

壳聚糖及其羧甲基衍生物的配位化学研究

摘 要

合成了壳聚糖铜配合物,考察了脱乙酰度、温度对产品中铜含量的影响,脱乙酰度为 95%,温度为 60 °C 为合成壳聚糖铜配合物的最佳条件,配合物中铜的质量百分数 11.24%。研究了产品在人工海水中的缓释行为及其对大肠埃希氏菌的抑菌效果,产物在人工海水中 15d 的累积放度仅为 0.76%,说明其具有优异的缓释性能。抑菌第六天时,抑菌率可达 54.5%。

以壳聚糖与一氯乙酸在碱性条件下通过加热制备了羧甲基壳聚糖(CMCS)。考察了浓度、温度、金属盐对羧甲基壳聚糖溶液粘度的影响。羧甲基壳聚糖溶液的表观粘度随浓度的增加而增大,随温度升高而降低,且溶液的浓度愈大,其表观粘度受温度影响愈大;加入NaCl,会造成羧甲基壳聚糖水溶液体系的表观粘度的下降,并且表观粘度随加入的NaCl量的增大而平缓下降。

以羧甲基壳聚糖作为骨架材料,采用戊二醛交联法制备CMCS-GA,对产品进行了红外表征。考察pH及温度对溶液溶胀度的影响,凝胶在pH 7 左右达最大溶胀度,在碱性条件下,随pH增大CMCS-GA溶胀度减小,在酸性条件下,随pH减小CMCS-GA溶胀度减小,酸性较强时,凝胶溶解。当温度在25°C~55°C变化时,CMCS-GA 在水中溶胀度先升高再减小,在40°C左右达到最大值13.57,

通过吸附制备阿司匹林载药凝胶,观察载药凝胶在人工肠液中的溶胀动力学特点及体外释放行为。在pH 7.4的人工肠液中CMCS-GA 2 h达最大溶胀度1.38。CMCS-GA的载药量为4.6 mg/g,凝胶在人工肠液中的96 h 的累积释放度为99.91%,具有优良的缓释性能,药物的体外释放模型符合一级动力学方程。

通过戊二醛交联合成羧甲基壳聚糖铜、镉配合物,用红外光谱进行结构表征。测定羧甲基壳聚糖铜中铜的量,分别考察其在人工海水及海水中的缓释性能,在人工海水中缓释32天的累积释放度为0.2390%,在海水中缓释30天的累积释放度为0.2112%,且均释放平稳,说明其具有优异的缓释性能。

合成了羧甲基壳聚糖镁(II)、钙(II)、锌(II)、铁(II)、铝(III)、铈

(II) 配合物, 用红外光谱进行结构表征。考察对超氧自由基的抑制作用, 结果表明, 并对 CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II) 三种配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制作用作了研究, 结果表明, 各配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 均有较好的抑制作用, $O_2^{\cdot-}$ 抑制率与配合物浓度为正相关关系, 当配合物的质量浓度在 0.004g/l~0.2g/l 范围内时, CMCS-Zn(II) 抑制率最高, CMCS-Ca(II) 其次, CMCS-Ce(II) 最低, 表明配合物对超氧自由基的抑制作用与配位金属离子的种类有关。

关键词: 壳聚糖 羧甲基壳聚糖 羧甲基壳聚糖水凝胶 缓释 羧甲基壳聚糖盐

The Coordination Chemistry Studies of Chitosan and Its Carboxymethyl Products

Abstract

Complex of chitosan-copper(II) was synthesized, the influence of deacetylation degree and temperature to the mass fractions of copper in product were checked, the best conditions for synthesis of copper complexes chitosan were Deacetylation degree of 95%, temperature of 60 ° C, and quality percentage of copper was 11.24%. Release-controlled capability of product in simulated seawater and its antimicrobial effects to *Escherichia coli* was studied, the cumulated release rate of product in simulated seawater was just 0.76% 15 days later, which indicated the excellent release-controlled capability of the product. The antimicrobial rate reached 54.5% six days later.

Carboxymethyl Chitosan(CMCS) was synthesized under conditions of basification and heat by chitosan and monochloroacetic acid. The product was analyzed by IR, and its apparent viscosity under certain conditions was determined, the apparent viscosity of CMCS rised while concentration increased or temperature declined, thicker solution was affected great when the temperature changed, CMCS's apparent viscosity declined gently with addition of NaCl.

CMCS-GA gel based on CMCS was synthesized by cross-linking with glutaraldehyde, which was analyzed by IR. Swelling ratio of CMCS-GA gel in water solution of different pH and swelling ratio of CMCS-GA gel in distilled water at different temperature was determined, the results indicated that Swelling ratio of CMCS-GA gel got to its maximum point at about pH7; Swelling ratio rised with increased alkalescence under alkaline conditions, and declined with increased acidity under acid conditions, the gel dissolved while acidity was too strong; Swelling ratio firstly rised and then declined while temperature changed from 25°C to 55°C, and got to the maximum swelling degree point 13.57 at about 40°C.

To evaluate the adsorption capability of CMCS-GA gel to aspirin and its application in drug release-controlled system. Aspirin entrapped hydrogel was

synthesized by adsorption effect of CMCS-GA gel to aspirin. The swelling characteristics and the release behaviors of aspirin entrapped hydrogel in simulated intestinal juice (pH7.4) have been studied respectively. CMCS-GA in simulated intestinal juice (pH7.4) got to the maximum swelling degree 1.38 in 2h. The adsorbing capacity of aspirin by CMCS-GA was 4.6mg/g, the cumulated release rate of aspirin entrapped hydrogel in simulated intestinal juice (pH7.4) for 96h was 99.91%, which indicated the excellent release-controlled capability of aspirin entrapped hydrogel. The results also showed that the release profile of aspirin from hydrogel followed first order kinetic equations.

The complexes of Carboxymethyl Chitosan with copper(II), cadmium (II) and glutaraldehyde have been synthesized, the structures of which were characterized by IR spectra, the mass fractions of copper in product was also checked. Release-controlled capability of product in simulated seawater and seawater was studied respectively, the cumulated release rate of product in simulated seawater was just 0.2390% 32 days later, and the cumulated release rate of product in seawater was just 0.2112% 30 days later, both of them released steadily, which indicated the excellent release-controlled capability of the product.

The complexes of Carboxymethyl Chitosan with magnesium(II), calcium(II), zinc(II), iron(II), aluminum(III), cerium(II) have been synthesized, the structures of which were characterized by IR spectra. The free radical scavenging effects of complexes CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II) on superoxide anion radical by NADH-PMS-NBT system were studied. The results demonstrated that three kinds of the complexes all showed excellent ability for scavenging the superoxide anion radical, and the results also showed positive correlation in scavenging ability and concentration of samples. When mass concentration of samples was 0.004g/l~0.2g/l, complex of Carboxymethyl Chitosan with zinc(II) displayed the highest scavenging effects on the superoxide anion radical, while complex of Carboxymethyl Chitosan with Ca(II) was the next and Carboxymethyl Chitosan with Ce(II) was the lowest. It was deduced that the metal ion had something to do with its ability to scavenging superoxide anion radical.

Key Words: Chitosan; Carboxymethyl Chitosan; gel; controlled release; complexes of Carboxymethyl Chitosan

独 创 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含未获得（注：如没有其他需要特别声明的，本栏可空）或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名 陈甲坤 签字日期：2007年5月1日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：陈甲坤

导师签字：陈甲坤

签字日期：2007年5月1日

签字日期：2007年6月11日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编

1. 文献综述

1.1 甲壳素

甲壳素(chitin), 又名几丁质, 甲壳质, 是一种天然高分子化合物, 属于氨基多糖, 系统名(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖。主要存在于低等动物, 特别是节肢动物, 如虾、蟹和昆虫的外壳, 某些植物和菌、藻类细胞壁中。据估计每年自然界生物合成量达千亿吨之多^[1], 仅海洋中年产量达几十亿吨^[2], 是自然界中产量仅次于纤维素的第二大可再生资源, 亦是地球上数量最多的含氮天然有机物(其次是蛋白质)^[3]。

1.1.1 甲壳素的制备^[4, 5]

甲壳质和碳酸钙等无机盐、蛋白质结合在一起。将虾或蟹壳在常温下用稀盐酸脱钙, 再用热的稀碱除去蛋白质, 剩下的水不溶物就是甲壳质, 然后再用 KMnO_4 脱色^[6] 即得成品。

甲壳素的制备过程:

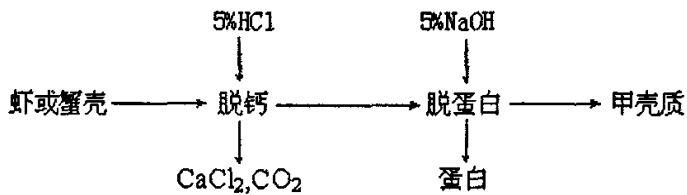


图1.1 甲壳素的制备过程

Fig1.1 The process of preparation of chitin

甲壳素的分子结构式为:

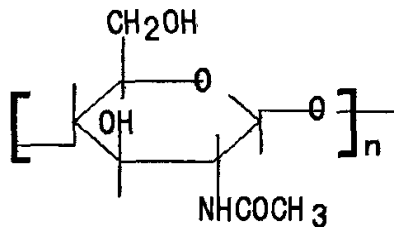


图1.2 甲壳素的分子结构示意图

Fig1.2 The molecular structure of chitin

由于它分子内和分子间存在有强烈的-O··H-O-型及-O··H-N-氢键作用导致即不溶化(加热到473K以上则开始分解),因而不能溶于水、稀酸、稀碱以及一般的有机溶剂^[7,8],这极大限制它的实际应用,也影响研究工作的深入开展。

1.2 壳聚糖

壳聚糖^[7] (Chitosan, CS)是甲壳素分子中C₂位上的乙酰氨基水解或酶解脱去一部分或全部得到的产物,属于带正电荷的聚合良好的天然氨基多糖多糖,由于脱乙酰化反应破坏了甲壳素分子结构的规整性,因此,壳聚糖溶解性能较甲壳素大为改善,化学性质也较为活泼。它可溶于酸或稀酸水溶液,具有可再生、无毒副作用,生物相容性和降解性,其自身及其衍生物具有许多独特的生理、药理功能性质,吸附、整合、保湿和成膜等优异性能,对人体无毒、无免疫原性、具有良好的抗菌性、创伤修复性能。尤其近年来,由于其具有生物高分子的天然优势,人们充分利用它的生物官能性,生物相容性、低毒性、生物可降解性、几乎无过敏作用,具有良好的医学功能和药物作用等性质,不断开发了它在生物和医药方面的应用市场。

1.2.1 壳聚糖的制备^[9]

制备壳聚糖的工艺流程为:

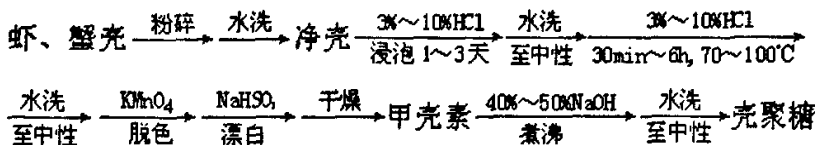


图1.3 壳聚糖制备的工艺流程图

Fig1.3 The process of preparation of chitosan

结构式为:

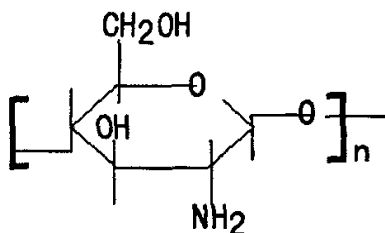


图1.4 壳聚糖的分子结构示意图

Fig1.4 The molecular structure of chitosan

X为脱乙酰度,通常在50%-100%之间^[8]。壳聚糖分子结构中的游离氨基,能结合酸分子溶解在稀酸水溶液中,所以也叫可溶性甲壳素,是自然界中唯一碱性多糖^[10],具有许多特殊的物理化学性质和生理功能。

