DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.009

季磷盐壳聚糖的合成及其水溶性研究 *

钱嫦云 徐晓芬 郭爱洁 郭圣荣△

（上海交通大学药学院 上海 200240）

摘要 目的：对壳聚糖进行化学改性，提高其水溶性并扩大其在医药领域的应用范围。**方法：**在均相体系中 HOBt 和 EDC 的催化下，采用酰化缩合反应将小分子磷盐连接到壳聚糖主链上，合成不同取代度的壳聚糖季磷盐，并用核磁共振氢谱、红外光谱、X- 射线衍射谱表征产物的结构以及结晶性能。测定壳聚糖季磷盐的水溶解度及溶液的 pH 稳定性。**结果：**合成得到 12.1 % 和 21.5 % 两种不同取代度的壳聚糖季磷盐。与壳聚糖相比，两种不同取代度的壳聚糖季磷盐的结晶性能均有所下降，水溶性有很大的提高，并且溶液的 pH 稳定性显著增强。**结论：**使用小分子磷盐对壳聚糖进行化学改性得到水溶性良好且具有一定 pH 稳定性的壳聚糖衍生物，在用作药物输送载体及抗菌材料等领域内必将具有广阔的应用前景。

关键词：壳聚糖；季磷盐；化学改性

中图分类号：R914，R945 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2014)03-433-04

Synthesis and Characterization of Phosphonium Modified Chitosan*

QIAN Chang-yun, XU Xiao-fen, GUO Ai-jie, GUO Sheng-rong△

(School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: To improve the water solubility and enlarge the application of chitosan. **Methods:** Phosphonium chitosan (NPCS) was synthesized under the homogenous reaction system with HOBt and EDC as the catalyst and the chemical structure and crystallization of NPCS was characterized by 1H-NMR, FT-IR and XRD. Water solubility and pH stability of NPCS were investigated. **Results:** NPCS with two degrees of substitution (12.1 % and 21.5 %) were successfully synthesized and compared with chitosan, NPCS had low crystallization, better water solubility and pH stability. **Conclusion:** Phosphonium modified chitosan had favorable water solubility and good application prospect in drug delivery system and antibacterial materials.

Key words: Chitosan; Phosphonium; Chemical modification

Chinese Library Classification (CLC): R914, R945 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)03-433-04

前言

壳聚糖(Chitosan)，是甲壳素脱去部分乙酰基的产物，由 2-乙酰氨基 -2- 脱氧 -D- 吡喃葡聚糖和 2- 氨基 -2- 脱氧 -D- 吡喃葡聚糖通过 β -1，4- 糖苷键相连[1,2]。壳聚糖因其天然正电性、良好的生物相容性和生物可降解性等优点在生物医学领域得到了广泛的研究[3-6]，但壳聚糖不溶于水和有机溶剂，仅溶于稀酸溶液中[7,8]，因此在一定程度上限制了其应用。对壳聚糖进行化学修饰以提高其溶解性能已引起研究者的广泛关注[9-13]。用小分子季磷盐对壳聚糖进行修饰的研究鲜见报道[14,15]。本研究合成壳聚糖季磷盐并对其进行表征，同时研究了溶解性等相关性质。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

