, 通过 N 元素含量计算样品的取代度, 计算公式如下:

$$DS = 162 \times N(\%) / [28 \sim 194 \times N(\%)]$$

2.3 ^{13}C -NMR 谱图分析

受样品溶解性的限制, 难以得到满意的液体核磁谱图, 另外, 由于固体中核所受的各向异性作

用常包含许多重要信息, 故我们选择原淀粉及其酯化产物, 以脉冲序列实现交叉极化结合魔角旋转方法, 消除旋转边带, 采用 Varian Unity-Plus 400 核磁共振仪对样品进行 ^{13}C -NMR 分析, 获得了较清晰的固体图谱, 如图 1 所示.

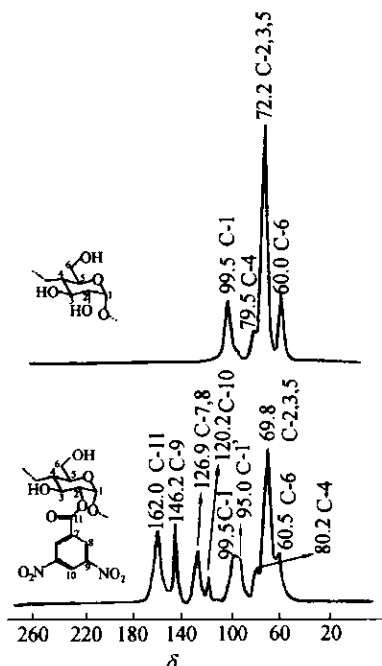


Fig. 1 ^{13}C -NMR spectra of starch and (DNBZ-SD) (Degree of substitution = 0.54)

对于原淀粉, 在 $\delta = 99.5$ 、 79.5 、 72.2 、 60.0 处分别出现核磁共振信号峰, 依次归属于 C-1、C-4、C-2,3,5 及 C-6, 由于 C-2、C-3 与 C-5 化学位移十分相近, 因此, 在固体核磁共振谱图中, 无法将其一一分开, 只表现为一个较宽的信号.

与原淀粉相比, 由于部分羟基被 3,5-二硝基苯甲酰基取代, 取代度为 0.54 的酯化淀粉的核磁谱图, δ 在 126.9、146.2、120.2 及 162.0 处分别对应于 C-7,8、C-9、C-10 和 C-11 出现新的信号峰. 此外, C-1 受 O-2 位酯化反应影响, 吸收峰发生了裂分, 除在 99.5 仍存在 C-1 吸收峰外, 在 95.0 处出现了 C-1' 吸收峰, 二者化学位移之差 4.5, 说明在 O-2 位上有部分羟基发生了明显的酯化反应, C-2' 信号和 C-2,3,5 同时出现在 69.8 附近; C-6 与 C-4 信号峰分别出现在 60.5 和 80.2, 与酯化前相比, 化学位移分别 0.5 和 0.7, 与 C-1' 相比, C-6 及 C-4 化学位移不明显, 说明在 O-6 位及 O-3 位没有或只有轻微的酯化反应.

据上述分析, 可以确定对于取代度为 0.54 的

3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯, O-2 位发生了明显的酯化反应.

2.4 肌酐吸附实验

在肌酐溶液浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、吸附温度为 37°C 、介质 $\text{pH}=7$ 的条件下, 吸附时间为 4 h , 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯 ($DS=2.09$) 对肌酐的吸附量可达 $25\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 如表 1 所示. 随着吸附剂中 3,5-二硝基苯甲酰基含量增加, 其对肌酐的吸附量也增加, 但二者并不完全是正比关系, 这一结果也提示我们, 要象酶或受体那样一个结合点吸附一分子底物, 是不可能的, 但提高吸附剂的功能基化程度, 有可能使吸附效果增强.

Table 1 Adsorption capacity of 3,5-dinitrobenzoic acid ester of starch with different degree of substitution (DS)

No	DS	Elemental analysis			Adsorption capacity ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
		C%	H%	N%	
1	0.10	44.32	5.66	1.54	10.7
2	0.54	41.01	5.18	5.68	15.0
3	2.09	42.66	3.04	10.32	25.0

2.4.1 吸附剂对肌酐的吸附动力学 由于 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯对肌酐有较好的吸附性能, 故进一步研究它对肌酐的吸附动力学. 从图 2 中可以看出, 在 1 h 内肌酐吸附量增加很快, 吸附在 4 h 时已基本达到平衡.