1.2.2 壳聚糖的化学改性

壳聚糖是甲壳素脱乙酰基后的产物,与甲壳素相比其溶解性能有所改善,但也只能溶于一些稀酸中,不能直接溶于水中,这在很大程度上限制了它的应用,因此改善壳聚糖的溶解性能,特别是改善其水溶性,是壳聚糖改性研究中最重要方向之一。壳聚糖分子中含有羟基和氨基等活性基团,可通过化学修饰改善其水溶性,如通过羟基化反应、羧基化反应、硫酸脂化反应、氰化、醚化、醛亚胺化、叠氮化、成盐、螯合、水解、氧化、降解、接枝与交联等,可制备出溶解性良好,具有不同性能和功效的衍生物,从而扩宽其应用领域,提高应用价值^[11,12]。

壳聚糖的化学改性的主要类型有以下几种:酰化、醚化、N-烷基化、脂化等。在众多的化学改性,醚化反应之一的羧甲基化是研究比较多的一种。

1.3 羧甲基壳聚糖^[13]

羧甲基壳聚糖(Carboxymethyl chitosan, CMCS)是壳聚糖经羧甲基化反应后的一类壳聚糖衍生物。由于壳聚糖分子中存在游离氨基和羟基,反应时取代基可进入O(C6)和N(C2)。则相应的产物有O-羧甲基壳聚糖(O-CMCS)、N-羧甲基壳聚糖(N-CMCS)和N,O-羧甲基壳聚糖(N,O-CMCS)。

由于羧甲基壳聚糖结构的特殊性,含有活泼的-OH、-NH₂等活性基团,在N或O上可引入其他活性基团,改善其溶解性和生物活性,甚至产生新的活性功能。因此进一步拓展羧甲基壳聚糖及其衍生物的应用领域以及壳聚糖的配位化学研究,开展羧甲基壳聚糖及其衍生物金属配合物的制备、结构、理化性质和功能活性研究是重要的研究方向之一。

1.3.1 羧甲基壳聚糖的制备

壳聚糖C6位置上的羟基以及C2上的伯氨基均可能发生羧甲基取代反应,按取代位置的不同,壳聚糖的羧甲基衍生物可以分为三种:O-羧甲基壳聚糖, N-羧甲基壳聚糖, N,O-羧甲基壳聚糖。N-羧甲基壳聚糖(N-CMCS)的取代仅发生在C2位的自由氨基上;O-羧甲基壳聚糖(O-CMCS)的取代发生在C6位的羧基上, C2位的自由氨基不发生取代;N,O-羧甲基壳聚糖(N,O-CMCS)在C2和O6位都

有取代反应。

由于C3位空间位阻效应以及C3和C2分子间氢键作用，使C3位较难发生取代反应，而以C6-O羧甲基为主，对于C6-OH和C2-NH₂来说，在碱性条件下羧甲基在羟基上的取代活性要高于氨基，只有取代度接近1和高于1时，才会同时在氨基上发生取代，形成N,O-甲基壳聚糖^[3]。

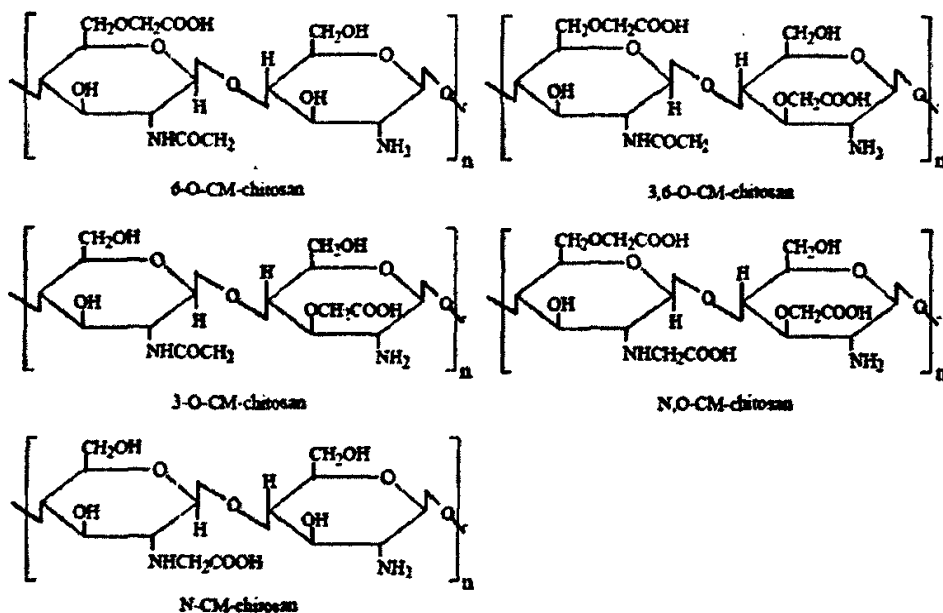


图1.5 羧甲基壳聚糖的分子结构示意图

Fig1.5 The molecular structure of Carboxymethyl chitosan

1.3.1.1 O-羧甲基壳聚糖的制备方法按羧化试剂可分为乙醛酸法和氯乙酸法。

(一) 乙醛酸法^[14-16]

乙醛酸与壳聚糖的2位氨基发生反应得到希夫碱，经过氢化钠还原得到N-羧甲基壳聚糖。这个反应的特点是选择性取代，不需要加热，容易进行，产物结构简单。

(二) 氯乙酸法^[17-19]

一氯乙酸在碱性条件下与壳聚糖的6位羟基或2位氨基均可发生取代，所以最终产物是各种羧甲基壳聚糖的混合物。氯乙酸法按照原料可分为两类：一以壳聚糖为原料；二以甲壳素为原料即甲壳素脱乙酰化-羧甲基化连续制备。

1.3.2 羧甲基壳聚糖的优良性能^[20]

羧甲基壳聚糖是一种水溶性壳聚糖衍生物，有许多特性，如抗菌性强，具有保鲜作用，是一种两性聚电解质。羧甲基壳聚糖在日化、食品、造纸、制药、化妆品等方面都有着各自重要的用途，这主要是因为其具有如下优良性能：

- ①水溶性：取代度大于 0.6 的羧甲基壳聚糖易溶于水，取代度愈高，水溶性愈好，其溶液的透明度也愈好。
- ②保湿性：羧甲基壳聚糖上的羧基及胺基都是亲水基团，有着较强的吸水性，0.25%的羧甲基壳聚糖溶液的吸湿度与 20%的丙三醇相当，溶液的粘度恒定。
- ③成膜性：羧甲基壳聚糖有较好的成膜性，其膜具有光泽，透明而柔韧，并有较好的透气性。
- ④高分子性能：对胶体有稳定作用，有增稠、凝胶的作用和气泡稳定作用。
- ⑤安全无毒性：羧甲基壳聚糖安全、无毒、无害。

1.4 壳聚糖/羧甲基壳聚糖的应用现状与前景展望

1.4.1 在医药医学方面的应用^[21~25]

(一) 外科手术线

壳聚糖具有生物降解，无毒以及生物相溶性，可用制造外科手术线。将壳聚糖溶于醋酸尿素混合物的水溶液中过滤，再加入氢氧化钠和乙醇的凝聚液，经拉伸、干燥制成的细纤维可作缝合线。这种缝合线强度好，可长期存放，能用常规法消毒、染色、掺入药剂、被人体组织液降解，伤口愈合后无须拆除手术线，免除了患者拆线的痛苦。N-CMCS适合于阻止组织间粘结，以其凝胶或膜用于外科手术，由于羧甲基壳聚糖形成的凝胶粘度和弹性大于血浆，可阻止血液在组织表面凝结从而阻止结块。

(二) 人造皮肤

壳聚糖制成的人造皮肤，目前可以认为是一种理想的材料，它柔软、舒适，与创伤面的贴合性好，既透气、又吸水，具有抑制疼痛和止血的功能，有抑菌消炎作用，随着创伤慢慢愈合，自身皮肤生长，能自行溶解而被机体吸收，免除了揭除时流血多及病人的痛苦，也不会留下碎屑而延缓伤口的愈合，相反会促进皮肤的再生，对治疗高热创伤特别有效。从20世纪40年代开始，就已有研究壳聚糖人造皮肤了。日本和我国都已能生产并已付诸实用，日本生产的人造皮肤如 BeschitinW (BSW) 厚度0.12 mm，具有止血、止疼、抗溶化及促进表皮形成等

功能^[26]。

（三）抗肿瘤作用

癌细胞会释放大量的癌毒素，此毒素会降低人体血清中的铁质，使人贫血，食欲减退，低聚壳聚糖在人肠内形成的小分子很容易被肠吸收，可以抑制癌毒素在体内的释放，同时，低聚壳聚糖吸附在血管壁细胞的表面，可抑制癌细胞的转移。细胞之间黏附力下降，组织遭破坏。带阳电荷的聚阳离子电解质能吸附到肿瘤胞表面并使电荷中和，从而抑制了肿瘤的生成和转移^[27]。

（四）药物载体

药物载体是药物制剂生产的必须材料，随着药物制剂向“三效”（高效、高速、长效）和“三小”（毒性小、副作用小、剂量小）发展，具有无毒、无刺激、无免疫原性、无热源反应、不溶血、无致突变性及可自然降解、良好的组相容性、良好的缓释和控释作用的甲壳素和壳聚糖成为一个研究的热点。壳聚糖及其衍生物作为药物载体，在运送药物上可以稳定或保护药物中的成分，促进药物的吸收，延缓或控制药物的释放，帮助药物送达目的器官。

（五）抑菌杀菌功能^[28]

壳聚糖能抑制多种细菌的生长和具有抗真菌活性，尤其对真菌和丝状菌类有独特的效果。因此可作为天然抗菌剂进一步开发利用。早在 1979 年，Allan 等就提出壳聚糖具有广谱抗菌性。伊滕由雄报道了壳聚糖对各类细菌和真菌的完全抑制的最小阻止浓度（MIC 值）^[29]。在细菌中包括溃疡菌（*Corinobacterium michiganence*）10 $\mu\text{g/mL}$ 大肠杆菌（*E.coli*）、黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）为 20 $\mu\text{g/mL}$ ，软腐菌（*Frwinic Sp*）和黑腐菌（*Xanthomonas campestris*）均为 500 $\mu\text{g/mL}$ ；在真菌中包括灰色霉菌（*Botrylis cinerea*）10 $\mu\text{g/mL}$ ，斑点菌（*Drechslera sorokiniana*）为 10 $\mu\text{g/mL}$ ，一个典型的植物病原真菌——镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）的 MIC 值也仅为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，显示出非常高的抗菌活性。

由于壳聚糖在碱性条件下溶解性较差，因此限制了它的应用。Kim 等^[30]在壳聚糖的氨基上接上了不同长度的烷基，制备了一系列的壳聚糖季铵盐衍生物。由于壳聚糖的衍生物在酸性和碱性条件下都可溶，因此有着更广泛的应用。对抗菌性能的研究表明经过改性的壳聚糖抗菌活性有所提高，而且抗菌活性随着烷基

链的增长而增加。Shin 等^[31]用可溶性的壳聚糖衍生物对纤维进行了预处理,得到具有抗菌活性的纤维制品。由于壳聚糖具有微细的小孔结构,有毛细管作用,可以迅速散发吸收的汗液,使细菌不易附着并滋生,从而增强了抗菌的效果。Song 等^[32]将壳聚糖接枝到海藻酸上,以赋予化合物抗菌性能。李治等^[33]研究了 O-羧甲基壳聚糖对金黄色葡萄球菌的抗菌性能,结果表明 O-羧甲基壳聚糖具有一定的抗菌性,其抗菌活性随着羧甲基化度的升高呈现出先升后降的规律。同壳聚糖相比, O-羧甲基壳聚糖在比较宽的羧甲基化度范围内表现出了更强的抗菌性。杨冬枝等^[34]考察了壳聚糖的浓度、脱乙酰度、分子量及 pH 值等因素对壳聚糖抗菌活性的影响,并初步探讨了壳聚糖的抗菌机理。结果表明,在研究的范围内,随着浓度和脱乙酰化程度的提高,抗菌活性提高;随着分子量的增加,抗菌活性出现先增强而后略有减弱的趋势,转折点在 9.16×10^4 前后;在 pH 值为 6.5 左右,抗菌活性最好。

