

羧甲基壳聚糖水凝胶制备及其在药物控释中的应用*

孙立苹 杜予民** 陈凌云 黄荣华 陈 效

(武汉大学资源与环境科学学院 武汉 430072)

摘 要 以戊二醛为交联剂制备了一系列羧甲基壳聚糖 pH 敏感水凝胶. 研究了合成条件对羧甲基壳聚糖水凝胶溶胀性能的影响. 实验结果表明羧甲基壳聚糖的脱乙酰度、交联剂用量对水凝胶溶胀率的影响较大. pH = 3.0 时, 水凝胶收缩, 而 pH = 1.0, 5.0, 7.4, 9.0 时, 水凝胶溶胀, 且在碱性条件下水凝胶的溶胀率远大于酸性条件下的溶胀率. 包埋在此水凝胶中的水杨酸释放随载药介质的 pH 值和水凝胶半径大小的变化而显著不同, pH = 1.0 条件下载药的水凝胶的释药率大于 pH = 7.4, 12.0 条件下的释药率, 且水凝胶的半径越大, 释药速度和释药率也越大.

关键词 羧甲基壳聚糖水凝胶, 溶胀率, 水杨酸, 控制释放

水凝胶是在水中溶胀并保持大量的水分而又不溶解的聚合物. 高分子水凝胶是由高分子骨架、水、交联剂组成的三维体系, 具有大的分子量的复杂空间网状结构^[1]. 水凝胶对于外界条件的刺激能产生相应的体积相变, 广泛应用于药物控制释放, 固定化酶, 物料萃取, 生物材料培养、提纯, 蛋白酶的活性控制等领域^[2-4]. 另一方羧甲基壳聚糖是壳聚糖经羧甲基化后的一类最重要的壳聚糖衍生物之一, 是分子链上含有阳离子($-\text{NH}_3^+$)和阴离子($-\text{COO}^-$)基团的两性聚电解质, 具有良好的水溶性、成膜性和极强的重金属螯合能力^[5]. 由于其具有良好的吸水保水性能^[6,7], 作为水凝胶, 在药物控制释放上具有良好的发展前途. 目前有关水凝胶的研究主要以聚丙烯酸类物质为基础, 对天然高分子两性聚电解质水凝胶的研究还很少有报道. 本文以戊二醛为交联剂制备出羧甲基壳聚糖水凝胶(CMCTH), 并通过改变羧甲基壳聚糖的脱乙酰度(DD)、溶液 pH 值、交联剂用量等因素来探讨水凝胶的溶胀性能变化. 同时以水杨酸为模型药物, 研究其在羧甲基壳聚糖水凝胶中的释放行为.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

羧甲基壳聚糖由本实验室自制, 用元素分析法测得其脱乙酰度分别为 50% 和 92%, 用电位滴

定法测得羧基的取代度为 0.8; 水杨酸(SA)为分析纯试剂; pH = 3.0 缓冲溶液由邻苯二甲酸氢钾和盐酸配制, pH = 5.0 缓冲溶液由磷酸氢二钠和柠檬酸配制, pH = 7.4 缓冲溶液由磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制, pH = 9.0 缓冲溶液由甘氨酸和氢氧化钠配制.

DELTA-320-S 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); FTIR-8201 型傅立叶变换红外光谱仪(Shimadzu); UV-9100 型分光光度仪.

1.2 羧甲基壳聚糖水凝胶(CMCTH)的合成

羧甲基壳聚糖的制备方法参照文献[9], 10 g 壳聚糖在 NaOH 溶液中充分碱化后依次加入 150 mL 异丙醇和 12 g 氯乙酸, 室温反应 2 h 升温至 65℃ 继续反应 2 h 冷至室温并用冰醋酸调节 pH 至中性, 透析 5 天后再用 70% 的乙醇反复洗涤, 真空干燥得到羧甲基壳聚糖样品.