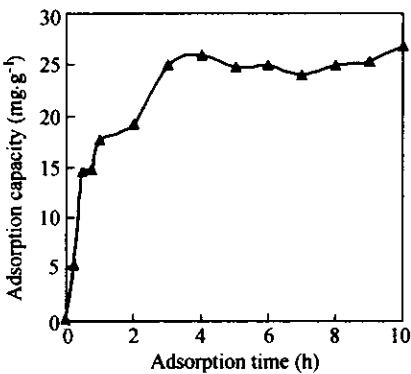


Fig. 2 Adsorption dynamics curves of DNBZ-ST with DS 2.09 at 37°C , $\text{pH}=7.0$ and creatinine concentration $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

2.4.2 吸附剂对肌酐的吸附等温线 准确称取一组重量相同的吸附剂, 测定它们在不同肌酐浓度的溶液中的吸附量, 如图 3, 吸附等温线的形状类似于 Langmuir 吸附模型. 吸附剂对肌酐的吸附量随后者浓度的增加而增大. 在浓度为 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 吸附基本达到饱和, 饱和吸附量约为 60

$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 即 $530\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.

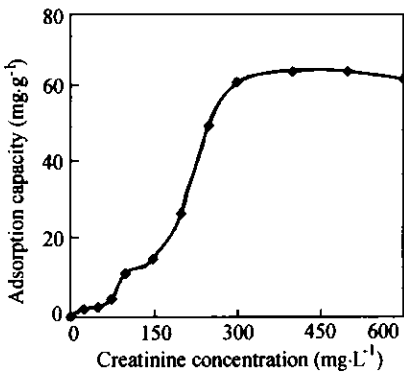


Fig. 3 Adsorption isotherm of DNBZ-ST with DS 0.54 at 37°C , $\text{pH}=7.0$ and adsorption time 4 h

2.4.3 溶液 pH 值对吸附量的影响 如图 4 所示, 在不同 pH 值条件下, 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯对肌酐的吸附量有较大差异, 在 $\text{pH}=4\sim 8$ 范围内, 随着 pH 值的增高, 吸附量明显增加, 这可能是由于碱性增强, 可以加速肌酐与 3,5-二硝基苯甲酰基之间的络合反应, 进而提高吸附量; 当溶液 $\text{pH}>9$ 时, 肌酐吸附量反而下降, 可能是由于 3,5-二硝基苯甲酰基与淀粉以酯键结合, 继续增加碱性, 吸附剂部分水解, 功能基脱落, 肌酐吸附量下降.

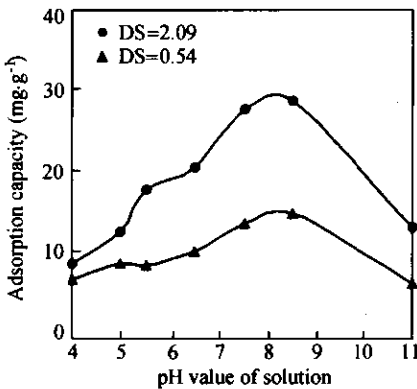


Fig. 4 Influence of pH on the adsorption capacity at 37°C , adsorption time 4 h and creatinine concentration $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

2.4.4 温度对肌酐吸附量的影响 如图 5 所示, 在 $19\sim 37^\circ\text{C}$ 范围内, 随着温度的升高, 吸附量降低, 说明该吸附过程可能为放热过程, 温度升高对吸附不利.

2.5 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯的稳定性

2.5.1 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯在透析液中的

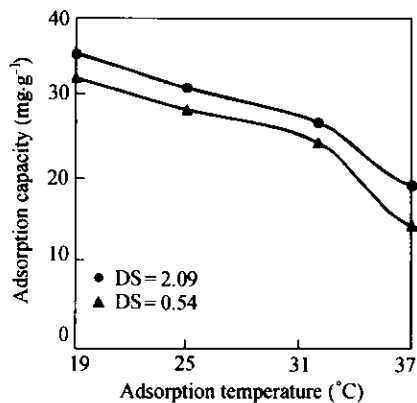


Fig. 5 Influence of temperature on the adsorption capacity at pH = 7.0, creatinine concentration 100 mg·L⁻¹ and adsorption time 4 h

稳定性 采用紫外-可见分光光度计检验 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯振荡吸附肌酐 10 h 后的滤液,结果表明除在 234 nm 附近肌酐的吸收峰外,未发现任何吸收峰,说明没有带有苯环的物质脱落,在 37℃ 条件下,3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯在透析液中是稳定的.

2.5.2 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯的室温放置稳定性 室温下,3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯在密闭的塑料袋中保存 4、8 及 12 个月后,其对肌酐的吸附量分别为 24.8、25.3 及 24.9 mg·g⁻¹,与放置

前(25.0 mg·g⁻¹)相比,只有微小的变化,这也有可能是测量误差造成的.因此,作者认为,本文合成的 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯是较稳定的,在室温放置过程中,3,5-二硝基苯甲酰基是不会脱落的.

