

N-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖的合成、 表征及其水凝胶的 pH 敏感性

林友文, 陈 庆, 罗红斌
(福建医科大学药学院, 福州 350004)

摘要 通过两步反应合成了水溶性的 *N*-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖(SBCS), 用 IR, ¹H NMR 和 UV-Vis 谱对产物的结构进行了表征. 用胶体滴定法测定了 N 上 2-磺酸基苯甲基的取代度. 以戊二醛为交联剂制备了 *N*-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖水凝胶(SBCSG), 考察了凝胶在不同 pH 值缓冲溶液中的溶胀行为. 实验结果表明, SBCSG 溶胀度随着凝胶交联度的增大而减小. 在碱性介质中 SBCSG 的溶胀度显著增大, 而在酸性介质中溶胀度显著减小, 在 pH = 5.0 缓冲液中的溶胀度达到最小值. SBCSG 在碱性介质中的溶胀度随着侧链 N 上 2-磺酸基苯甲基取代度增大而增大. 在 pH = 7.4 的人工肠液和 pH = 1.0 的人工胃液中 SBCSG 的溶胀-收缩具有可逆性, 显示出良好的 pH 敏感性. 有望作为 pH 敏感口服结肠定位给药系统药物载体.

关键词 壳聚糖; 改性; pH 敏感性; 水凝胶; 溶胀度

中图分类号 O631

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)01-0183-05

pH 敏感性凝胶材料广泛应用于生物工程、药物控制释放、仿生智能材料等领域^[1~3]. 近年来, pH 敏感性口服结肠定位给药系统已成为新剂型开发研究的热点^[4,5], 寻找具有 pH 敏感性的生物可降解材料是药物新剂型研发的重要组成部分. 目前有关敏感性水凝胶的研究主要以聚丙烯酸类高分子为基础^[1], 对天然高分子聚电解质及其改性物 pH 敏感性水凝胶的研究也有报道^[6,7]. 壳聚糖(CS)具有良好的生物相容性和生物可降解性, 在生物医用材料、药物制剂等领域的应用日趋广泛^[8~10]. 壳聚糖分子内—NH₂与 H⁺结合或解离, 表现出明显的 pH 敏感性. 但壳聚糖只溶于酸中, 大大限制了其应用范围.

本文合成了水溶性的 *N*-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖, 在其侧链引入酸性磺酸基及疏水性芳环, 既保留壳聚糖的优点, 又改善了壳聚糖的水溶性. 以胶体滴定法测定 N 上 2-磺酸基苯甲基的取代度. 利用戊二醛交联制备 *N*-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖水凝胶, 考察了系列凝胶在不同 pH 值缓冲液中的溶胀特点及凝胶交联度、侧链酸性基团取代度等对凝胶 pH 敏感溶胀性能的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

壳聚糖(大连鑫蝶甲壳素有限公司, 脱乙酰度 92.8%); 邻醛基苯磺酸(Fluka 公司); 质量分数为 25% 的戊二醛及 NaBH₄(上海化学试剂公司); 聚乙烯醇硫酸钾(PVSK)、聚-*N,N'*-二烯丙基二甲基氯化铵(PDMAAC)及甲苯胺蓝(日本和光纯药工业株式会社); pH = 1.0 溶液由 KCl 和 HCl 配制, pH = 3.0 和 pH = 5.0 缓冲液由 Na₂HPO₄ 和柠檬酸配制, pH = 7.4 缓冲液由 Na₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄ 配制, pH = 9.0 缓冲液由甘氨酸和氢氧化钠配制, 其离子强度均为 0.15. 其它试剂均为分析纯.

美国 Nicolet Magna 750 FTIR 红外光谱仪(KBr 压片); 美国 Varian Unity 500 型核磁共振谱仪(DSS 为内标, D₂O 为溶剂); 752PC Spectrum 紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); FD-1 冷冻干燥机(北京博医康技术公司); Sartorius AG 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司).