取一定量的羧甲基壳聚糖样品于小烧杯中, 加入适量的蒸馏水, 用磁力搅拌器搅拌使之完全溶解, 配制成 3% 的溶液, 用稀盐酸调解其 pH 值等于 7.0, 移取 3 mL 于小烧杯中加入适量的戊二醛交联剂, 快速搅匀, 密封, 静置 15 h.

1.3 水凝胶溶胀率的测定^[8]

用称重法测定水凝胶的溶胀率(SR), 把水凝胶置于一系列不同 pH 值的溶液中, 隔一段时间后, 取出, 用滤纸吸干其表面水份, 称重, 按下式计算其溶胀率 $\text{SR} = (W - W_0) / W_0$, 其中 W_0 为溶胀前的干胶

* 2003-03-10 收稿, 2003-05-06 修稿; 国家自然科学基金资助课题(基金号 29977014); ** 通讯联系人

质量(g), W 为溶胀后水凝胶的总质量(g)。

1.4 水杨酸的吸附与释放^[9]

1.4.1 水杨酸的吸附 准确称取一定量的水杨酸, 分别溶于 pH = 1.0 的 HCl 溶液、pH = 7.4 的磷酸缓冲液和 pH = 12.0 的 NaOH 溶液中, 并定容至 100 mL, 用紫外分光光度计于水杨酸的最大吸收波长 300 nm 处测其吸光度。把按照 1.2 方法制备好的水凝胶分别置于已知浓度一定体积的 pH = 1.0, 7.4, 12.0 的水杨酸溶液中, 同时各自以不载药的不同 pH 值的溶液为对照, 室温下浸泡 8 天, 使羧甲基壳聚糖水凝胶达到溶胀和吸附平衡, 然后取出水凝胶, 准确测量剩余溶液的体积, 并用紫外分光光度计于 300 nm 处测定剩余溶液的吸光度, 算出其中水杨酸的含量, 计算水凝胶在不同 pH 值溶液中的载药量。

1.4.2 水杨酸的释放 将已经达到吸附和溶胀平衡的水凝胶取出, 用蒸馏水小心冲洗, 用滤纸吸干其表面的水分, 放置到一定体积的 pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液中, 每隔一定的时间用移液管移取 5 mL 缓冲液, 分别以各自的空白作参比, 于 300 nm 处测其吸光度, 然后再把相同体积的缓冲液补充到缓释体系中, 使其保持体积恒定在 30 mL。计算不同时间水杨酸从水凝胶中释放出来的量, 测定结果以释药率(释药量/载药量)来表示。

2 结果与讨论

2.1 羧甲基壳聚糖水凝胶的 pH 敏感性

把脱乙酰度为 92% 的羧甲基壳聚糖制成的水凝胶置于 pH = 1.0 的盐酸溶液和 pH 值分别为 3.0, 5.0, 7.4, 9.0 的缓冲溶液中, 观察其溶胀率随时间的变化, 结果如图 1。