羧甲基壳聚糖具有抑菌杀菌功能,口服羧甲基壳聚糖具有促进肠内共生有益菌群的繁殖如双歧杆菌的繁殖,抑制有害菌的生存,提高身体免疫力,有显著的降血脂及胆固醇的作用,并能清除机体内的铅、汞^[35],羧甲基壳聚糖对口腔变形链球菌和口腔乳酸杆菌有一定的抑制作用,可用于抑菌消炎的含片及口香糖的添加剂,以防治咽喉炎、口腔溃疡、齿龈炎、龋齿等^[36]。湛学军等^[37]合成了羧甲基壳聚糖银配合物,发现其对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌等烧伤感染常见致病菌有抑制作用,可作为一种新型的预防、治疗烧伤感染的药物。壳聚糖羧甲基化后,与磷酸钙生成螯合物,它可促进骨骼的矿化,在医药上可作为成骨的促进剂^[38]。研究表明^[39],在磷酸盐稀溶液中,Fe-壳聚糖结合磷酸盐的能力比 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 、 CaCO_3 、 MnCO_3 强得多,Fe 的壳聚糖配合物可用作口服磷酸盐吸收剂,能够促进肠道中磷酸盐的排泄,从而治疗长期服用含 Al^{3+} 的磷酸盐结合剂药物而导致的慢性肾衰竭病人体内 Al^{3+} 的蓄积。

1.4.2 在农业方面的应用

用羧甲基壳聚糖的水溶液处理玉米种子,能促进玉米种子的萌发,提高发芽率和发芽势。用其处理抽穗期的玉米穗轴和花丝,与未处理对照相比,玉米种子贮藏蛋白的含量提高 10.8%,其中醇溶蛋白含量提高 33.8%。发育中的籽粒的谷氨酰氨合成酶,谷氨酸脱氢酶及谷丙转氨酶活性明显提高,而蛋白水解酶活性下

降。这一结果表明,羧甲基壳聚糖可作为一种新型的植物蛋白质生长调节剂,提高玉米等粮食产物的品质和蛋白质的含量^[40]。另外,玉米和花生中的黄曲霉素是*Aspergillus flavus*和*A.parasiticus*产生的次级代谢产物,对人体和动物有毒害作用,N-Cmchitosan可使黄曲霉素减少90%以上,而真菌生长降低到一半以下,产毒性真菌细胞显示,N-Cmchitosan的存在抑制了孢子发芽和真菌体孢子形成^[41]。

1.4.3 食品工业上的应用

壳聚糖和羧甲基壳聚糖溶于水,可在果蔬表面形成薄膜,也可用于水果、蔬菜、肉类的涂膜保鲜。水果、蔬菜的生产旺季,果蔬的腐烂率达25%~40%,而常用的保鲜剂“京B”、“仲丁胺”均有毒性,“森柏尔”价格昂贵,保存期短。羧甲基壳聚糖配以蔗糖脂、羧甲基纤维素和阿拉伯树胶等助剂可制成一种纯天然、无毒副作用的效果好价格低的保鲜剂。羧甲基壳聚糖的螯合作用应用在肉类的保鲜方面,能避免己醛和不愉快的气味生成,起到抗氧化的效果^[42]。

在肉类罐头中添加一定量的壳聚糖后,不仅能起到保鲜作用,而且它还可以与脂肪酸结合,不被肠胃吸收,可作为低热、减肥食品^[43]。食醋若经过壳聚糖吸收处理,可以吸附除去醋中有害杂质酚类物质,贮存一年不变质,不沉淀。还可用作食品增稠剂,制造冰淇淋、雪糕、蛋白面包、果酱等。其效果为使用羧甲基纤维素的10~20倍^[44]。

1.4.4 化妆品工业上的应用

羧甲基壳聚糖由于其优良的水溶性、乳化性、成膜性能适于制备水质性化妆品的功能性成分。它在水中的粘度比其它的保湿剂要高,持续保湿性优于透明质酸,可代替昂贵的透明质酸用于高级护肤品,而它对皮肤的保健作用与透明质酸相同。在加热过程中它不易发生粘度降低、凝胶化、沉淀等变化。0.25%的羧甲基壳聚糖水溶液在广泛的pH值范围内,即使是高温和长期加热,都非常稳定。特别适合于那些需要加热和杀菌的化妆品。如清洗液,洗面奶等。另外它还可用于头发高级固形剂,无毒且头发光泽好,还有抗静电作用^[45]。

1.4.5 废水处理工业上的应用^[46-48]

壳聚糖的糖残基在C:上有一个乙酰基或氨基,在C3上有一个羟基,从构象上来看,它们都是平伏键,这种特殊结构,使得它们对具有一定离子半径的某些金属离子在一定的pH值下具有螯合作用,也可有效的吸附溶液中带电荷的悬浮

物和有机物等。壳聚糖作为天然高分子螯合剂，无毒无副作用。工业上，用羧甲基壳聚糖处理毛巾厂的印染废水，羧甲基壳聚糖在pH 3.0~5.0，加入量在70 ppm下处理效果最佳。实验表明，用壳聚糖处理污水，其悬浊物浓度、化学需氧量都大幅度降低，达到排放标准。它做污水处理的絮凝剂效果远好于常用的聚丙烯酰胺，O-羧甲基壳聚糖是阳离子型絮凝剂，它不仅表现在可通过电荷中和而使悬浮胶体离子絮凝，而且还可以与带负电荷的溶解物进行反应，生成不溶性盐。

壳聚糖及其衍生物由于分子中羟基、氨基以及其它基团的存在，对许多金属离子有螯合作用，能有效的吸附和捕集溶液中的重金属离子，但不吸附天然水中的碱金属和碱土金属离子，原因是这些金属离子半径较小。壳聚糖是一种污水处理的理想材料。壳聚糖对若干金属离子的吸附量见表。

表 1.1 壳聚糖对金属离子的吸附量

Table 1.1 The absorption of the chitosan to metal ions

金属离子	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Au ²⁺	Pt ²⁺	Ni ²⁺	Pd ²⁺
吸附量/mmol·g ⁻¹	5.6	2.78	3.70	3.12	5.84	4.52	3.15	6.28

羧甲基壳聚糖还可用于水中镉离子的。羧甲基壳聚糖可做为稀有金属吸附剂，回收贵重金属，也可做为果酒等的澄清剂。它可用做金属涂锌添加剂，使涂层致密均匀、平整抗蚀性好、抗拉强度高、光洁度好。以羧甲基壳聚糖作为阻垢剂，对硫酸钙水垢有良好的阻垢效果。此外，壳聚糖及其衍生物还可应用于含染料、蛋白质、放射性元素等物质废水的处理。随着环保要求的提高，壳聚糖在环保领域中的作用将日益明显。

1.4.6 纺织工业方面的应用

用壳聚糖醋酸溶液作直接染料和硫化染料的固化剂，不仅可增进织物和花布的耐光、耐磨、色泽经久不褪色等特性，而且使织物富有华爽和硬挺的外观。晴纶、涤纶等合成纤维及羊毛、丝纤维等织物难于染色，若用壳聚糖和铬(+3)-对氨基苯甲酸络合物混合水溶液处理干燥后，由于静电作用及共价键作用，在织物表面形成一层牢固的薄膜，它对染料有很强的结合力，使染料牢固地吸附在织物表面，且具有抗静电作用，棉毛织物经壳聚糖醋酸溶液处理后，可改善其洗涤性能，

降低其皱缩率, 增加可染性。

壳聚糖粘胶纤维共混进行纤维改性是目前纺织品抗菌加工的重要手段与途径, 以微细壳聚糖及其衍生物为抗菌剂, 以N, O-羧甲基壳聚糖为增溶剂加入到粘胶长丝纺丝液中, 经湿法纺丝制备而成的抗菌纤维, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色链球菌均有较好的抑菌效果^[49]。

1.4.7 在催化方面的应用^[50]

壳聚糖金属配合物作为人工模拟酶和高分子金属催化剂的研究对象, 已显示出诱人的发展前景。壳聚糖与 Cu^{2+} 形成的配合物可作为烯类单体, 如甲基丙烯酸甲酯和丙烯腈的引发剂, 反应体系产生了氨基游离基, 同时, Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , 并发生了游离基的转移作用, 使 CCl_4 产生了三氯甲基游离基, 从而引发聚合反应, 引发活性取决于配合物的结构及稳定性^[51,52]。关怀民等^[53]报道了壳聚糖-Cu(Ni)配合物的合成、表征及其对 MMA 聚合反应的催化作用。Yaku 等^[54]报道壳聚糖 Cu^{2+} 配合物在常温常压下显示氧化还原催化活性, 能使过氧化氢的分解速度提高10倍, 并认为具有酶催化反应机理。

1.5 凝胶的定义和分类^[55, 56]

凝胶(Gel)可以定义为含有大量溶剂的三维网状结构的高分子。其网络由大分子主链及含有亲水性(极性)基团和疏水性基团, 或有解离型基团的侧链构成。具有三维网络结构的交联高分子与溶剂相互作用时发生溶胀, 但由于具有交联结构使其溶胀行为受到限制。溶胀的程度决定于交联密度, 交联密度越高溶胀度越小。溶胀凝胶一般呈现出固体和液体之间的物质形态, 随着化学组成以及其他各种因素的改变, 凝胶的形态可在猫性液体和固体之间变化。

凝胶根据溶胀剂的不同可分为三类:以水为溶胀剂的高分子水凝胶(Hydrogel)和以非水性有机物为溶胀剂高分子油性凝胶(Lipogel)及气性凝胶(Aerogel)。

1.5.1 水凝胶的分类^[56~59]

水凝胶有各种各样的分类方法:

根据水凝胶的网络键合作用的不同, 可分为物理凝胶和化学凝胶。物理凝胶是通过物理作用如静电作用、氢键、链的缠绕等形成的。化学凝胶是由化学键交联形成的三维网络聚合物, 性能较物理凝胶稳定。

根据水凝胶对外界刺激的响应情况可分为传统的水凝胶和环境敏感的水凝

胶两大类。传统的水凝胶对环境的变化如温度、pH等的变化不敏感，而环境敏感的水凝胶是指自身能感知外界环境(如温度、pH、光、电、压力等)微小的变化或刺激，并能产生相应的物理结构和化学性质变化甚至突变的一类高分子凝胶，也称为刺激响应性凝胶。

根据来源的不同，水凝胶可分为天然水凝胶和合成水凝胶。天然高分子组成的水凝胶在生物相容性、细胞控制降解、无毒、应用安全上有潜在的优势。但天然高分子水凝胶因其来源不同，结构与性能存在批次间差异，故有其局限性。相对而言，合成聚合物水凝胶能精确控制其结果及功能，且可供选择的品种较多。但与天然高分子材料相比，合成高分子材料必须严格地控制材料中混杂的未反应单体、残余引发剂或催化剂和小分子副产物等，以避免可能产生的生物不相容性和药物的不良相互作用问题。近几年不少科学家开始了天然高分子与合成高分子的共混合成水凝胶的研究工作，这也将是今后的一个重要研究方向。

根据凝胶受到刺激信号的不同，可分为温度敏感性水凝胶、pH敏感性水凝胶、电场敏感性水凝胶、光敏感性水凝胶、化学物质敏感性水凝胶、磁场敏感性水凝胶等。

根据水凝胶大小形状的不同，有宏观凝胶与微观凝胶(微球)之分，根据形状的不同宏观凝胶又可分为柱状、多孔海绵状、纤维状、膜状、球状等，目前制备的微球有微米级及纳米级之分。