电子天平（BSA124S，Sartorius 公司，德国）；低温恒温反应浴（上海大颜仪器设备有限公司）；冷冻干燥机（FD-1CE，北京德天佑科技发展有限公司）；FT-IR（Paragon 1000，Perkin Elmer, Inc.，美国）；1H-NMR（MERCURY plus 400，Varian, Inc.，美国）；X- 射线衍射仪（D/max-2200/PC，Rigaku Corporation，日本）；紫外分光光度仪（UV-2410PC，上海棱光光学仪器有限公司）；壳聚糖（91.83% 脱乙酰度，Mw = 150,000，浙江金壳生物化学有限公司）；5- 羧戊基三苯基溴化磷（CTPB，成都西亚化学科技有限公司）；上海共价化学科技有限公司；其余常用化学试剂均为市售分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖季磷盐 (NPCS) 的合成与表征 在 250 mL 单口圆底烧瓶中，顺次加入 400 mg 壳聚糖 (CS)、664 mg HOBt 和 30 mL H_2O/DMSO (v/v = 2/1)，在 10 ℃ 下搅拌至溶液呈白色浑浊状，调节 pH 到 4.8-5.5。加入计算量的 CTPB 搅拌至完全溶解。CS 与 CTPB 的投料比分别为 1/0.5、1/1 (CS 上糖单元与 CTPB 的摩尔比)。慢慢滴加溶解在 5 mL DMSO 中的 940 mg EDC·HCl，继续搅拌反应 24 h。产物到入丙酮 / 乙醚 (v/v = 2/1) 中沉淀，真空干燥 24 h 后将产物溶于超纯水中，透析 3 天，每隔 12 h 换水一次，冷冻干燥后得到反应产物壳聚糖季磷盐 (NPCS)。分别用红外光谱仪 (FT-IR)、核磁共振波谱仪

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81171439/H1816）

作者简介：钱嫦云（1988-），女，硕士研究生，主要研究方向：壳聚糖的化学改性及其应用研究

△通讯作者：郭圣荣，电话：021-34204793，E-mail: srguo@sjtu.edu.cn

（收稿日期：2013-05-06 接受日期：2013-05-28）

(1H-NMR) 和 X- 射线衍射仪(XRD) 对所合成的 NPCS 进行结构表征。

1.2.2 NPCS 溶解度的测定 称取 20 mg CS 或 NPCS 置于透明玻璃瓶内,加入一定体积的超纯水,每次加完超纯水后在 37 ℃水浴摇床中振荡溶解 24 h,观察并记录每个样品溶解时的现象及所加水的总体积。

1.2.3 NPCS 溶液 pH 稳定性考察 称取 60 mg NPCS 样品加入 60 mL 1% (v/v) 的 HAc 溶液中,充分溶解后。通过滴加 1M 的 NaOH 溶液调节溶液的 pH 值为 4,5,6,7,8,9,10,11,12。以 1% 的 HAc 溶液作为参比, 在 600 nm 下测定溶液对应的透射率,作出 pH- 透射率的曲线。

2 结果

2.1 NPCS 的红外光谱分析

壳聚糖在 1587 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应的是伯氨基上 N-H 的弯曲振动, 而酰胺Ⅰ带和酰胺Ⅱ带的特征吸收峰较弱,说明壳聚糖具有较高的脱乙酰度[16,17]。NPCS (b) 在 1642 cm^{-1} 和 1387 cm^{-1} 处出现了两个新的吸收峰 (分别对应的是酰胺Ⅰ带的伸缩振动和苯环上 C=C 的伸缩振动),在 1587 cm^{-1} 处的吸收峰减弱,表明壳聚糖主链引入了苯基,并且伯氨基减少(图 1)。

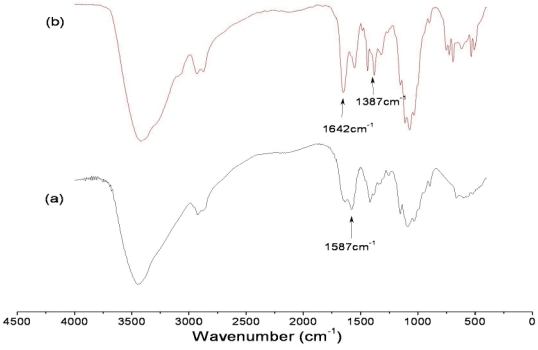

图 1 壳聚糖 (a) 和壳聚糖季磷盐 (b) 的红外图谱

Fig.1 FT-IR spectra of CS (a) and NPCS (b)