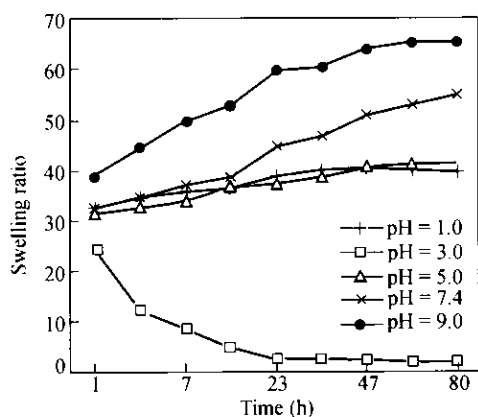


Fig. 1 Effect of pH value on swelling ratio of CMCTH

从图 1, 可以看出, 其溶胀行为具有较强的 pH 敏感性, 当 pH = 3.0 时, 水凝胶收缩, 当 pH = 1.0, 5.0, 7.4, 9.0 时水凝胶溶胀, 并且随着 pH 值的升高, 溶胀率的变化率越大。这是因为羧甲基壳聚糖是两性聚电解质, 水凝胶中存在着如 -COOH 、 -NH_2 、 -OH 等多种极性基团, 在不同的溶液中, 其离子化程度不同, 所形成的基团的亲水性也有所不同, 因而显示出不同的溶胀性能。pH = 1.0 时, -NH_2 被质子化为 -NH_3^+ , 静电斥力和亲水性增加, 导致溶胀率增加。pH = 5.0, 7.4 时, -COOH 部分电离, 此时羧基与羟基的氢键起主要作用, -COO^- 提供亲水性; pH = 9.0 时, 主要为 -COO^- , 上述氢键复合物解离, 溶胀率提高; 在 pH = 3.0 时, -NH_2 与 -COOH 之间离子键合, 形成紧密结构, 因而最不易溶胀。同时由 Donnan 平衡理论可知, 凝胶的溶胀主要是由凝胶内外自由离子浓度差所产生的渗透压决定。当 pH < 2 时, 水凝胶主要带电基团是质子化的氨基 (-NH_3^+), pH > 4 时, 是脱质子化的羧基 (-COO^-), 在这些范围内, 凝胶内部自由离子的浓度大于环境中离子自由浓度, 由此产生的渗透压使凝胶吸水膨胀以降低凝胶内电荷。当 pH 在 2 ~ 4 时, 正好处于 CMCTS 的等电点, -COO^- 和 -NH_3^+ 所带电荷相当, 相互之间的静电吸引使水凝胶内自由离子浓度几乎为零, 外界渗透压使水凝胶脱水收缩。

为了更加确切的说明羧甲基壳聚糖水凝胶在不同 pH 值条件下分子间的相互作用情况, 把在不同 pH 溶液中达到溶胀平衡的水凝胶真空冷冻干燥, 其红外谱图如图 2。

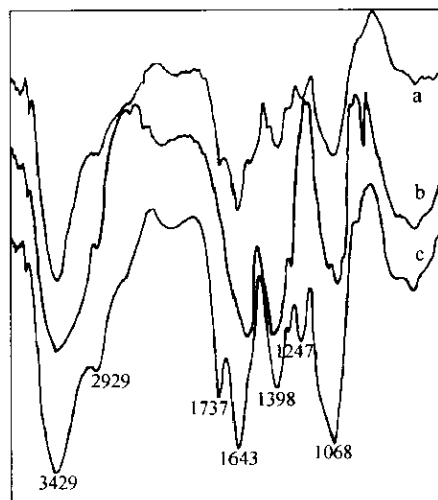


Fig. 2 IR spectra of CMCTH swelled at different pH value
a) pH = 3.0; b) pH = 7.4; c) pH = 1.0

从图2可以看出,三者之间的共同点为 3425 cm^{-1} 左右处为 -NH 的 -OH 的伸缩振动峰, 2925 cm^{-1} 左右为 $\text{-CH}_2\text{-}$ 的只收峰, 1300 cm^{-1} 左右为 -CO 的吸收峰, 1737 cm^{-1} 左右为 -COOH 的吸收峰,这就说明了羧甲基壳聚糖的特征结构^[8].对比发现, $\text{pH}=1.0$ 时, 1737 cm^{-1} 处有较强的特征吸收峰,说明分子中存在着大量未解离的 -COOH ,同时在 1643 cm^{-1} 处为 -NH_3^+ 的特征吸收峰,这表明此时的羧甲基壳聚糖接受了溶液中的质子,大分子链主要以正离子状态存在,电荷间的排斥效应增大,使大分子链易于伸展,与水分子作用增强,导致溶胀率增加; $\text{pH}=3.0$ 时,可以观察到 1737 cm^{-1} 处的吸收峰依然存在但是明显减弱,这表明分子中的大部分 -COOH 与 -NH_2 之间形成内盐,因而最不易溶胀; $\text{pH}=7.4$ 时, -NH_3^+ 失去正电荷变为 -NH_2 ,此时谱图中 1643 cm^{-1} 处 -NH_3^+ 的特征峰消失,同时在 1590 cm^{-1} 和 1420 cm^{-1} 处出现 -COO^- 的对称和反对称的特征吸收峰,这表明此时大分子链中大量存在着的是 -COO^- ,离子间的斥力和 -COO^- 极强的亲水性使溶胀率提高^[10].羧甲基壳聚糖水凝胶的 pH 敏感性为接下来选择载药介质提供了科学的依据,从而有效地克服了水杨酸在水中溶解度低的缺陷.