以上介绍的都是单一信号响应的水凝胶，根据需要研究者又开发了多重信号响应水凝胶，研究最多的是双重敏感水凝胶，如pH/温度敏感水凝胶、光热敏感水凝胶、电热敏感水凝胶等。其中以pH/温度敏感水凝胶的研究尤为活跃，如Park^[60]等用温度敏感的NIPAAm与pH敏感的阳离子单体DMAAAM以97/3的摩尔比共聚，制备了pH和温度敏感水凝胶。结果pH敏感区在7.4,温度敏感区为370℃凝胶的溶胀度变化最大。卓仁禧^[61]等合成了具有温度及pH双重敏感的PAAc/PNIPAAm IPN水凝胶，在酸性条件下，凝胶溶胀度随着温度的升高而增大；在弱碱条件下，温度低于PNIPAAm的临界溶解温度(LCST)时，凝胶的溶胀度随着温度的上升而增加，当温度达到LCST时，凝胶溶胀度急剧下降，并随着温度上升而下降。Hoffman^[62]等通过接枝共聚也制备了具有温度及pH双重敏感水凝胶。

1.5.2 智能水凝胶的定义及性质

智能水凝胶是对外界环境(如温度、pH、离子强度、光和特异化学物质等)细微变化而做出响应的一类水凝胶。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,由于其含水量、结构等方面与生物组织相似,因此具有十分良好的生物相容性。当凝胶受到外界刺激时,凝胶的体积会发生改变,甚至会发生非连续的体积变化,即体积相转变(Volume Phase Transition)^[63,64],研究表明,这类水凝胶在生物质的分离提纯、药物的控制释放、人工肌肉、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都有非常广泛的应用前景。

1968年Dusek和Patterson^[65]作出理论预测,认为水凝胶可发生不连续的体积相变。于是科学家用人工的高分子水凝胶进行了广泛深入地研究,上世纪70年代末, Tanaka等人^[66]首先发现了凝胶的体积相变(Volume Phase Transition, VPT),从此智能凝胶的研究获得快速发展,其应用研究也遍及诸多领域。

1.5.2.1 智能凝胶的应用

许多的生物组织就是以生物大分子如蛋白质、多肽、碳水化合物和核糖核酸等形成的网络,以及网络中充满了液体的凝胶。这些生物凝胶能够对环境产生很敏感的特性,并激发细胞独特的功能。因此,人们模仿生物组织所具有的特殊传感、处理和执行功能,发展成一门具有潜在广泛应用的智能高分子材料,其用途如下表所示^[67]:

表1.2 智能凝胶在不同领域的应用

Table 1.2 The applications of intelligent gels in different fields

领域	用途
传感器	光、热和pH离子选择传感器, 免疫检测, 生物传感器, 断裂传感器
驱动器	人工肌肉, 微机械
显示器	可由任意角度观察的热、盐和红外敏感显示器
光通信	温度和电场敏感光栅, 用于光滤波器和光控制
药物载体	信号控制释放, 定位释放
大小选择分离	稀浆脱水, 大分子溶液增浓, 膜渗透控制
生物催化	活细胞固定, 可逆溶胶生物催化剂, 反馈控制生物催化剂, 传质强化

生物技术	亲和沉淀, 两相体系分离, 制备色谱, 细胞脱吸
智能催化剂	温敏反应“开”和“关”催化系统
智能织物	热适应性织物和可逆收缩织物
智能调光材料	室温下透明、强阳光下变混浊的调光材料, 阻光部分散射材料
智能粘合剂	表面基团富集随环境变化的粘合剂

1.5.3 高分子水凝胶的制备^[57]

制备高分子水凝胶的方法有多种:

(1) 单体聚合并交联

水凝胶可以由一种或多种单体采用电离辐射、紫外线照射或化学引发聚合并交联而得。为了特定的应用可以使用不同种类的单体以使水凝胶具有特殊的物理和化学性质。一般来说, 在形成水凝胶过程中需要加入少量的交联剂。合成水凝胶的单体很多, 大致可分为中性、酸性、碱性。常用的化学引发剂有热不稳定的过氧化物和氧化还原体系。

(2) 聚合物交联

从聚合物出发制备水凝胶有物理交联和化学交联两种方法。物理交联通过物理作用力如静电作用、离子相互作用、氢键和链的缠绕等形成。化学交联是在聚合物水溶液中添加交联剂。从聚合物出发合成水凝胶的另一种方法是辐射交联法, 即指辐射聚合物使主链线性分子之间通过化学键相连接。许多水溶性聚合物可通过辐射法制备水凝胶。采用此种方法无需添加引发剂。

(3) 载体的接枝共聚

水凝胶的机械强度一般比较差, 为了改善水凝胶的机械强度, 可以把水凝胶接枝到具有一定强度的载体上。在载体表面上产生自由基是最为有效的制备接枝水凝胶的技术, 单体可以共价地连接到载体上。通常在载体表面产生自由基的方法有电离辐射、紫外线照射、等离子体激化原子或化学催化游离基等。

1.6 药物控释体系^[68]

药物的控制释放系统 (Drug Controlled Release System) (CRS) 是药物释放系统 (Drug Delivery System) 中的一种, 它可以使药物以一种预定的速率释放出来, 从而达到控制体内药物浓度的目的。控制释放技术就是将药物或其他活性物质和

基材(通常为高分子材料)结合在一起,使药物或其他生物活性物质通过扩散等方式在一定的时间内,以某一速率释放到环境中的技术。药物释放速率是控制释放技术研究的主要参量。这个参量反映了释放过程的本质特征,为控制释放体系的设计提供了基础依据。一般认为,实现控制释放的方法和机理主要有扩散控制,化学控制,溶剂活化控制及磁控制四种。它主要用于控制药物的释放速度,从而达到投药量少,作用时间长的目的。控制释放技术最早应用于农业方面,主要用于释放化肥、农药及除草剂,60年代开始即向医学界渗透,70年代中期已开始设计相对大的相对分子质量药物(如多肽)的释放。

1.6.1 控制释放的特点

药物从控释制剂中以某种受控形式释放到特定器官或区域,使体内的药物浓度保持一定的供给和消除关系,并且使其稳定在有效浓度范围内。与传统的周期性给药方式相比,主要具有以下优点:

将释放到环境中的药物控制在有效浓度范围内,有效地解决了体内药物浓度忽高忽低、生物利用率低的问题。常规释放药物投药后,药物浓度迅速上升至最大值,然后由于代谢、排泄及降解作用又迅速下降。要将浓度控制在最小有效浓度与最大安全浓度之间比较困难,而控制释放可以在较长的时间内,使释放出的药品浓度保持在有效浓度范围内。

能长时间有效地利用药物,减少用药量。由于控制释放能较长时间控制药物浓度恒定在有效范围内,药物利用率可达 80%~90%。

对药物本身具有增稳作用,对于半衰期短的多肽和蛋白质类大分子药物,可有效保持其生物活性,同时降低免疫原性及宿主降解作用。

有利于实现靶向给药,提高局部的用药浓度,降低机体的总体药物浓度,减少对正常细胞和组织的毒害作用。

减少了用药次数,极大地方便了用药者。

1.6.2 扩散控制释放体系

扩散控制体系是研究的最早、机理最清楚、应用也最为广泛的一种,它可以分为储库型(Reservoir)和基质(Matrix)型两种形式。在储库型系统中药物包埋于高分子膜中,释放速率由药物通过高分子膜的扩散来控制。在基质型系统中,药物均匀分布于基质中,释放速率由药物通过高分子基质的扩散来控制。储

库型系统存在一个致命的问题,就是膜一旦破裂,药物就会全部释放出来,这样在临床应用中就很不安全。而基质型中,药物是以溶解或分散的形式和聚合物基材结合在一起的。这种形式的控制释放膜的表面附近的药品可以顺利地释放,而膜内部的药品需要先扩散到膜表面,然后才能顺利释放。因而药品的释放量随药品扩散迁移到膜表面的距离的增加而下降,也就是说释放量随时间的延长而下降。

1.6.3 化学控制释放体系

化学控释体系是利用高分子基质在释放过程中的化学反应速率来控制药物释放速率的体系。化学控释体系包括降解体系(Biodegrade System)和侧链体系(Pendant System)两类。在降解体系中,药物分散于可降解聚合物中,药物释放受到聚合物材料降解性能的影响,其降解速率决定药物释放速率。在侧链体系中,药物以化学键与聚合物分子相连,靠水解或酶解化学键来释放药物,化学键降解速率决定药物释放速率。高分子药物(Polymeric drug)本身就属于此种体系。其最大的优点是药物本身可在体系中占 80%以上。

1.6.4 溶剂活化体系

溶剂活化体系是利用聚合物载体在膨胀过程中的渗透性,控制药物在聚合物中的释放速度。通常有渗透控制和膨胀控制两种机制。

1.6.5 磁控制体系

磁控制体系是通过振荡磁场的强度来调节聚合物链段的运动性,从而控制分散于体系内药物的释放速率。磁场强度加强,链段运动性增强,药物释放速率加大。

1.7 壳聚糖及其衍生物抗氧化活性研究进展^[50]

自由基(Free Radicals)是指带有不成对电子的分子、原子、原子团或离子^[69]。生物体内产生的自由基以氧自由基(Oxygen Free Radicals)为主,约占95%。氧自由基主要包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)或其质子化产物氢过氧自由基(HO_2^{\cdot})、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(HO^{\cdot})、脂过氧化物自由基(ROO^{\cdot})等^[70]。随着自由基研究的不断深入,对其在生物体内的产生机理及对生物体的作用逐渐被人们认识。现已发现氧自由基在生理状态下,有增强吞噬细胞对细菌的吞噬作用和抑制细菌的增殖、增强机体抗炎和免疫能力的作用。但在某些病理状态下,活

性氧自由基对机体具有巨大的损伤作用,使组织细胞的化学结构发生破坏性反应,可导致核酸主链、蛋白质肽键的断裂、细胞膜脂质的过氧化及细胞的凋亡^[71,72]。从1956年英国学者 Hammar^[73]提出衰老的自由基学说后,众多的研究都表明体内过多未清除的活性氧是造成动物衰老的重要原因。因此研究和寻找对人体友好无毒的外源性自由基清除剂具有重要意义,对其研究已成为当今生物医学、化学、药剂学等领域的重要课题之一。

最近几年的研究表明海洋生物活性多糖也具有较强的抗氧化能力。张尔贤^[72]等发现褐藻类中的鼠尾藻水溶性多糖能有效清除活性氧自由基。田晓华^[74]等用 ESR 法对褐藻硫酸多糖清除活性氧的作用进行了动力学研究。周惠萍等^[75]对浒苔多糖提高 SOD 活力及降低 LPO 含量进行了研究。薛长湖^[76]等以脂质氢过氧化物含量的变化为指标研究了几种合成的硫酸多糖的抗氧化活性。Nicola等^[77]及Riccarch等^[78]分别研究了肝素和硫酸软骨素对 Cu^{2+} 诱导的人血浆低密度脂蛋白 (LDL) 过氧化修饰的保护作用。

壳聚糖及其衍生物也具备一定的抗氧化能力。蒋烜等^[79]采用电子顺磁共振 (ESR) 技术检测发现,不同脱乙酰度、不同分子量的壳聚糖对超氧阴离子自由基和亚油酸脂类自由基具有明显的抑制作用,对亚油酸脂类自由基的抑制率除与壳聚糖的浓度有关外,还随脱乙酰度的增加和分子量的降低有所增强。徐桂云等^[80]制备了分子量为 700~800 的水溶性甲壳低聚糖,采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法证明其具有良好的羟自由基清除作用。林友文等^[81]实验表明,壳聚糖及羧甲基壳聚糖具有体内抗氧化作用,能够降低兔血清中氧化型低密度脂蛋白 (OX-LDL) 及丙二醛 (MDA) 含量,脂质的过氧化过程被抑制。何德庆等^[82]研究表明,壳聚糖能使血清中 LPO (lipid peroxidation) 水平下降,起到延缓衰老的作用。