2.2 NPCS 的核磁共振氢谱分析

CS 和 NPCS 结构单元上的主要质子信号均在图 2 中标出[18,19]。经对比分析,在低场 δ =7.48 ppm (H-f) 处出现了一个新的宽峰, 这是季磷盐基团上苯环质子的信号峰。δ = 3.02 ppm (H-e),δ = 2.18 ppm (H-a) 处分别是季磷基团上两处亚甲基的质子信号,而在 δ = 1.56-1.75 ppm 之间是季磷基团上其余三处亚甲基的质子信号 (H-b,c,d)。经过 FT-IR 和 1H-NMR 图谱分析,可以确定小分子磷盐 CTPB 已经成功接到壳聚糖上,生成目标产物壳聚糖季磷盐 (NPCS)。

2.3 NPCS 的取代度

NPCS 的取代度 (DS) 根据 1H-NMR 的相关峰面积的积分算出。计算公式如下[20]:

$$DS=\frac{\frac{I_{7.5-7.81ppm}}{15}\times(1-DD\%)}{\frac{I_{7.81ppm}}{3}}\times 100\%$$

其中,DD% 代表壳聚糖的脱乙酰度,δ = 1.78 ppm 为壳聚糖乙酰基上质子信号,δ = 7.45-7.81 ppm 为 NPCS 上苯环的质子信号。表 2-1 列出了所合成的两种不同取代度的壳聚糖季磷盐。

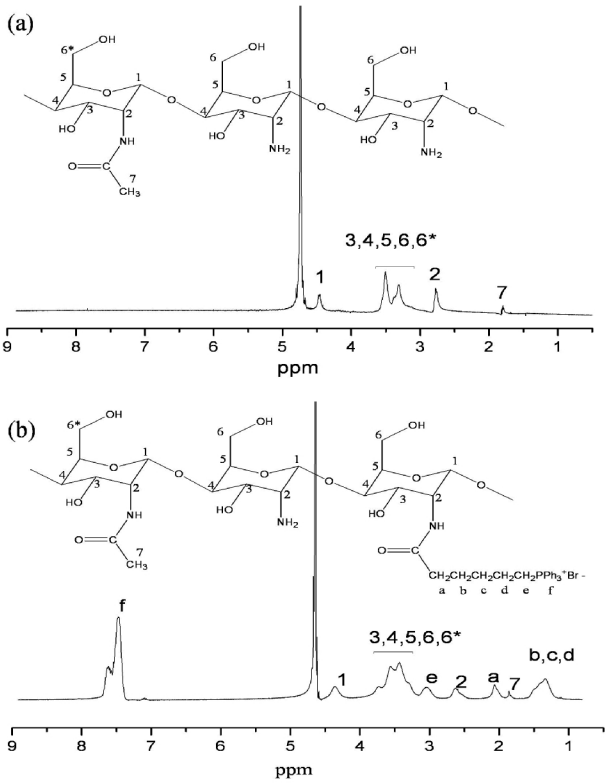

图 2 壳聚糖和壳聚糖季磷盐的核磁图谱

Fig.2 1HNMR spectra of Chitosan (a) and NPCS (b)

表 1 壳聚糖季磷盐的取代度

Table 1 The degree of substitutions (DS) of NPCS

Sample	Feed molar ratio (CS/CTPB)a	DS
NPCS1	1/0.5	12.1%
NPCS2	1/1	21.5%

注:a 投料摩尔比是指壳聚糖的糖单元与 CTPB 的比值。

Note:a Molar ratio was defined as the glycosyl units of chitosan to CTPBs.