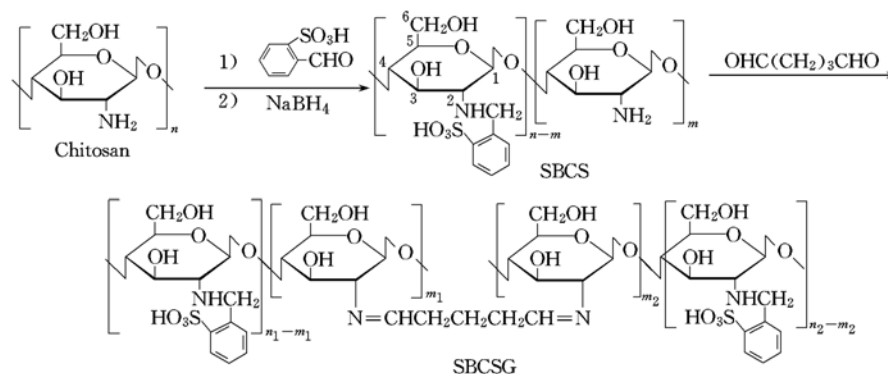
收稿日期: 2006-05-10.

基金项目: 福建省自然科学基金(批准号: C0310024)和福建省教育厅科研经费(批准号: K04056)资助.

联系人简介: 林友文(1966 年出生), 男, 硕士, 副教授, 主要从事壳聚糖改性及应用研究. E-mail: Linhumor@sina.com

1.2 *N*-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖(SBCS)的合成

合成路线见 Scheme 1. 将 2.0 g 壳聚糖溶于 250 mL 体积分数为 0.7% 的醋酸溶液中, 30 min 内逐滴加入溶有 4.1 g (0.024 mol) 邻醛基苯磺酸的 20 mL 乙醇溶液. 用水浴加热搅拌反应一定时间后, 冷至室温, 逐滴加入溶有 1.2 g NaBH_4 的 15 mL 水溶液, 于室温搅拌反应 2 h. 反应完毕后加入大量的甲醇, 析出沉淀, 过滤, 固体用丙酮浸泡 24 h 后过滤, 得纤维状浅黄色固体.



Scheme 1 Synthetic routes of modified chitosan and hydrogel

1.3 *N*上 2-磺酸基苯甲基取代度的测定

按文献[11]方法配制质量分数约 0.02% 的 SBCS 稀溶液. 准确移取 5 mL 溶液于锥形瓶中, 加入 1.0 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液和 10 mL PDMDAAC 标准溶液, 摇匀后加入 1 滴甲苯胺蓝(质量分数为 0.1% 的水溶液)指示剂, 以 PVSK 标准溶液滴定, 当溶液由蓝色变成紫红色(10 s 内不返色)即为终点, 记录 PVSK 的体积 V_1 (mL) (取 3 次滴定的平均值), 准确移取 5 mL 蒸馏水, 作空白滴定, 直至终点, 记录 PVSK 的体积 V_2 (mL) (取 3 次滴定的平均值). 计算每克样品中磺酸基含量: $\text{DS} = c \cdot (V_2 - V_1) \cdot 10^{-2} / w$, 式中 c 为 PVSK 标准溶液浓度 (mmol/L), w 为 SBCS 样品质量 (g).

1.4 *N*-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖水凝胶(SBCSG)的制备及其溶胀度的测定

称取一定量的 SBCS, 用蒸馏水配成质量分数 1.2% 的溶液, 每份取 15 mL 置于直径为 7.5 cm 的培养皿中, 搅拌下加入一定量的质量分数为 1% 的戊二醛溶液, 搅匀放置成膜后, 于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 速冻, 第二天进行真空冷冻干燥得多孔的干凝胶. 参照文献[2]方法测定溶胀度. 称取一定量的干凝胶膜(1 cm \times 1 cm)置于不同 pH 值的缓冲溶液中, 隔一定时间后取出, 用滤纸轻轻吸去其表面水分后称重, 按下式计算溶胀度: $\text{SR} = (W_1 - W_0) / W_0$, 式中 W_1 为溶胀后凝胶的总质量 (g), W_0 为溶胀前的干凝胶质量 (g).