2.6 吸附机理

2.6.1 3,5-二硝基苯甲酸与肌酐的络合反应机理 文献报道^[9],在水溶液或乙醇溶液中,3,5-二硝基苯甲酸可与肌酐发生络合反应生成形成紫色络合物,产物在可见光区存在明显吸收峰,通过极谱研究证实该反应与苦味酸与肌酐的反应机理很相似,但关于 3,5-二硝基苯甲酸与肌酐反应形成的具体络合物结构模型,鲜见报道.

苦味酸与肌酐反应已被广泛用于临床检测血液中肌酐浓度,对于反应形成络合物的机理,文献有较多报道^[10-12],其中大部分研究认为,肌酐分子中—CH₂—上的质子较活泼,易失去一个质子形成—O⁻离子结构,尤其在碱性条件下,这一变化更加明显;含—O⁻离子的肌酐分子被苦味酸硝基 N 原子上正电荷所吸引,之后肌酐分子中的亚甲基上的 C 原子快速进攻硝基苯环间位形成络合物,由于两个硝基对体积较大的肌酐分子产生立构位阻,因此,该络合物有 8 种异构体.

本文模拟苦味酸与肌酐形成 1:1σ 络合物的

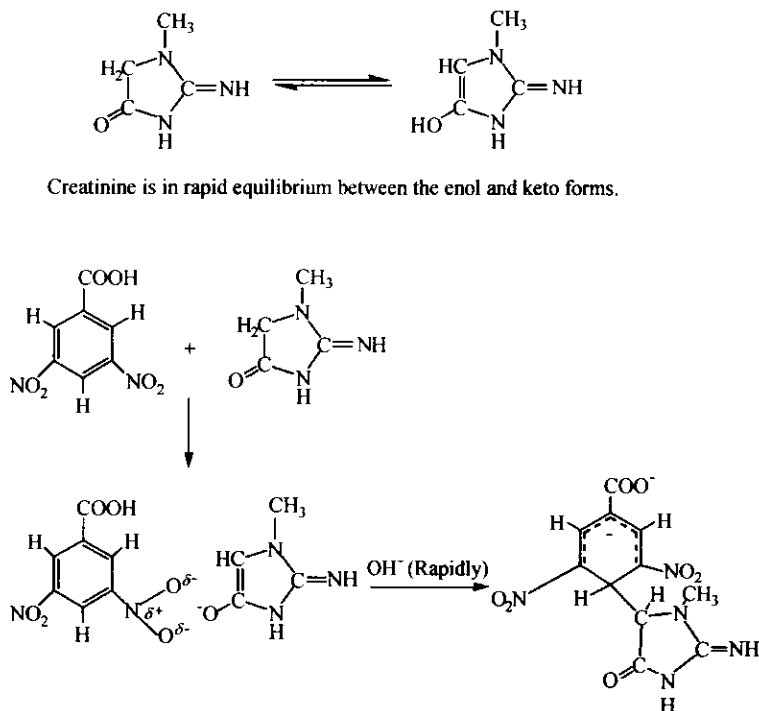


Fig. 6 Complex of 3,5-dinitrobenzoic acid with creatinine

结构模型,建立了 3,5-二硝基苯甲酸与肌酐发生络合反应形成产物的结构模型(图 6),并通过¹H-NMR 谱进行了验证(¹H-NMR 谱图略)。

2.6.2 吸附产物的谱图分析 测定了 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯吸附肌酐前后的红外光谱和紫外可见光谱。对照 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯吸附肌酐前后的红外光谱(图 7a,b),在 400~800 cm⁻¹ 区间,吸附产物的谱图与肌酐(图 7c)十分相似;但吸附产物的红外谱图并不是 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯与肌酐谱图的简单加和,由于肌酐吸附在 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯上,导致在 1405 cm⁻¹、1440 cm⁻¹及 952 cm⁻¹处出现了新的吸收峰,说明二者不是以简单的混合物形式存在。

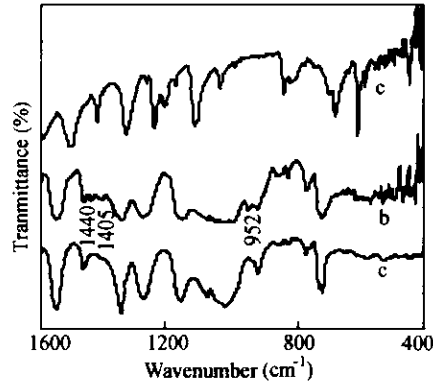


Fig. 7 The comparison of IR of samples
a) DNBZ-ST; b) DNBZ-ST-Creatinine; c) Creatinine

以二甲亚砜为溶剂,测试了 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯吸附肌酐后的紫外-可见光谱,并与吸附前对照,如图 8 所示。原淀粉分子中无产生电子跃迁的发色团,因此在整个紫外-可见光区无吸收(图 8a);3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯的分子中含有苯环,受紫外-可见光照射后,可产生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁,因此,在 262 nm 附近产生一个明显的吸收峰