2.4 X- 射线衍射 (XRD) 谱图

小分子磷盐 (a) 在 8-35° 区间内有若干个较强的吸收峰。壳聚糖 (b) 在 2θ = 10.6° 和 2θ = 19.5° 附近有两个较宽的吸收峰。如曲线 (c)、(d) 所示,小分子磷盐 CTPB 接到壳聚糖分子上后,原壳聚糖的两个主要结晶峰 (2θ = 10.6° /19.5°) 几乎消失,表明与壳聚糖相比,壳聚糖季磷盐的结晶性显著下降(图 3)。

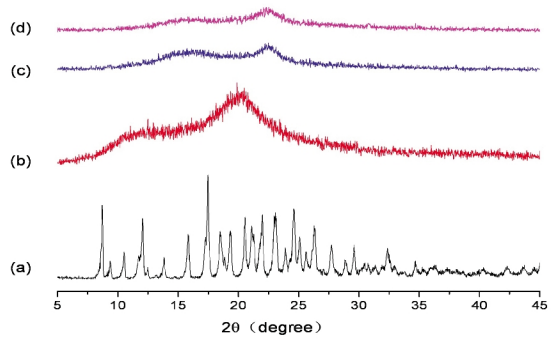

图 3 CTPB (a)、壳聚糖 (b)、NPCS1 (c)和 NPCS2 (d)的 X- 射线衍射图谱

Fig.3 X-ray diffraction of CTPB (a),chitosan (b),NPCS1 (c) and NPCS2 (d)

2.5 NPCS 溶解度测定

表 2 记录了壳聚糖季磷盐的溶解度的测定结果。根据记录结果，估算得出取代度为 12.1% 的壳聚糖季磷盐 (NPCS1) 的溶解度约为 18 mg/mL，取代度为 21.5% 的壳聚糖季磷盐 (NPCS2) 的溶解度约为 12 mg/mL。从表 2 可以看出，与 CS 相比，NPCS 在水中的溶解性能得到了不同程度的提高。

表 2 壳聚糖与壳聚糖季磷盐在水中的溶解度

Table 2 Water solubility of chitosan and NPCS

Sample	Weight (mg)	Total ultrapure water (μL)						
		600	800	1000	1100	1300	1500	1700
CS	20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NPCS1	20	-	++	+	--	--	--	--
NPCS2	20	-	++	++	++	+	+	--

注：a -- 澄清，- 溶胀，+ 少量不溶物，++ 大量不溶物，+++ 浑浊。

Nate:a -- transparent，- swelling，+ a little insolubles，++ some insolubles，+++ turbid.

2.6 NPCS 溶液 pH 稳定性

图 4 为壳聚糖及两个不同取代度 NPCS 样品在 pH = 2-12 范围内的 600 nm 处的相应透光率曲线。从图中可以看出在 pH = 8-12 范围内，壳聚糖透光率接近 0，几乎完全不溶，NPCS 样品仍有超过 50%的透光率。高取代度的 NPCS 与低取代度的 NPCS 在低 pH 环境下均为澄清透明，透光率为 100%。在 pH 7 左右开始产生沉淀，pH 达到 10 时沉淀量不再增加。到达平衡时 NPCS1 溶液和 NPCS2 溶液的透光率分别为 55% 和 72%。与在碱性溶液中完全不溶的壳聚糖相比，NPCS 的溶解性有很明显的提高。

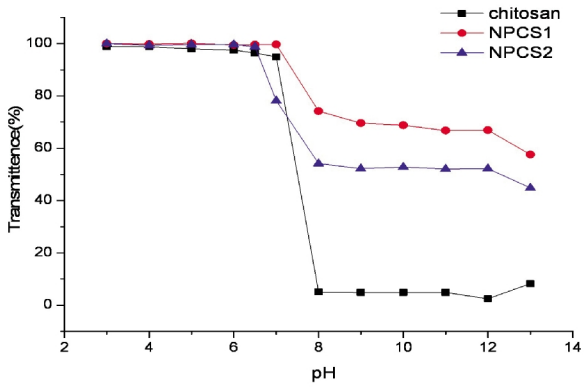

图 4 壳聚糖与壳聚糖季磷盐在水中溶解度的 pH 稳定性

Fig. 4 The pH dependence of water solubility of chitosan and NPCS

3 讨论

壳聚糖因其低细胞毒性、良好的生物相容性和生物可降解性等优点在医药领域已被广泛地研究，且壳聚糖上含有大量的氨基和羟基能在温和条件下进行化学改性。本研究在均相体系中通过化学反应合成了一种新型的改性壳聚糖，即壳聚糖季磷盐 (NPCS)。理化性质的研究表明壳聚糖经季磷化改性后结晶性能下降，水溶解性大大提高，季磷盐改性后的壳聚糖在抗菌以及基因输送载体方面具有很好的应用前景。