2 结果与讨论

2.1 合成路线及 *N*上 2-磺酸基苯甲基的取代度

实验发现, 在室温下提高反应物 CHO/ NH_2 投料摩尔比, 产物的取代度并不明显提高. 其可能的原因是在胶状溶液中高分子链相互缠绕, 造成对氨基的空间位阻增大, 醛基和氨基不能充分接触. 当提高反应温度并延长反应时间时, 取代度明显提高(表 1). 胶体滴定是以聚阴、阳离子之间迅速的化学计量反应为基础的微量容量分析方法, 也称为高分子电解质滴定^[12]. 本文在强碱性条件下 ($\text{pH} = 12$), 使 $-\text{SO}_3\text{H}$ 解离带负电荷, 加过量聚阳离子反应后, 再用聚阴离子 PVSK 标准溶液滴定剩余的聚阳离子, 可方便地定量测定产物中磺酸基含量, 以表示产物的取代度.

Table 1 Conditions and results of the reactions of the modified chitosan^a

Sample	$n(\text{CHO}) : n(\text{NH}_2)$	Temperature/ $^\circ\text{C}$	t/h	DS ^b / (mmol \cdot g ⁻¹)	Sample	$n(\text{CHO}) : n(\text{NH}_2)$	Temperature/ $^\circ\text{C}$	t/h	DS ^b / (mmol \cdot g ⁻¹)
1	1:1	25	3	1.52	4	2:1	50	3	2.27
2	1.5:1	25	3	1.54	5	2:1	50	5	2.66
3	2:1	25	3	1.71					

a. The reduction by 1.2 g NaBH_4 for 2 h at room temperature; b. degree of substitution of *N*-2-sulfobenzyl determined by colloid titration.

2.2 壳聚糖及其衍生物的表征

图 1 是 CS 及其衍生物 SBCS 的红外光谱图, 与 CS 的 IR 图比较, SBCS 的 IR 图中出现了新的 767, 706 和 620 cm^{-1} 吸收峰, 为多取代苯环的 C—H 面外弯曲振动特征吸收峰, 1593 和 1440 cm^{-1} 为苯环 C—C 骨架振动的特征吸收峰, 说明有苯环的存在; 而在 1340 cm^{-1} 附近的强吸收峰为 C—N 振动的特征吸收峰, 表明在壳聚糖中 C2 的氨基上发生取代, 生成了 *N*-(2-磺酸基苯甲基)壳聚糖. 与 CS 比较, SBCS 的紫外-可见光谱(图 2)中出现了苯环的特征吸收谱带. 由于磺酸基中的 π 键可与苯环发生 π - π 共轭, 使吸收峰红移, $\lambda_{\text{max}} = 204, 217 \text{ nm}$, 分别为苯环的 π - π^* 跃迁所致的 E_1 带和 E_2 带吸收; 而 $\lambda_{\text{max}} = 262 \text{ nm}$ 的吸收峰为连有磺酸基的苯环 π - π^* 跃迁(B 带)的特征吸收峰, 证明在 CS 的侧链上引入了苯环. 图 3 为 CS(D_2O 中加 1 滴 DCl 为溶剂)及 SBCS 的 ^1H NMR 谱图. $\delta 5.035$ 为吡喃糖苷环 C2, C3, C4, C5 和 C6 上质子的吸收峰, $\delta 2.222$ 为 CS 中残留的少量乙酰基上质子的吸收峰^[13]. SBCS 的 ^1H NMR 谱图中, $\delta 4.368 \sim 4.787$ 为吡喃糖苷环 C3, C4, C5 和 C6 上质子的吸收峰, 而新出现的质子信号在 $\delta 7.447 \sim 7.897$ 为苯环上质子的吸收峰, $\delta 2.691$ 是 C2 上质子的吸收峰, $\delta 3.675$ 为苯基中 $-\text{CH}_2-$ 质子的吸收峰^[14], 进一步证实了 SBCS 的结构. 在 CS 分子的侧链引进取代基可使其分子中的氢键作用削弱, 晶体结构受到破坏, 分子呈松散状态, 利于水分子与亲水性基团如 $-\text{OH}$ 和 $-\text{SO}_3\text{H}$ 等接近, 从而改善壳聚糖衍生物在水中的溶解性.