2.2 各因素对羧甲基壳聚糖水凝胶溶胀性能的影响

2.2.1 羧甲基壳聚糖的脱乙酰度(DD)对水凝胶SR的影响 用脱乙酰度分别为50%和92%的羧甲基壳聚糖与戊二醛交联,用称重法观察当外界条件变化时水凝胶的溶胀性能变化,发现水凝胶对 pH 值的变化均有响应,且脱乙酰度越大,其溶胀率变化越大,对 pH 值变化的响应越明显,结果如图3.可以看出,当水凝胶发生收缩时,脱乙酰度大的收缩较大;当水凝胶发生溶胀时,脱乙酰度大的溶胀也较为显著.原因是脱乙酰度较低的羧甲基壳聚糖 -NH_2 含量较低,在交联剂加入量一定的情况下, -NH_2 与交联剂的比值较小,使得交联密度相对增加,水凝胶网格之间空隙变小,从而影响水分子的扩散,所以脱乙酰度低的羧甲基壳聚糖合成的水凝胶溶胀率较小.

2.2.2 交联剂的浓度对水凝胶SR的影响 把脱乙酰度为92%的羧甲基壳聚糖与不同剂量的戊二醛交联制备水凝胶,置于 $\text{pH}=7.4$ 的缓冲溶液中,观察其溶胀率随时间的变化,结果如图4所

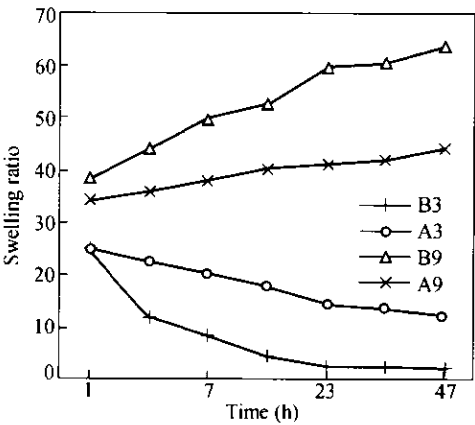


Fig. 3 Effect of DD value on the swelling ratio of CMCTH in $\text{pH}=3.0$ and $\text{pH}=9.0$ solution
A) DD = 50%; B) DD = 92%; 3) $\text{pH}=3.0$; 9) $\text{pH}=9.0$

示.当交联剂浓度较小时,形成的水凝胶在溶胀过程中变化起伏较大,而当交联剂浓度过高时,形成的水凝胶强度大大提高,而透明度有所降低,其溶胀率变化较小.原因可能是交联剂浓度的增加使分子链之间的交联密度增加,使网格减小,影响水分子向内渗透,从而使溶胀率减少^[11].因此,在水凝胶的制备过程中,应选择合适的交联剂浓度.

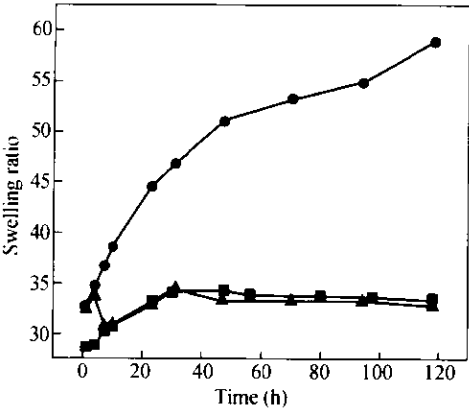


Fig. 4 Effect of amount of cross-linking agent on the swelling ratio of CMCTH
■ 2.5% 0.2 mL; ● 1.25% 0.2 mL; ▲ 1.25% 0.1 mL

2.3 水杨酸在羧甲基壳聚糖水凝胶中的控制释放

2.3.1 不同 pH 值下水杨酸的控制释放 把在不同 pH 值条件下已经载有水杨酸的水凝胶置于 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸缓冲液中, $\text{pH}=1.0, 7.4, 12.0$ 中水凝胶的载药量分别为 $6.31 \times 10^{-3}\text{ g}$, $5.63 \times 10^{-3}\text{ g}$, $12.80 \times 10^{-3}\text{ g}$.测量水杨酸的释药率随时间变化的情况,结果见表1.