参 考 文 献(References)

[1] Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties [J]. Glycoconjugate journal, 1997, 14(4): 535-542

[2] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 第 2 版. 北京:化学工业出版社, 2007: 38267
Jiang Ting-da. Chitosan [M]. Second edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 38267

[3] Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications [J]. Reactive and Functional Polymers, 2000, 46(1): 1-27

[4] Qi L, Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16(16): 4243-4245

[5] 邬思辉, 苏政权. 壳聚糖及其衍生物作为药物载体研究进展[J].现代生物医学进展,2008, 8(8): 1588-1591
Wu Si-hui, Su Zheng-quan. Progress of chitosan and its derivatives as drug delivery vector [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(8): 1588-1591

[6] Chirkov SN. The antiviral activity of chitosan [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2002, 38(1): 1-8

[7] Shepherd R, Reader S, Falshaw A. Chitosan functional properties [J]. Glycoconjugate Journal, 1997, 14(4): 535-542

[8] Ló pez-Leó n T, Carvalho ELS, Seijo B, et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: Electrokinetic and stability behavior [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 283(2): 344-351

[9] Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, 62(1): 3-11

[10] Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, et al. Chitosan and its derivatives for gene delivery [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(2): 234-238

[11] 王峰, 赵士贵, 王旭波, 等. 壳聚糖的化学改性及其在生物医药领域的应用进展[J]. 现代生物医学进展,2007, 7(9): 1405-1407
Wang Feng, Zhao Shi-gui, Wang Xu-bo, et al. Chemical modification of chitosan and its application in biomedicine and pharmacy [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(9): 1405-1407

[12] J Zhang, W Xia, P Liu, et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical application [J]. Marine drugs, 2010, 8(7): 1962-1987

[13] Peniche H, Peniche C. Chitosan nanoparticles: A contribution to nanomedicine[J]. Polymer International, 2011, 60(6): 883-889

[14] Hsin-I Changa, Ming-Syun Yangb, Mong Liang. The synthesis, characterization and antibacterial activity of quaternized poly (2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide)s modified with ammonium and

phosphonium salts [J]. Reactive and Functional Polymers, 2010, 70 (12): 944-950

[15] Wang Fengju, Chen Yu, Tan Huimin. Research progress of quaternary ammonium salt coupled chitosan antibacterial [J]. New Chemical Materials, 2011, 39(11): 13-15

[16] C Paluszkiewicz, E Stodolak, M Hasik, et al. FT-IR study of montmorillonite-chitosan nanocomposite materials [J]. Spectro chimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 79(4): 784-788

[17] W Zhang, J Zhang, Q Jiang, et al. Physicochemical and structural characteristics of chitosan nanopowders prepared by ultrafine milling [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 309-313

[18] Asako Hirai, Hisashi Odani, Akio Nakajima. Determination of degree of deacetylation of chitosan by 1H NMR spectroscopy [J]. Polymer Bulletin, 1991, 26: 87-94

[19] Elson Santiago de Alvarenga, ristiane Pereira de Oliveira, Carlos Roberto Bellato. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(4): 1155-1160

[20] Wang L, Xu X, Guo S, et al. Novel water soluble phosphonium chitosan derivatives: Synthesis, characterization and cytotoxicity studies [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(2): 375-380