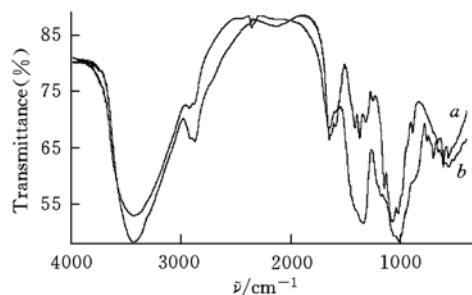


Fig. 1 IR spectra of SBCS(a) and CS(b)

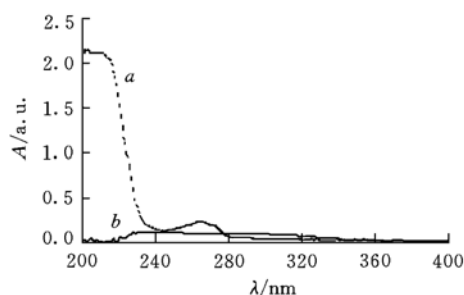


Fig. 2 UV-Vis spectra of SBCS(a) and CS(b)

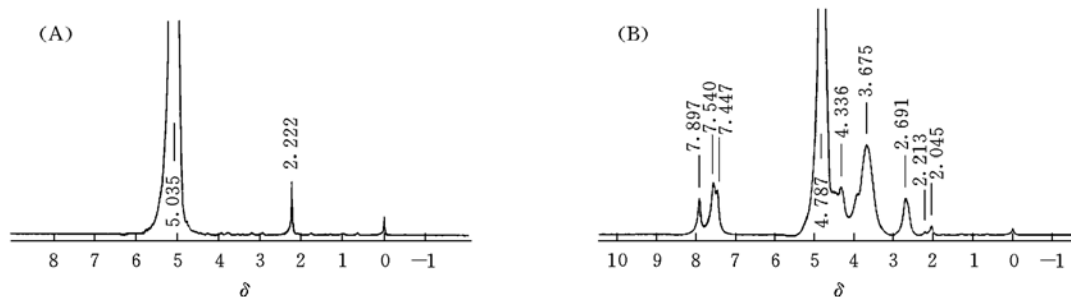


Fig. 3 ^1H NMR spectra of CS(A) and SBCS(B)

2.3 SBCSG 在不同 pH 值缓冲溶液中的溶胀特点

SBCS 是两性聚电解质, 水凝胶中存在如 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{SO}_3\text{H}$ 等极性基团, 在不同 pH 值的溶液中其离子化程度不同, 带电基团的静电作用、氢键及侧链基团亲水性也有所不同, 显示出不同的溶胀性能. SBCSG(不同凝胶的制备及编号见表 2)在不同 pH 值缓冲溶液中的溶胀实验结果见图 4, 其溶胀行为具有明显的 pH 敏感性. SBCSG 在 $\text{pH} = 9.0$ 的缓冲溶液中的溶胀度最大, pH 值减小溶胀度亦减小. 因为磺酸为较强的有机酸, $-\text{SO}_3\text{H}$ 在碱性介质中解离成负离子, 是凝胶带电荷的主要基团, 根据 Donnan

Table 2 Feed condition of a series of hydrogels

Sample	1.2% Solution of sample*	DS/($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	V(1% Glutaraldehyde)/mL	Sample	1.2% Solution of sample*	DS/($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	V(1% Glutaraldehyde)/mL
SBCSG1	SBCS	2.66	0.2	SBCSG4	SBCS	2.27	0.4
SBCSG2	SBCS	2.66	0.4	SBCSG5	SBCS	1.71	0.4
SBCSG3	SBCS	2.66	0.6	CSG	CS	0	0.4

* Samples of SBCS were dissolved in aqueous solutions, CS was dissolved in 0.7% acetic acid solution.