目前对多糖的研究开展较多,对其抗氧化机理仍未明确。从天然药物中提取出的多糖类物质对氧自由基的抑制作用来看,都有一个共同的结构特征:即含有一个或多个醇(酚)羟基,而其对自由基的清除活性与分子中活性羟基的数目有关。这表明多糖的抗氧化能力可能与其多羟基结构有关。另有文献报道^[83,84]硫酸酯化多糖对氧自由基有明显的清除活性,说明硫酸酯基结构和含量也是影响抗氧化性能的重要因素。总的来说,对壳聚糖及其衍生物抗氧化作用的研究表明,分子量大小、脱乙酰度等是影响其体外和体内抗氧化能力的重要因素。但对于活

性基团的作用方式、作用大小还不十分清楚。进一步提高其抗氧化能力,明确作用机理是其在抗氧化剂领域进一步应用的关键。

综上所述,壳聚糖及其衍生物金属配合物在众多方面具有潜在的应用价值。如何进一步提高其生物活性,研究配合物中各种基团和离子的配位方式、作用机理是使其能够真正得到应用的关键。

1.8 选题目标、研究内容、依据和研究意义

1.8.1 选题目标和研究内容

本研究课题的选题目标为:

- (1) 合成壳聚糖和铜(II)配合物,探讨其最佳合成条件,并开展其在人工海水中的缓释及抑菌性能研究。
- (2) 合成羧甲基壳聚糖,制备羧甲基壳聚糖水凝胶,开展其在药物控释方面的应用研究。
- (3) 合成羧甲基壳聚糖铜希夫碱配合物杀菌剂新型杀菌剂,初步探讨其在人工海水及海水中的缓释性能。
- (4) 合成羧甲基壳聚糖金属配合物,并进行表征,为其进一步应用奠定理论基础。

本研究课题主要围绕羧甲基壳聚糖制备、对其衍生物制备的及衍生物应用性能的研究而展开的。研究的主要内容包括:

- (1) 壳聚糖铜的合成及其在人工海水中的缓释与抑菌性能研究
- (2) 羧甲基壳聚糖的合成及表征
- (3) 羧甲基壳聚糖水凝胶的制备、溶胀性能测定及其在药物控释中的应用
- (4) 羧甲基壳聚糖铜希夫碱配合物的合成及其在海水、人工海水中的缓释性能研究
- (5) 羧甲基壳聚糖金属盐的制备、表征及其清除 O_2^- 自由基性能研究

1.8.2 选题依据及意义

由壳聚糖经衍生化制得的水溶性羧甲基壳聚糖不仅保留了壳聚糖固有的天然无毒、生物相容性、可降解性等优良性能,还具有多种生物活性和多功能反应性。因此探讨其应用性能,开发其衍生物和衍生物的应用性能,并将其用于我们生产和生活的方方面面,将具有不可估量的社会效益和经济效益。

关于羧甲基壳聚糖的研究已有很多报导, 但多集中在合成方法、基本性质、以及利用羧基和氨基对金属离子的络合上。随着对羧甲基壳聚糖研究的深入, 根据其独特的分子结构开发其更广泛的应用性能是当前研究的热点。对于羧甲基壳聚糖应用的研究, 处于最前沿的是应用它的生物活性, 在医药、卫生、环境保护上进行深入的研究。本文合成了壳聚糖铜、羧甲基壳聚糖水凝胶、羧甲基壳聚糖铜希夫碱配合物, 生产和生活的方方面面, 将具有不可估量的社会效益和经济效益。该项工作的意义主要体现在:

(1) 壳聚糖铜抑菌剂的制备及其应用研究把壳聚糖的生物兼容性和金属离子的杀菌作用相结合, 为水产养殖和海洋治理提供具有缓释、控释功能, 且在使用中稳定性好、抗菌活性高、安全性好的新型杀菌剂提供理论依据。

(2) 羧甲基壳聚糖水凝胶制备及其在阿司匹林在人工肠液中控释中的应用, 对具有无毒、无刺激、无免疫原性、无热源反应、不溶血、无致突变性及可自然降解、良好的组织相容性等特性的羧甲基壳聚糖水凝胶在药物载体等方面的应用进行了初步的探讨。

(3) CMCS-Cu(II)-GA凝胶在人工海水及海水中缓释性能的研究, 对克服水产养殖中传统杀菌剂的用前需活化、有毒、药效过短、容易因杀菌剂播撒不均, 造成局部水域浓度过高, 导致鱼虾不适等问题, 为其在海洋赤潮的治理应用及作为水产养殖中的长效杀菌剂提供了一定的理论依据。

(4) 羧甲基壳聚糖配合物的合成, 对以羧甲基壳聚糖为基质制备微量元素补剂的理想配体提供了理论依据, 为今后应用羧甲基壳聚糖衍生物作为清除自由基材料提供了理论依据。

2. 壳聚糖铜抑菌剂的制备及其应用研究

引言

壳聚糖(CMS) 是甲壳素脱乙酰基产物, 是一种天然氨基多糖, 具有生物可降解性、吸附重金属离子、保湿等特点, 其来源非常丰富, 而且可以被生物降解, 具有良好的生物相容性, 因而在食品、医药、纺织、印染、化妆品和环境保护等领域得到了应用^[85, 86]。壳聚糖分子结构中含有羟基、氨基等活性基团, 与金属离子有较强的配位能力, 本文合成了壳聚糖铜配合物, 并通过红外光谱进行了表征。考察了脱乙酰度、温度对产品中铜含量的影响。研究了产品在人工海水中的缓释行为及其对大肠埃希氏菌的抑菌效果。此项研究把壳聚糖的生物兼容性和金属离子的杀菌作用相结合, 期望为水产养殖和海洋治理提供具有缓释、控释功能, 且在使用中稳定性好、抗菌活性高、安全性好的新型杀菌剂提供理论依据。

2.1 实验部分

2.1.1 仪器与试剂

VATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪 (Nicolet), TU-1900 双波长分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司), THZ-82 恒温振荡器(华北实验仪器有限公司), 恒温培养箱 (GHX-9270B-1 型, 上海福玛实验设备有限公司), 蒸汽消毒器(YXQG02) 山东安得医疗科技有限公司, 超静工作台(苏净集团安泰公司), 高压灭菌锅 MLS-3750 型, 电热鼓风干燥箱 A (DGX-9243B-1 型, 上海福玛实验设备有限公司)。

壳聚糖(青岛海汇生物工程公司, 脱乙酰度 85%、90%及 95%), KBr(光谱纯, 国药集团上海化学试剂有限公司), 无水硫酸铜 (A.R, 天津广成化学试剂有限公司), 蛋白胨 (B.R, 天津市巴斯夫有限公司), 牛肉粉 (B.R, 天津市大茂化学仪器供应站), 琼脂 (B.R, 青岛正业化学试剂有限公司), 柠檬酸 (A.R, 天津广成化学试剂有限公司), 氨水溶液 (A.R, 烟台三和化学试剂有限公司), 双环乙酮草酰二脲(BCO) (A.R, 上海科丰化学试剂有限公司), 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) ATCL-25922, 其他试剂均为分析纯。

2.1.2 壳聚糖铜配合物的合成^[86]

取 2.0 g 脱乙酰度为 85%壳聚糖于圆底烧瓶中, 加 50 mL 蒸馏水, 加入一定

浓度的硫酸铜溶液,用醋酸溶液调节 pH 至 3~4,分别置于 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C 的恒温水浴中搅拌反应 4 h。反应完毕后,用蒸馏水洗涤至滤液中无 SO_4^{2-} (BaCl_2 溶液检验),用乙醇和丙酮洗涤,抽滤,55 °C 真空干燥得壳聚糖铜配合物。

用脱乙酰度 90%、95% 的壳聚糖按上述步骤进行实验,得壳聚糖铜配合物。

2.1.3 配合物中铜含量的测定

准确称量 1 g 壳聚糖铜配合物,置于马富炉中 600 °C \pm 20 °C 下灼烧 4 h,按下式计算配合物中铜的质量分数:

$$W_{\text{Cu}}(100\%) = \frac{0.8(W_3 - W_1)}{W_2 - W_1} 100\%$$

W_1 —灼烧至恒重的坩埚的质量

W_2 —坩埚与壳聚糖铜配合物的质量

W_3 —坩埚与产物氧化铜的质量

2.1.4 红外光谱分析

用 KBr 压片法在 4000~400 cm^{-1} 波数范围内,对壳聚糖及壳聚糖铜配合物进行红外光谱分析,谱图见图 2.1。

2.1.5 壳聚糖铜配合物缓释性能的研究^[87,88]

2.1.5.1 溶液的配制

配制 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cu^{2+} 标准溶液; 0.5 g/mL 柠檬酸溶液; 0.1% BCO 溶液: 称取 1.00 g 固体样品于 100 mL 乙醇中, 60 °C 加热溶解, 冷却, 转移至 1000 mL 容量瓶中用水定容; 人工海水 1000 g: 24.7 g NaCl, 4.0 g Na_2SO_4 , 13.0 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 959 g 蒸馏水中。

2.1.5.2 铜标准曲线的绘制

在 25 mL 容量瓶中加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Cu^{2+} 标准溶液 1.00~5.00 mL, 1 mL 柠檬酸溶液, 2 mL 氨水溶液 ($V_{\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$), 10 mL BCO 溶液, 用人工海水稀释至刻度线, 显色 15 min 后, 200 nm~800 nm 全波长扫描, 根据不同 Cu^{2+} 浓度的溶液 λ_{max} 处对应的吸光度值 A, 绘制标准曲线。

2.1.6 壳聚糖铜缓释性能研究

取用脱乙酰度为 95% 于 60 °C 下合成的壳聚糖铜配合物 1.0 g 置于 200 mL 的人工海水中, 匀速搅拌, 每隔 24 h 取 5 mL, 加显色剂, 用人工海水补足 25 mL,

测其 λ_{\max} 处的吸光度 A ，由标准曲线计算缓释析出铜的量。

2.1.7 壳聚糖铜配合物抑菌活性的研究^[89]

抑菌作用研究

① 琼脂培养基的制备

将蛋白胨、牛肉膏、琼脂、氯化钠(质量份数：10/3/15/5)、蒸馏水分别放入烧杯中，加热至沸腾，趁热加氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.2~7.4。分装到 500 ml 三角锥瓶中，锡箔纸封口备用。

② 加壳聚糖铜悬浊液培养基的制备

配制 0.20 g/mL 壳聚糖铜悬浊液，25 °C 下连续搅拌，各取第二、六、九、十三天的悬浊液适量。

将蛋白胨、牛肉膏、琼脂、氯化钠(质量份数：10/3/15/5)、蒸馏水分别放入锥形瓶中，加入刚配好的悬浊液（以后依次加入搅拌第二、六、九、十三天的悬浊液）适量，加热至沸腾，趁热加氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.2~7.4。分装到 500 ml 三角锥瓶中，锡箔纸封口备用。

③ 生理盐水的配制

制取 0.8% 的生理盐水 200 mL，用锡箔纸封口备用。

④ 培养液的制备

将蛋白胨、牛肉膏、氯化钠、蒸馏水分别放入烧杯中，加热至煮沸，趁热加氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.2~7.4。分装到 250 ml 三角锥瓶中(每瓶 50 ml 培养液)，瓶口用纱布和牛皮纸封口备用。

⑤ 琼脂培养基、培养液的灭菌

将分装后的三角锥瓶放入高压灭菌锅中，温度 121 °C，压力维持在 1.5 磅 20 分钟，彻底灭菌。

⑥ 试验菌种的制备

将取自于 -80 °C 的菌种打开干燥菌种管，接种于营养肉汤管内 37 °C 培养 24 h。将肉汤培养管培养物接种琼脂平板，从平板中挑选典型单个菌落接种琼脂斜面，在 37 °C 培养 24 h。再转种斜面 1 次(37 °C，24 h)。用生理盐水将菌落洗下，制成所需浓度的均匀菌液。

⑦ 接种

将活化四次的菌种,接种到培养液中,放到37℃的摇床中,培养24 h,备用。

⑧ 培养平板的制备

将步骤1、2中准备的琼脂培养基倒入培养皿中均匀铺平,待琼脂培养基凝固后,将步骤6中的培养液0.2 ml 加入到培养皿中,用涂布棒铺平。为保证涂布均匀,每培养皿须在无菌条件下涂布3~4 min,备用。