从表 1 可以看出,酸性溶液中水凝胶的总释药率大于其在中性和碱性溶液中的释药率.这是因为在酸性条件下,水凝胶上存在着的一NH₂与H⁺结合形成正电离子基团,由于静电排斥作用,使得水凝胶各网格之间的空隙增大,孔道畅通,使渗透性增强,因而释药率较大;而在碱性和中性条件下,一NH₂基团依附于水凝胶表面,使得孔道堵塞,渗透性降低,因而释药率较慢^[12,13].在开始释药的1~2 h内,pH=12.0条件下载药的水凝胶的释药率是酸性和中性条件下载药的2~3倍,出现这一现象的原因可能是当水凝胶在pH=12.0的条件下载药时,分子中的羧基以一COONa的形式存在,而一COONa与一COOH,一CONH₂,一OH相比,其亲水性最强,所以此时的水凝胶溶胀最为迅速,因此水杨酸易于从其中释放出来,使之在短时间内具较大的释药量;当释药时间延长至3~4 h时,在酸性条件下载药的水凝胶释药率急剧上升,达到50%左右,而后又持续稳定释放.5天后,在pH=1.0条件下载药的水凝胶释药率达到83.34%,此时水杨酸的累积释放量远远大于其在水中的溶解度,这就明显地改善了水杨酸的溶解

Table 1 Release of SA from CMCTH in different pH values

Time(h)	Releasing ratio(%)		
	pH = 1.0	pH = 7.4	pH = 12.0
1	6.34	5.33	15.16
3	49.13	14.56	26.88
6	65.45	40.67	35.08
9	67.99	48.31	40.31
24	71.79	59.15	59.38
48	81.46	56.48	59.06
72	81.98	56.84	61.09
120	83.34	59.33	62.81

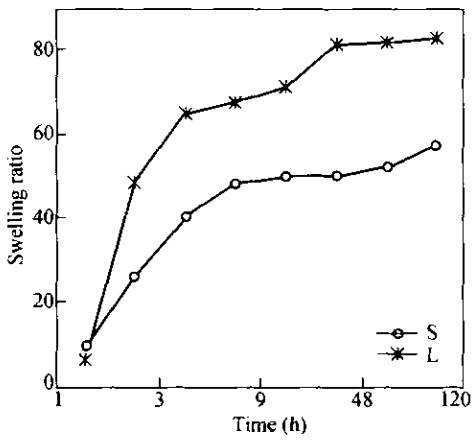


Fig. 5 Effect of partical size of CMCTH on the controlled release system in pH = 1.0 solution
S: sample with radius = 0.90 cm, high = 1.18 cm
L: sample with radius = 1.10 cm, high = 0.97 cm

性能,使之应用得到进一步扩展.

2.3.2 水凝胶的半径大小对于该控制释放体系的影响 同样条件下合成不同半径大小而体积相同的羧甲基壳聚糖水凝胶,半径为0.90 cm,高为1.18 cm的记为S;半径为1.10 cm,高为0.79 cm的记为L.在相同的条件下载药和释放,测定水凝胶中水杨酸的释放率来研究半径对控释体系的影响.图5是在pH=1.0的条件下载药的水凝胶的半径大小对于此控制释放体系的影响.可以看出,半径较大的水凝胶释药速度和释药率均较大.原因可能是半径较大的水凝胶分子间的孔径较大,有利于小分子的扩散,同时,由于水凝胶的体积相同,均为3 cm³,半径较大的水凝胶的表面积(13.05 cm²)大于半径较小的水凝胶的表面积(11.75 cm²),因此释药速度和释药率较大.水凝胶半径大小对于在pH=7.4、pH=12.0的条件下载药的水凝胶也有如此类似的影响关系.