平衡理论, 凝胶的溶胀主要是由凝胶内外自由离子浓度差产生的渗透压决定的^[15], 碱性越强, 凝胶内部 $-\text{SO}_3^-$ 浓度越大, 凝胶内外自由离子浓度的差值也越大, 由此产生的渗透压使凝胶吸水溶胀.

随着 pH 值减小, $-\text{SO}_3\text{H}$ 的解离度逐渐减小, 水凝胶内自由离子 $-\text{SO}_3^-$ 浓度减少, 凝胶内渗透压也减小, 所以 SBCSG 的溶胀度逐渐减小(图 4). 同时随着 pH 值进一步减小, 壳聚糖分子中侧链部分残留的 $-\text{NH}_2$ 质子化为 $-\text{NH}_3^+$, 当与 $-\text{SO}_3^-$ 离子数目接近时, 正负电荷之间静电作用增强, SBCSG 的溶胀度逐渐趋于最小值. 实验结果证实在 pH = 5 时, SBCSG 的溶胀度最小, 可认为在 pH = 5.0 附近为 SBCSG 的等电点. 水凝胶在 pH = 1.0 ~ 3.0 时的溶胀度略微增大, 这是因为在强酸性介质中 $-\text{SO}_3\text{H}$ 的解离完全受到抑制, 而 $-\text{NH}_3^+$ 的数量有所增加使溶胀度略微增大. 此外凝胶的溶胀还与凝胶内的氢键、范德华力、疏水作用和静电相互作用等分子间相互作用的微弱不平衡有关^[16].

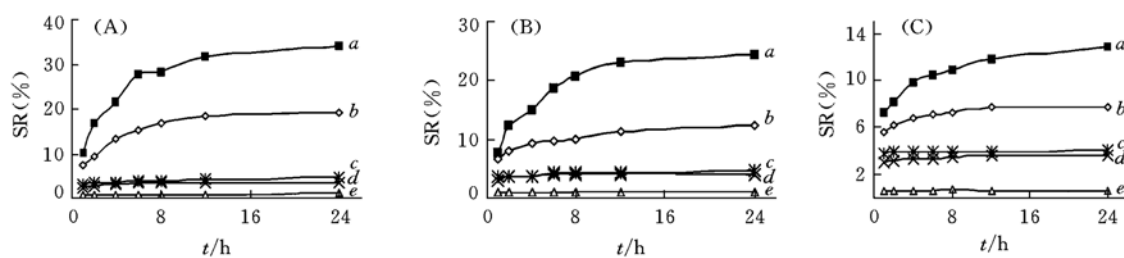


Fig. 4 Swelling ratio behavior of SBCSG in different buffer solutions

(A) SBCSG1; (B) SBCSG2; (C) SBCSG3. a. pH=9.0; b. pH=7.4; c. pH=1.0; d. pH=3.0; e. pH=5.0.