（上接第 482 页）

[6] 史旭波, 胡大一, 李田昌. 经皮冠状动脉介入治疗中达肝素钠的安全性与有效性研究[J].临床荟萃, 2011, 26(14): 1204-1210
Shi Xu-bo, Hu Da-yi, Li Tian-chan, et al. Safety and efficiency of dalteparin during percutaneous coronary intervention [J].Clinical Focus, 2011, 26(14): 1204-1210

[7] Chan T, Hwang N C, Lim C H. Statistical analysis of factors patients to heparin resistance[J]. Perfusion, 2006, 21(2): 99-103

[8] Gurm H S, Eagle K A. Use of anticoagulants in ST-segment elevation myocardial infarction patients:a focus on low-molecular-weight heparin[J].Cardiovasc Drugs Ther, 2008, 22(1): 59-69

[9] Singh S, Bahekar A, Molnar J, et al. Adjunctive low molecular weight heparin during fibrinolytic therapy in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials[J]. Clin Cardiol, 2009, 32(7): 358-364

[10] 史旭波, 胡大一. 肝素的抗凝机制及临床相关问题 [J]. 临床荟萃, 2007, 22(18): 1293-1295
Shi Xu-bo, Hu Da-yi. Heparin anticoagulant mechanism and clinically relevant issues[J]. Clin Cardiol, 2007, 22(18): 1293-1295

[11] Boshkov L K, Warkentin T E, Hayward C P, et al. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis clinical and laboratory studies[J]. Br J Haematol, 1993, 84(3): 322-328

[12] Cohen M. Role of low-molecular-weight heparin in the management of acute coronary syndromes[J]. Am Coll Cardiol, 2003, 41(4): 55-61

[13] Lund P E, Wassback G, Thomas O, et al. Comparison of two infusion rates of antithrombin concentrate in cardiopulmonary bypass surgery [J]. Perfusion, 2010, 25(5): 305-312

[14] Levy J H. Heparin resistance and antithrombin:should it still be called heparin resistance?[J]. Cardiot horac Vasc Anest h, 2004, 18(2): 129-130

[15] Folwarczna J, Sliwinski L, Janiec W, et a1. Effects of standard heparin and low-molecular-weight heparins on the formnation of murine osteoclasts in vitro[J]. Pharmcol Rep, 2005, 57(5): 635-645

[16] 汪玮, 戴秋艳, 吴莹, 等. 不同剂型低分子肝素对急性冠状动脉综合征患者抗 Xa 活性水平的影响 [J]. 中华内科杂志, 2007, 46(8): 667-668
Wang Wei, Dei Qiu-yan, Wu Ying, et a1. Different formulations of low molecular weight heparin for acute coronary syndrome patients with anti-Xa activity level [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2007, 46(8): 667-668

[17] 裴玮娜, 谢瑞芹, 崔炜. 不同途径应用低分子肝素对血小板活性的影响及阿司匹林的干预作用[J].中国循环杂志, 2010, 26(1): 51-54
Pei Wei-na, Xie Rui-qin, Cui Wei, et al. Effect of Different Administration of low Molecular Weight Heparin on Platelet Activation and Aspirin Intervention [J]. Chinese Circulation Journal, 2010, 26(1): 51-54

[18] Montalescot G, Collet J P, Tanguy M L, et al. Anti-Xa activity relates to survival and efficacy in unselected acute coronary syndrome patient treated with enoxaparin[J]. Circulation, 2004, 110(4): 392-398

[19] 王瑞, 闫自强,陆婷,等.早期应用低分子肝素对炎症反应综合征血小板参数变化的影响[J].第四军医大学学报, 2009, 30(18): 1745-1751
Wang Rui, Yan Zi-qiang, Lu Ting, et al. Early application of low molecular weight heparin on platelet parameters of inflammatory response syndrome [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2009, 30(18): 1745-1751

[20] 黄震华. 凝血因子 Xa 抑制药研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(9): 505-510
Huang Zhen-hua. Advances in coagulation factor Xa inhibitor [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2012, 31(9): 505-510