REFERENCES

1 Nicole J E, Kelly R S, Kao W J. *Biomaterials*, 2002, 24: 509 ~ 523

2 Liu Feng(刘锋), Zhuo Renxi(卓仁禧). *Polymer Materials Science and Engineering(高分子材料科学与工程)*, 1998, 14(2): 54 ~ 57

3 Jin Manrong(金曼蓉), Wu Changfa(吴长发), Zhang Guiying(张桂英), Liu Peiyi(刘培毅), Hou Wei(侯薇). *Acta Polym Sin(高分子学报)*, 1995, (3): 321 ~ 325

4 Liu F, Tao G L, Zhuo R X. *Polym J*, 1993, 25(6): 561 ~ 567

5 Dodane V, Vilivalam V D. *Pharm Sci Techn Today*, 1998, 1(6): 246 ~ 253

6 Majeti N V, Ravi K. *React Funct Polym*, 2000, 46(1): 1 ~ 27

7 Muzzarelli R A A. *Carbohydrate Polymers*, 1988, 8: 1 ~ 21

8 Chen Lingyun(陈凌云), Du Yumin(杜予民), Xiao Ling(肖玲), Qin Caiqin(覃彩芹). *Chin J Appl Chem(应用化学)*, 2001, (1): 5 ~ 8

9 Chen L Y, Du Y M, Zheng X Q. *Carbohydrate Research*, 2003, 338: 333 ~ 340

- 10 Liu Yuyang(刘郁杨), Fan Xiaodong(范小东), Zhang Shuangcun(张双存). *Acta Polym Sin(高分子学报)*, 2002, (5): 618 ~ 622
- 11 Ferreira L, Vidal M M, Gil M H. *Int J Pharm*, 2000, 194: 169 ~ 180
- 12 Li Wenjun(李文俊), Wang Hanfu(王汉夫), Lu Yuhua(卢玉华), Wang Zhiliang(汪志亮), Zhong Wei(钟伟). *Acta Polym Sin(高分子学报)*, 1997, (1): 106 ~ 112
- 13 Liu Zhenhua(刘振华), Wang Jian(王健), Fan Changlie(范昌烈), Zhuo Renxi(卓仁禧). *Acta Polym Sin(高分子学报)*, 1998, (5): 562 ~ 566
- 14 Changez M, Burugapalli K, Koul V, Choudary V. *Biomaterials*, 2003, 24: 527 ~ 536
- 15 Kyniakides T R, Cheung C Y, Murthy N, Bornstein P, Stayton P S, Hoffman A S. *J Control Rel*, 2002, 78: 295 ~ 303

THE SYNTHESIS OF CARBOXYMETHYLCHITOSAN HYDROGEL AND THE APPLICATION IN DRUG CONTROLLED RELEASE SYSTEMS

SUN Liping, DU Yumin, CHEN Lingyun, HUANG Ronghua, CHEN Xiao

(*College of Resource and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Abstract pH-sensitive hydrogels based on carboxymethylchitosan (CMCTS) were synthesized by using glutaraldehyde as cross-link agent. The effects of the degree of deacetylation of CMCTS and the dosage of crosslinker on the swelling behaviors of hydrogels have been studied. The results show that the two factors related above regulate their swelling behavior. At pH = 3.0, the hydrogel shrinked most while swelled at pH = 1.0, 5.0, 7.4, 9.0. In general, the swelling ratio (SR) of this hydrogel in alkaline solution is much larger than that in acidic solution. The release behavior of salicylic acid (SA) entrapped in the hydrogels was of distinctly difference with the changes of pH value of loading medium and the semidiameter of the hydrogels. The release of salicylic acid in CMCT hydrogel in the medium of pH = 1.0 was much quicker in pH = 7.4, 12.0, and the release speed and release ratio increase with the partical size.

Key words Carboxymethylchitosan hydrogel, Swelling ratio, Salicylic acid, Controlled release