⑨ 将壳聚糖铜配合物准确称量,用蒸馏水溶解,配制成药液浓度为10 mg/ml 的原液,采用十倍稀释法稀释菌液浓度至 10^{-4} ,取后两档稀释液各0.2 mL涂布平板各三个,留平板一个作空白对照。

⑩ 37℃恒温培养箱中倒置培养36 h,取出,加入5 mL 无菌生理盐水,充分振荡将细菌孢子洗入试管中得到菌悬原液,用平板菌落计数法,测定细菌原液的活菌数量,按下式计算抑菌率:

$$\text{抑菌率} = 1 - N_1/N_0$$

其中 N_1 添加壳聚糖铜悬浊液后的平板菌落数, N_0 为空白对照平板的菌落数。

2.2 结果与讨论

2.2.1 壳聚糖铜配合物中铜的含量

由重量法计算不同反应条件下配合物中的铜含量见表2.1。

表 2.1 不同脱乙酰度、不同配合温度下壳聚糖铜配合物中铜的质量分数

Table 2.1 The Mass fractions of copper in the Cu(II) complex of different deacetylation and reaction temperature

脱乙酰度 Deacetylation /%	配合物中铜的质量百分数 Mass fraction / %				
	22℃	30℃	40℃	50℃	60℃
85	8.72	9.03	9.18	9.35	10.63
90	8.53	8.30	9.35	10.14	10.04
95	10.52	10.80	11.14	11.02	11.24

由表 2.1 可知,同一脱乙酰度的壳聚糖在不同温度下对铜离子的配合能力不同,不同脱乙酰度的壳聚糖在同一温度下对铜离子的配合能力也有差异,在本实验条件下,脱乙酰度为95%,温度为60℃为合成壳聚糖铜配合物的最佳条件。

2.2.2 红外光谱分析

壳聚糖(脱乙酰度 95%)及壳聚糖铜配合物(脱乙酰度 95%, 60 °C 合成)的红外光谱见图 2.1。

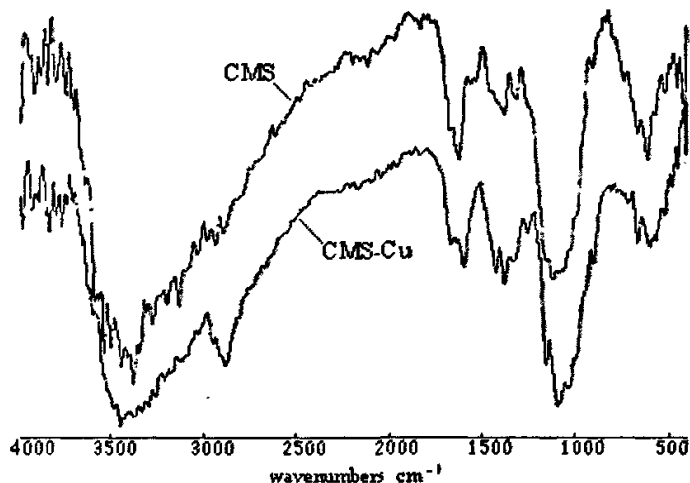


图2.1 CMS、CMS-Cu(II) 的红外光谱图

Fig 2.1 IR spectra of CMS、CMS-Cu(II)

由图 2.1 可知, 3426.5 cm^{-1} 处 CMS 的 N-H、-OH 伸缩振动吸收峰, 在与铜结合形成配合物后, 在 CMS-Cu(II) 的谱图中向低频方向移动到 3375.3 cm^{-1} 处, 且峰形略有变化, 说明 CMS 上的 -NH₂ 参与配位, 配位后, $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{O-H})$ 峰的强度加强, 可能是由于部分 -NH、-OH 参与配位后削弱了分子内氢键造成。位于 1429.30 cm^{-1} 的 CMS 的 C-N 键的伸缩振动峰也向低波数位移到 1367.9 cm^{-1} , 说明壳聚糖与 Cu^{2+} 的螯合作用, 使 C-N 键的强度发生了变化。C-O 键的伸缩振动, 由原来的 1081.08 cm^{-1} 移至 1106.69 cm^{-1} 处且强度增强, 说明壳聚糖上仲羟基也参与了与铜的配位, 由于与 Cu^{2+} 配合, C-O 键发生弯曲, 产生较强的弯曲振动吸收所致。铜配合物中 579.2 cm^{-1} , 487.1 cm^{-1} 处振动峰的出现, 也证实形成了 Cu-N, Cu-O 键。CMS 的 891.61 cm^{-1} 说明 CMS 中有环状的 C-O-C 结构。由于实验所用的 CMS 中存在少量乙酰基, CMS、CMS-Cu(II) 的谱图中 1634.1 cm^{-1} 处有乙酰基中 $\nu_{\text{C=O}}$ 的特征吸收峰^[90]。

2.2.3 铜标准工作曲线

在 200 nm~800 nm 波长范围内对样品进行扫描, 确定 λ_{max} 为 603 nm, 根据不同 Cu^{2+} 浓度的溶液 $\lambda_{603\text{nm}}$ 处对应的吸光度值 A, 绘制标准曲线。

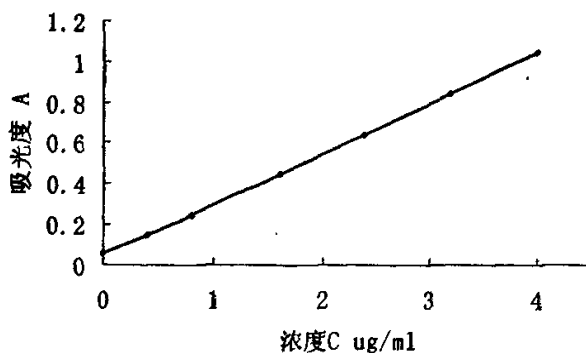


图 2.2 铜标准曲线

Fig 2.2 Specification curve of Cu(II)

所得标准曲线的回归方程： $y = 0.245x + 0.0552$ ， $R^2 = 0.9999$ ，显示出良好的线性关系。

2.2.4 壳聚糖铜的缓释性能分析

壳聚糖铜累积释放曲线见图 2.3。由图可知，壳聚糖铜配合物在人工海水

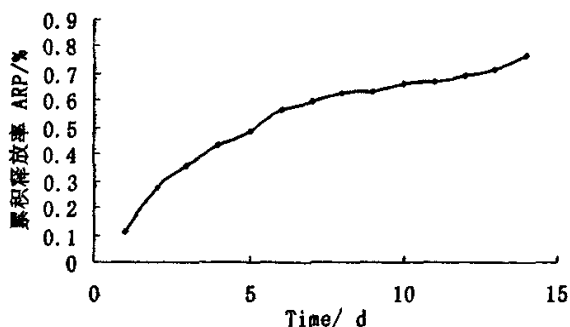


图 2.3 壳聚糖铜累积释放曲线

Fig 2.3 The curve of ARP of the complex of chitosan with Cu(II)

中释放平稳，15 d 的累积释放度仅为 0.76%，说明其在人工海水中具有良好的缓释性能。

2.2.5 壳聚糖铜的抑菌效果分析

搅拌不同天数后，配合物的抑菌率变化情况如图 2.4 所示。

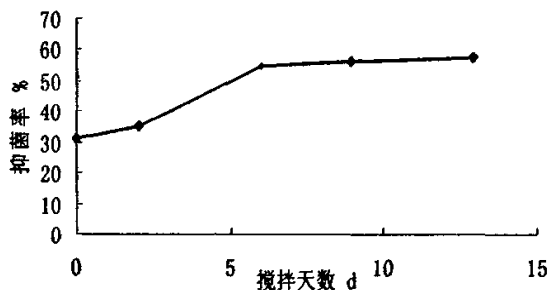


图 2.4 抑菌率变化曲线

Fig 2.4 The curve of antimicrobial rate change

由图 2.4 可知, 配合物本身具有一定的抑菌作用, 抑菌率为 31.5%。随搅拌时间的增加, 配合物中的铜离子缓慢释放, 培养基中铜离子的浓度增大, 抑菌率逐渐增大, 第六天时抑菌率达 54.5%, 第六天以后, 抑菌率上升平稳。

2.3 小结

壳聚糖和铜(II)可形成配合物, 在脱乙酰度为 95%, 温度 60 °C 条件下合成的壳聚糖铜配合物中铜的含量最高。该产物在人工海水中具有缓释行为, 15 天的累积释放度仅为 0.76%。所制得的壳聚糖铜对大肠埃希氏菌具有良好抑制作用, 抑菌第六天时, 抑菌率可达 54.5%。同时, 壳聚糖分子具有质子化铵, 可与细菌带负电荷的细胞膜作用, 聚沉细菌; 并且可以进入细胞内部, 与细胞内物质进一步作用, 扰乱细菌的合成与代谢。配合物可作为新型杀菌剂应用于海水养殖中, 此项研究对海洋治理及水产养殖领域具有潜在的意义。

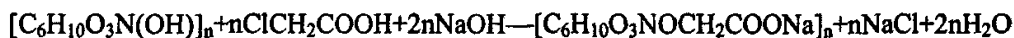
壳聚糖衍生物金属配合物的研制, 将有机基团和无机元素相结合, 既能够降低金属离子本身的毒性, 是很有发展前途的一种新型抑菌剂。铜离子本身具有一定的抑菌活性, 与壳聚糖及羧甲基壳聚糖形成配合物后, 可以大大降低金属元素的使用量, 减少了过量金属离子造成的植物病害, 同时大大降低了由于金属元素大量使用带来的重金属积累而对环境造成的破坏, 对如何引导铜制剂向更有效、更安全和对环境更有意义的领域应用一定的意义。

3 羧甲基壳聚糖制备及其性能测定

引言

壳聚糖的化学改性的主要类型有以下几种：酰化、醚化、N-烷基化、酯化等。在众多的化学改性，醚化反应之一的羧甲基化是研究比较多的一种。羧甲基壳聚糖 (Carboxymethyl chitosan, CMCS) 是壳聚糖经羧甲基化反应后的一类壳聚糖衍生物。由于壳聚糖分子中存在游离氨基和羟基，反应时取代基可进入 O (C6) 和 N (C2)。则相应的产物有 O-羧甲基壳聚糖(O-CMchitosan)、N-羧甲基壳聚糖(N-CMCS)和 N,O-羧甲基壳聚糖(N,O-CMCS)^[13]。

本论文采用以下工艺路线制备羧甲基壳聚糖，即在强碱性环境中，壳聚糖与氯乙酸反应形成羧酸盐结构。其主反应为：



羧甲基壳聚糖上的 6 位上的羟基和 2 位上氨基都可以和一氯乙酸发生取代，3 位上的羟基由于位阻太大，所以很难反应。在碱性条件下，优先在 6 位上的羟基反应，在酸性条件下，优先和氨基反应。一般取代度达到了 0.6 以上，就能够得取很好的水溶性^[91]。

3.1 实验部分

3.1.1 仪器和试剂

电热恒温真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂)，SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)，pHS-2 型酸度计(上海第二分析仪器厂)，NDJ-4 旋转粘度计(海天平仪器厂)，VATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪(Nicolet)。

壳聚糖(青岛海汇生物工程公司，脱乙酰度 85%、90%及 95%)，KBr(光谱纯，国药集团上海化学试剂有限公司)，一氯乙酸(A.R,北京化工厂)，异丙醇(A.R,济南试剂总厂)，氢氧化钠(A.R,淄博化学试剂厂)，其他试剂均为分析纯。

3.1.2 羧甲基壳聚糖(CMCS)制备

称取 5 g 壳聚糖分散于 50 mL 异丙醇中，于磁力搅拌器上室温搅拌溶胀 30 min 后，加入 $w(\text{NaOH}) = 40\%$ 15 mL，45 °C 搅拌碱化 3 h 后，分阶段加入 6.0 g 氯乙酸，转为 60 °C 水浴中恒温回流 3 h 后，倒入烧杯中，冷却，缓慢滴加乙酸，调 pH 值至 7.0，真空抽滤，用 $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70\%$ 洗涤、抽滤，取出产物溶于少量水中，加入丙酮沉淀，抽滤，用无水乙醇洗涤多次，60 °C 真空干燥过夜得白色 CMCS 产品。