2.4 交联度和 N 上 2-磺酸基苯甲基取代度对凝胶溶胀度的影响

随着交联剂用量增加, 凝胶的交联度提高, 不利于水分子向内渗透, 从而使 SBCSG 的溶胀度逐渐减小(图 4). 实验结果表明, 不同交联度的 SBCSG 在 pH = 1.0 ~ 5.0 之间溶胀度均较小且差别微小, 而在碱性介质中不同交联度 SBCSG 之间的溶胀度显著增大, 溶胀度的差别逐渐增大, 表明可通过调节交联剂用量, 改变凝胶网络交联度来调控 SBCSG 在碱性介质中的溶胀度. 不同交联度的 SBCSG 达到溶胀平衡的时间(24 h)较文献[10, 17]报道的 2 ~ 5 d 短, 可能是因为本实验采用冷冻干燥方法制备干燥凝胶膜的多孔海绵状结构有利于水分子向凝胶内部快速渗透, 使凝胶较快达到溶胀平衡^[18]. 不同取代度的 SBCSG 和 CSG 在不同 pH 值缓冲溶液中(24 h)的溶胀特点见图 5. 侧链氨基是壳聚糖 pH 敏感性的主要基团, $-\text{NH}_2$ 质子化与溶液的酸性强弱相关, CSG 在酸性介质中随酸性减弱溶胀度逐渐变小. 在碱性介质中, 氨基以游离状态存在, 而且氢键作用增强, 所以在中性或碱性介质中 CSG 几乎不溶胀. SBCSG 在碱性介质中的溶胀度随着侧链 N 上 2-磺酸基苯甲基取代度增大而增大, 可见引入酸性较强的 $-\text{SO}_3\text{H}$ 改善了壳聚糖的溶解性能, 替代氨基成为 pH 敏感的主要基团. 在酸性介质中, 随侧链 N 上 2-磺酸基苯甲基取代度增大溶胀度减小, 但不同取代度的 SBCSG 之间溶胀度差别不大.

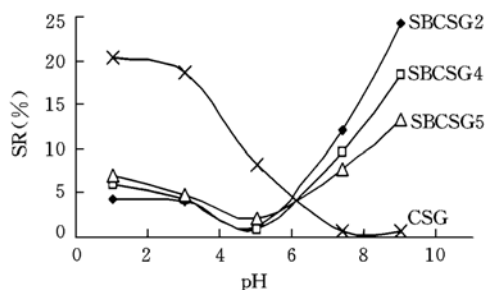


Fig. 5 Swelling characteristics of the SBCSG with different DS and CSG in different buffer solutions for 24 h

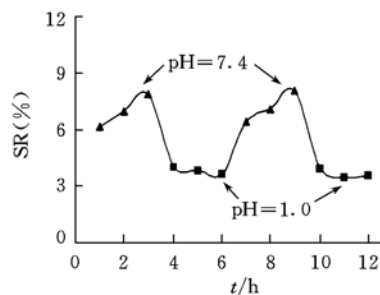


Fig. 6 Swelling reversibility of the SBCSG2 in pH = 1.0 and pH = 7.4 buffer solutions

2.5 SBCSG 凝胶溶胀的可逆性能

将 SBCSG2 反复在 pH = 1.0 的人工胃液和 pH = 7.4 的人工肠液中交替浸泡, 发现 SBCSG2 不但表现出明显的 pH 敏感性, 且凝胶溶胀-收缩具有良好的可逆性(图 6). 凝胶在一定范围内($\text{pH} \geq 7.4$)溶胀度随介质酸碱性的改变显著溶胀的敏感性质, 可应用于设计口服结肠定位给药系统, 把药物包埋于

凝胶网络中,利用结肠的特殊酸碱环境($\text{pH} = 6.5 \sim 7.5$),通过 pH 敏感性凝胶的溶胀使包埋药物达到临界 pH 时有效释放,对于多肽蛋白类等口服给药易被胃酸破坏和酶解的药物,可有效地提高其生物利用率. SBCS 有望作为药物载体用于开发具有 pH 敏感性的口服结肠定位给药系统.