(图 8c);肌酐分子中存在 C=O 及 C=N 双键的共轭体系,并有一-NH₂ 助色团的存在,因此,在 234 及 215 nm 处各存在一吸收峰,分别属于 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁及 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁(图 8b);当 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯吸附肌酐后,除在 262 nm 处仍存在取代苯环的吸收峰外,在 340~460 nm 及 510~660 nm 区间分别产生一新的较宽吸收峰,最高峰位分别位于 383 nm 及 586 nm(图 8d),推断这两个吸收峰很可能是肌酐与吸附剂中部分 3,5-二硝基苯甲酰基发生了络合作用而产生。

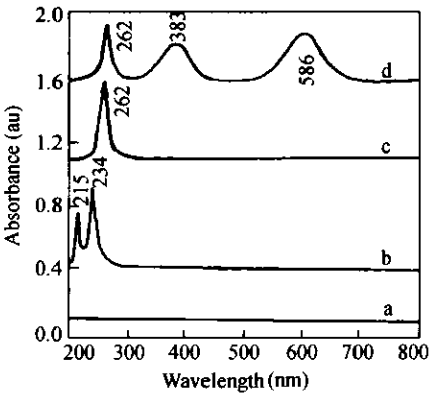


Fig. 8 UV-Vis spectra of samples
a) Starch; b) Creatinine; c) DNBZ-ST; d) Adsorption product

从红外光谱及紫外-可见光谱虽无法验证吸附产物的具体结构,但可以确认溶液中的 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯与肌酐之间的确有某种化学反应产生,这无疑为研制特异性肌酐吸附剂提供了基础。

以上研究表明,以淀粉为载体的 3,5-二硝基苯甲酸淀粉酯对肌酐有较好的吸附性能,具有一定的应用前景,但要作为临床应用,则有许多问题(如吸附剂在体液中的稳定性、吸附选择性等)亟待进一步研究。

REFERENCES

- 1 Koide K, Sano M. *Biomater Art Cells & Immob Biotech*, 1985, 19(1): 147 ~ 166
- 2 Kohashi K, Tsuruta Y, Yamaguchi M, Ohkura Y. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27(9): 2122 ~ 2129
- 3 Parekh A C. *Clinica Chimica*, 1976, 73: 221 ~ 231
- 4 Blass K G, Thibert R J. *Microchemical Journal*, 1974, 19(1): 11 ~ 17
- 5 John Vasillades. *Clin Chem*, 1976, 22(10): 1664 ~ 1671
- 6 Zhang Litian(张力田). *Modified Starch(变性淀粉)*. Guangzhou(广州): South China University Press(华南理工大学出版社), 1992. 8
- 7 Hospital Attached to Tianjin Medical College(天津医学院附属医院编). *Acute Disease of Internal Medicine(内科急症)*. Tianjin(天津): Tianjin People's Publication(天津人民出版社), 1977. 406 ~ 407
- 8 Jaffe M. *Physiol Z Chem*, 1886, 10: 391
- 9 Benedict S R, Behre J A. *J Biol Chem*, 1936, 114: 515 ~ 532
- 10 Blass K G. *Clinical Biochemistry*, 2000, 33(3): 225 ~ 242
- 11 Butler A R. *Clinica Chimica Acta*, 1975, 59(2): 227 ~ 232
- 12 Kohashi K, Tsuruta Y. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27(9): 2122 ~ 2129

STUDY ON A NEW ADSORBENT FOR CREATININE

YU Jiugao, YANG Dongzhi

(School of Science, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract A new adsorbent for creatinine by starch esterification with 3,5-dinitrobenzoyl chloride DNBZ-ST was prepared. The chemical structures of DNBZ-ST products were characterized by FTIR, elemental analysis and ^{13}C -NMR. The adsorption properties of DNBZ-ST for creatinine were examined. A structure model of complex of 3,5-dinitrobenzoic acid with creatinine was proposed, and the adsorption mechanism was explored fundamentally. Results showed that starch 3,5-dinitrobenzoate has good adsorption properties. The adsorption is complete in 4 h. The adsorption capacity increases with the degree of substitution of adsorbent, as well as with the creatinine concentration. However, the concentration has no apparent effect on adsorption capacity, when the creatinine concentration is higher than $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The adsorption capacity decreases with temperature in the range from 19°C to 37°C . The adsorption capacity first increases and then decreases with the increase of the pH value and has a maximum around $\text{pH} = 8$. The adsorption capacity may reach $\sim 25\text{ mg}$ of creatinine per gram of adsorbent at 37°C , $\text{pH} = 7$ and a creatinine concentration of $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words Creatinine, Adsorbent, Complex, Starch 3,5-dinitrobenzoate