3.1.3 羧甲基壳聚糖 (CMCS) 取代度及粘度的测定^[92]

3.1.3.1 羧甲基壳聚糖取代度的测定

称取0.5 g 干燥至恒重的羧甲基壳聚糖于250 mL容量瓶中，移取50 mL $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 标准溶液(含 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠)于其中，振摇，使完全溶解，用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠标准溶液(含 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠)滴定，同时测量pH 值，按下式计算取代度。

$$DS = 0.161A / (1 - 0.058A) \quad A = (V_2 - V_1)M / W$$

式中: A为每g 样品中羧甲基的毫摩尔数;

0.161 为每个乙酰氨基葡萄糖残基的毫摩尔数;

0.058 为每毫克当量的羧甲基质量;

V_1 为pH 2.1 时滴定所消耗的氢氧化钠标准溶液的体积;

V_2 为pH 4.3 时滴定所消耗的氢氧化钠标准溶液的体积;

W为样品净重;

M为氢氧化钠标准溶液摩尔浓度。

3.1.3.2 羧甲基壳聚糖粘度的测定及其影响因素

配制浓度为2%~8%的羧甲基壳聚糖水溶液，在25 °C时测其表观粘度随浓度的变化情况；测不同浓度的羧甲基壳聚糖水溶液的表观粘度随温度的变化情况。

配制4%的羧甲基壳聚糖水溶液，加入不同摩尔浓度的NaCl，考察其对羧甲基壳聚糖表观粘度的影响。

3.2 结果与讨论

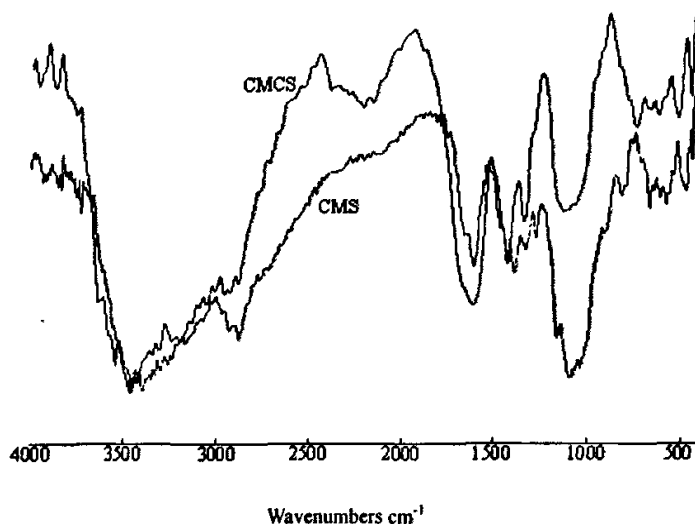


图3.1 CMS、CMCS 的红外光谱图

Fig 3.1 IR spectra of CMS、CMCS

3.2.1 IR分析

从壳聚糖的红外光谱图可以看出, 3457 cm^{-1} 左右是形成氢键缔合的O-H伸缩振动吸收峰与N-H伸缩振动吸收峰重叠而增宽的多重吸收峰; 在 1089.37 cm^{-1} 、 1153.56 cm^{-1} 、 1656.99 cm^{-1} 和 2875 cm^{-1} 处分别是C-O、-O-和乙酰基中C=O、C-H的伸缩振动吸收峰, 其中 1656.99 cm^{-1} 处乙酰基中C=O的伸缩振动吸收峰不明显, 说明壳聚糖的脱乙酰度较高; 1598.14 cm^{-1} 处为伯胺N-H面内弯曲振动强吸收峰; 1381.30 cm^{-1} 处为C-H弯曲和-CH₂对称变形振动吸收峰; 1322.96 cm^{-1} 处的较弱的吸收峰是由C-N键的伸缩振动产生; 1030.08 cm^{-1} 处为伯醇吸收峰; 环 β -1,4的伸缩振动吸收产生 900.26 cm^{-1} 处的峰;

羧甲基壳聚糖红外吸收光谱中出现了羧甲基钠盐的特征吸收峰 1599.42 cm^{-1} , 1416.72 cm^{-1} 吸收峰; 3457.18 cm^{-1} 宽峰是-OH与N-H的伸缩振动峰, 取代后峰变得宽而且弱, 说明壳聚糖中的-OH和-NH₂被取代; 2872.82 cm^{-1} 是甲基, 亚甲基伸缩振动峰减弱, 说明壳聚糖羧甲基化后甲基, 亚甲基的相对含量减少, 由图还可看出羧甲基壳聚糖酰胺I带 1656.99 cm^{-1} 和-COO⁻伸缩振动峰重合成宽峰。

3.2.2 取代度的测定

本实验所制得的CMCS产品的取代度为90.6%。

3.2.3 粘度的测定

在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 浓度分别为2%~8%的羧甲基壳聚糖水溶液的表现粘度随浓度的变化情况如下:

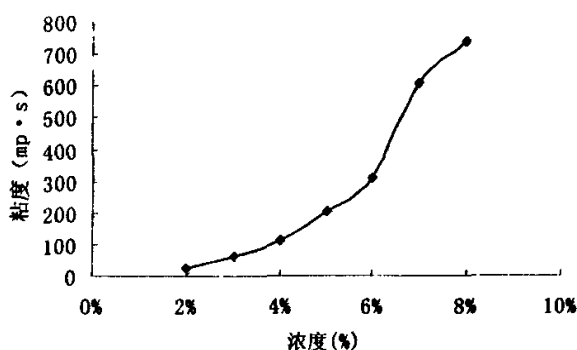


图3.2 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时不同浓度的羧甲基壳聚糖的表现粘度

Fig 3.2 The influence of concentration on apparent viscosity of CMCS at temperature $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

由图3.2可知, 粘度随浓度的增加而先是平滑上升, 在浓度6%附近出现拐点后又迅速上升, 由此可以看出, 温度是羧甲基壳聚糖溶液的表现浓度的一个重要影响因素。

3.2.4 不同浓度的羧甲基壳聚糖不同温度时的表观粘度

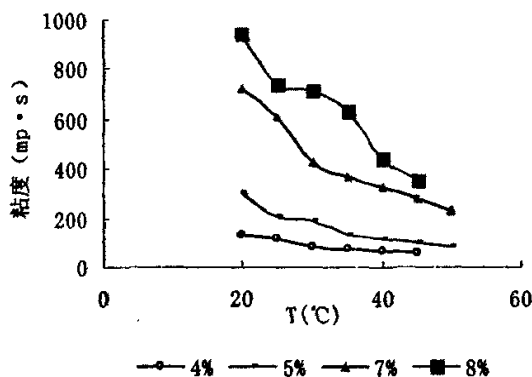


图3.3 不同浓度的羧甲基壳聚糖不同温度时的表观粘度

Fig.3.3 The influence of temperature on apparent viscosity of CMCS at different concentration

如图3.3所示,同一温度时,羧甲基壳聚糖溶液的表现粘度随浓度的增加而增大;同一浓度时,羧甲基壳聚糖溶液的表现粘度随温度升高而降低,且溶液的浓度愈大,其表现粘度受温度影响愈大。以浓度分别为5%、7%的羧甲基壳聚糖溶液为例,当温度从18 °C上升到50 °C时,浓度为5%溶液的表现粘度下降为原先粘度的0.27倍,浓度为7%溶液的表现粘度下降为原先粘度的0.3倍。因为羧甲基壳聚糖在水溶液中是以网状结构存在的,当浓度上升或处于较低温度时,有利于网状结构的形成和保持,所以粘度较大。

3.2.5 电解质氯化钠对羧甲基壳聚糖水溶液表现粘度的影响

配制4%的羧甲基壳聚糖水溶液,2 mol/l 的NaCl 水溶液,加入不同体积的NaCl 水溶液,考察其对羧甲基壳聚糖水溶液表现粘度的影响。

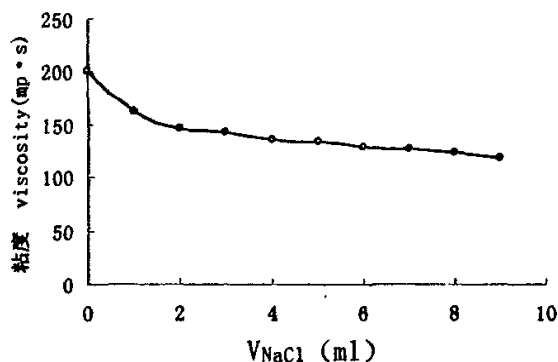


图3.4 加入 NaCl 对羧甲基壳聚糖水溶液表现粘度的影响

Fig.3.4 The influence of NaCl on apparent viscosity-of CMCS

从图 3.4 可以看出, 当加入 NaCl, 会造成体系的表现粘度的下降, 并且表现粘度随加入的 NaCl 量的增大而平缓下降, 羧甲基壳聚糖在水中是以两性性质存在的, 高分子链上的羧基和氨基相互之间存在着较强的静电吸引, 形成较好的网络结构, 当在溶液中加入小分子盐以后, Cl^- 会与氨基发生作用, 而 Na^+ 会和羧基发生作用, 这样就对分子链之间的静电吸引力形成了一定的冲击, 其网状结构就受到一定程度的破坏, 使高分子链逐渐卷曲, 这样就降低了体系的粘度。

3.3 小结

由以上实验结果我们可以得出以下结论:

1. 同一温度时, 羧甲基壳聚糖溶液的表现粘度随浓度的增加而增大;
2. 同一浓度时, 羧甲基壳聚糖溶液的表现粘度随温度升高而降低, 且溶液的浓度愈大, 其表现粘度受温度影响愈大;
3. 加入 NaCl 时, 会造成羧甲基壳聚糖水溶液表现粘度体系的表现粘度的下降, 并且表现粘度随加入的 NaCl 量的增大而平缓下降。

4 羧甲基壳聚糖水凝胶制备及其性能测定

引言

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,对于外界条件的刺激能产生相应的体积相变^[93]。目前对于水凝胶的应用研究涉及非常广泛,在国民生产各个领域都能发现凝胶的应用。

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($-\text{NH}^+$)和阴离子($-\text{COO}^-$)基团的两性聚电解质,具有良好的水溶性、吸水保水性能^[94]。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^[95]。

4.1 实验部分

4.1.1 仪器与试剂

AVATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪 (Nicolet), TU-1900 双波长分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司), THZ-82 恒温振荡器(华北实验仪器有限公司), 旋转粘度计。

壳聚糖(青岛海汇生物工程公司, 脱乙酰度96%), 50%戊二醛(天津市科密欧化学试剂开发中心), KBr(光谱纯, 国药集团上海化学试剂有限公司), 其他试剂均为分析纯。

4.1.2 羧甲基壳聚糖水凝胶(CMCS-GA) 的合成

称取5 g壳聚糖分散于50 mL 异丙醇中, 于磁力搅拌器上室温搅拌溶胀30 min后, 加入 $w(\text{NaOH})=40\%$ 15 mL, 45℃ 搅拌碱化3 h 后, 分阶段加入6.0 g 氯乙酸, 转为60℃ 水浴中恒温回流3 h 后, 倒入烧杯中, 冷却, 缓慢滴加乙酸, 调 pH 值至7.0, 真空抽滤, 用 $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})=70\%$ 洗涤、抽滤, 取出产物溶于少量水中, 加入丙酮沉淀, 抽滤, 用无水乙醇洗涤多次, 60℃ 真空干燥过夜得白色CMCS 产品。

取上述CMCS产品适量, 配制质量浓度为3%的水溶液50 g, 高速搅拌溶解后, 加入一定量的50%的戊二醛(GA), 继续搅拌至粘稠, 真空去除胶体的气泡, 室温下反应4 h。取出在去离子水中浸泡2 h, 抽滤去水, 将所得产物在50℃真空干燥过夜, 得CMCS-GA。