参 考 文 献

- [1] LI Gui-Ying(李桂英), AN Ying-Li(安英丽), HE Zhen-Ping(何振平), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(5): 956—960
- [2] Li F., Liu W. G., Yao K. D.. Biomaterials[J], 2002, **23**(2): 343—347
- [3] Shu X. Z., Zhu K. J., Song W. H.. Int. J. Pharm. [J], 2001, **212**(1): 19—28
- [4] Vandamme T. F., Lenourry A., Charrueau C., *et al.*. Carbohydrate Polymers[J], 2002, **48**(3): 19—231
- [5] Gupta V. K., Beckert T. E., Price J. C.. Int. J. Pharm. [J], 2001, **213**(1/2): 83—91
- [6] Lin S. L., Marshall L., Fishman J. K., *et al.*. Biomaterials[J], 2003, **24**(19): 3333—3343
- [7] Masataka K., Shunsuke W., Hitoshi K., *et al.*. Int. J. Pharm. [J], 2002, **249**(1/2): 33—43
- [8] ZHANG Min(张敏), CUI Jun-Feng(崔俊锋), YIN Yu-Ji(尹玉姬), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(3): 550—553
- [9] WANG Hui-Yan(王慧彦), HOU Guang-Hui(侯光辉), YU Mei(俞玫), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(4): 680—682
- [10] Chen L. Y., Tian Z. G., Du Y. M.. Biomaterials[J], 2004, **25**(2): 3725—3732
- [11] CHEN Hao-Fan(陈浩凡), PAN Shi-Rong(潘仕荣), WANG Qin-Mei(王琴梅). J. Huazhong University Sci. Tech., Health Sci. (华中科技大学学报, 医学版)[J], 2003, **32**(2): 152—156
- [12] QU Yan-Zu(瞿延珠), LIN Xi-Quan(林锡权). Chemistry(化学通报)[J], 1989, (3): 10—13
- [13] ZAHNG Can(张灿), DING Ya(丁娅), YANG Bo(杨波), *et al.*. Chin. J. Nat. Med. (中国天然药物)[J], 2004, **2**(2): 94—98
- [14] Chen S. C., Wu Y. C., Mi F. L., *et al.*. J. Control. Rel. [J], 2004, **96**(2): 285—300
- [15] Sarkyt E. K., Vladimir B. S.. Langmuir[J], 1999, **15**: 4230—4235
- [16] Philippove O. E., Hourolet D., Accdebert R., *et al.*. Macromolecules[J], 1997, **30**(26): 8287—8291
- [17] Shin M. N., Kang H. S., Park T. G., *et al.*. Polym. Bull. [J], 2002, **47**(5): 451—456
- [18] Risbud M. V., Hardikar A. A., Bhat S. V., *et al.*. J. Control. Rel. [J], 2000, **68**(1): 23—30

Synthesis and Characterization of *N*-(2-Sulfobenzyl) chitosan and pH Sensitivity of Its Hydrogel

LIN You-Wen*, CHEN Qing, LUO Hong-Bin

(Faculty of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract By two steps of reaction, a novel water-soluble chitosan derivative [*N*-(2-sulfobenzyl) chitosan, SBCS] was synthesized. The chemical structure of SBCS was characterized by FTIR, ^1H NMR, UV-Vis spectra. Degree of substitution (DS) of *N*-2-sulfobenzyl was determined by colloid titration. In the buffer solutions with different pH values the swelling characteristics of hydrogels based on SBCS (SBCSG) prepared by cross-linking with glutaraldehyde were studied. The results show that the swelling ratio (SR) of SBCSG was decreased with increasing the dosage of glutaraldehyde. The SBCSG swelled more significantly in alkaline solution than in acidic medium and showed the lowest SR at $\text{pH} = 5.0$. In alkaline solution, the SR of SBCSG was increased with raising the DS of *N*-2-sulfobenzyl of SBCS, but no significant change in acidic environment. The SBCSG showed swelling reversibility when soaked in $\text{pH} = 1.0$ and $\text{pH} = 7.4$ buffer solutions alternately. The results imply that SBCS could be potential pH sensitive carrier for colon-specific drug delivery system.

Keywords Chitosan; Modification; pH-sensitivity; Hydrogel; Swelling ratio

(Ed.: W, Z)