用KBr压片法在4000~400 cm^{-1} 波数范围内对产物进行红外光谱表征。

4.1.3 CMCS-GA 在不同pH值水溶液中溶胀度的测定

称取一定量干凝胶置于不同pH的一次水中,每隔一段时间后取出,用滤纸吸干凝胶表面水分后称其质量,按下式计算其溶胀度(SR), $SR=(W_t - W_0)/W_0$,其中 W_t 为溶胀后凝胶的总质量(g), W_0 为溶胀前的干凝胶质量(g)。

4.1.4 CMCS-GA 在不同温度水溶液中溶胀度的测定^[96]

称取一定量干凝胶置于不同温度的一次水中,每隔一段时间后取出,用滤纸吸干凝胶表面水分后称其质量,按下式计算其溶胀度(SR), $SR=(W_t - W_0)/W_0$,其中 W_t 为溶胀后凝胶的总质量(g), W_0 为溶胀前的干凝胶质量(g)。

4.2 结果与讨论

4.2.1 IR分析

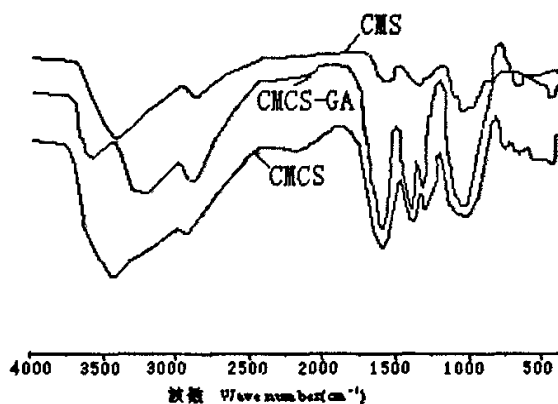


图 4.1 CMS、CMCS、CMCS-GA的红外光谱图

Fig 4.1 IR spectra of CMS、CMCS、CMCS-GA

由图4.1可知,壳聚糖(CMS)、羧甲基壳聚糖(CMCS)的红外光谱图没有显著的差别,但CMCS的红外光谱图在 1618 cm^{-1} 处有羧基的特征吸收峰,说明羧甲基壳聚糖CMCS的生成,CMCS的N-H吸收峰 1413 cm^{-1} 、 1326 cm^{-1} 、 1066 cm^{-1} 与CMS相比有一定的变化,这说明取代反应主要发生在-NH₂活性基团,是以N位为主的羧甲基取代产物^[97, 98]。CMCS-GA的红外谱图与CMCS的红外谱图比较, 3420 cm^{-1} 处的-OH、N-H伸缩振动峰变为两个峰,分别是 3604 cm^{-1} 、 3678 cm^{-1} ,在 1618 cm^{-1} 处的吸收峰较CMCS变尖变强,说明Schiff碱反应发生,形成了-C=N^[99]。

4.2.2 羧甲基壳聚糖水凝胶在不同pH水溶液中溶胀度对时间(min)曲线

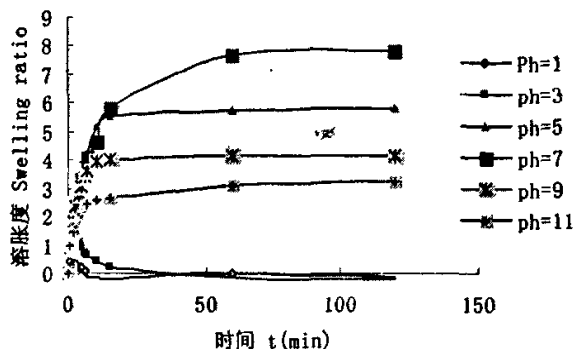


图 4.2 不同 pH 下 CMCS-GA 在水中溶胀度曲线

Fig 4.2 Swelling ratio of CMCS-GA in water solution of different pH

图4.2表明当pH=7时，CMCS-GA 在水中溶胀度最大，在碱性条件下，随pH增大CMCS-GA 在溶液中溶胀度减小，在酸性条件下，随pH减小CMCS-GA溶胀度减小酸性较强时，凝胶溶解。

4.2.3 CMCS-GA 凝胶在不同温度时的溶胀度

用称重法测量不同温度时，CMCS-GA 凝胶的溶胀度，如表 4.1 所示：

表 4.1 CMCS-GA 在一次水中不同温度时中的溶胀度数据

Table 4.1 Swelling ratio data of CMCS-GA in distilled water at different temperature

温度 t/°C	25	30	35	40	45	55
溶胀度	6.0049	9.1418	9.4044	13.5689	9.6321	8.952

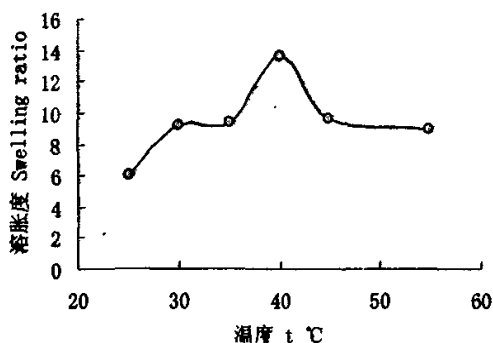


图4.3 CMCS-GA 在一次水中不同温度时中的溶胀度

Fig 4.3 Swelling ratio of CMCS-GA in distilled water at different temperature

由上图可知, 当温度在25 °C~55 °C变化时, CMCS-GA 在水中溶胀度先升高再减小, 在40 °C左右达到最大值13.57。

5 羧甲基壳聚糖水凝胶制备及其在药物控释中的应用

引言

羧甲基壳聚糖(CMCS) 是壳聚糖羧甲基化后的产物,具有良好的生物相容性,有生物黏附性和多种生物活性,无毒无免疫原性,可被体内多种酶生物降解,降解产物无毒且能被生物体完全吸收,是药物缓释的理想载体。普通的阿司匹林片,在体内水解成水杨酸后对胃肠道粘膜有刺激作用,制成缓释片后,药物缓慢释出,在很大程度上可缓解其对胃肠道粘膜的刺激性^[100]。杨红梅等研究阿司匹林壳聚糖缓释片的体外释放作用,证明其释药模式符合 Higuchi 方程^[101]。羧甲基壳聚糖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,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。本实验对壳聚糖改性得羧甲基壳聚糖,然后以戊二醛为交联剂制备羧甲基壳聚糖水凝胶(CMCS-GA),同时以阿司匹林为模型药物,对其进行吸附,观察载药凝胶在人工肠液中的体外释放行为,初步探讨了其释放机制及缓释动力学。

5.1 实验部分

5.1.1 仪器与试剂

AVATAR 360 FT-IR型红外光谱仪(Nicolet), THZ-82恒温振荡器(华北实验仪器有限公司), 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), TU-1900双波长分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), PHS-3B型酸度计(上海精科仪器公司), 电热恒温水浴锅(龙口市先科仪器公司), DZF型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), 乌氏粘度计。

壳聚糖(青岛海汇生物工程公司, 脱乙酰度96%), KBr(光谱纯, 国药集团上海化学试剂有限公司), 50%戊二醛(天津市科密欧化学试剂开发中心), 磷酸氢二钠(AR, 天津市大茂化学试剂厂), 磷酸二氢钠(AR, 天津市巴斯夫化工有限公司), pH 7.4人工肠液由 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 配制, 阿司匹林肠溶片(黄海制药厂, 国药准字H37023121), 其它试剂均为分析纯。

5.1.2 羧甲基壳聚糖水凝胶(CMCS-GA) 的合成

CMCS-GA的合成方法同4.1.2。

5.1.3 CMCS-GA 在人工肠液中的溶胀度的测定^[96]

称取一定量干凝胶置于人工肠液中，每隔一段时间后取出，用滤纸吸干凝胶表面水分后称其质量，按下式计算其溶胀度(SR)， $SR=(W_1 - W_0)/W_0$ ，其中 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)。

5.1.4 阿司匹林在人工肠液中标准曲线的绘制

- (1) 用人工肠液准确配制1 $\mu\text{g/ml}$ 阿司匹林溶液；
- (2) 分别移取0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 标准溶液至50 ml 容量瓶中，用人工肠液定容至刻线。
- (3) 用紫外分光光度计在800 nm-190 nm全波长扫描，确定最大吸收波长 λ_{max} 。
- (4) 测定标准系列在 λ_{max} 处的吸光度，绘制标准曲线。

5.1.5 CMCS-GA对阿司匹林的吸附及载药量测定

准确称取一定质量干凝胶置于一定浓度的阿司匹林溶液中，室温下浸泡6 d 后取出晾干得到载药凝胶。用紫外分光光度计于 λ_{max} 处测定剩余溶液的光密度D，标准曲线法算出其阿司匹林浓度，根据加入干凝胶浸泡前后阿司匹林浓度、体积变化计算凝胶载药量。

5.1.6 阿司匹林体外释放度测定

准确称取一定量载药凝胶，置于pH7.4人工肠液50 mL中，将盛放样品的容器固定在振荡器中，控温(37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ ，振荡速度为每min 30次，每隔一定时间用移液管移取缓冲液5 mL，分别以各自空白作参比，测其在222 nm处的吸光度，加相同体积缓冲液补充到缓释体系中，保持体积恒定在50 mL。标准曲线法计算不同时间阿司匹林从凝胶中释放量及累积释放度，累积释放百分率(Q)的计算公式如下：

$$Q(\%) = (5\sum C_{(i-1)} + 50C_i) / m_0$$

C_i 为第 i 次取样时阿司匹林的浓度， m_0 为所加入阿司匹林总量。

5.1.7 阿司匹林体外释放机制

对阿司匹林体外释放分别按零级动力学、一级动力学和Higuchi方程进行拟合，初步判断其释放机制。

5.2 结果与讨论

5.2.1 阿司匹林在人工肠液中标准曲线的绘制

用紫外可见分光光度计在190nm~800nm全波长扫描，确定最大吸收波长为222nm，测定标准系列在222nm下的吸光度，绘制标准曲线。

表 5.1 不同阿司匹林浓度时对应得吸光度数据

Table 5.1 The Absorbency data of aspirin at different concentration

C (ug/ml)	0.00	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.10
A_{222nm}	0.00	0.31	0.59	1.15	1.44	1.71	1.99	2.28	2.89

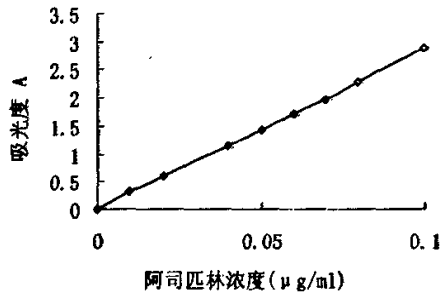


图 5.1 阿司匹林在人工肠液中标准曲线

Fig 5.1 Specification curve of aspirin in simulated intestinal juice

回归曲线方程为： $y=28.54x+0.011$ ， $R^2=0.9997$ ，可见阿司匹林在人工肠液中标准曲线有良好的线性关系。

5.2.2 CMCS-GA在人工肠液中的溶胀度及最大载药量

CMCS-GA在人工肠液中的溶胀度曲线如图2所示，CMCS-GA在人工肠液中2 h达最大溶胀度1.38，标准曲线法计算CMCS-GA凝胶对阿司匹林的最大载药量为4.6 mg/g。

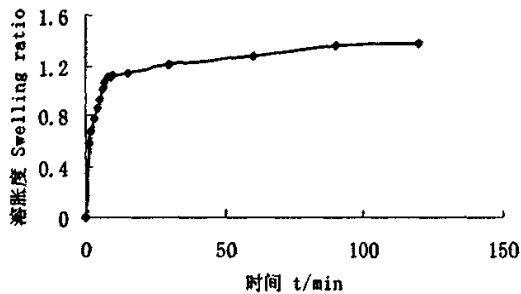


图 5.2 CMCS-GA 在人工肠液中的溶胀度曲线

Fig 5.2 Swelling ratio curve of CMCS-GA in simulated intestinal juice

5.2.3 载药凝胶的体外释放结果

自制阿司匹林壳聚糖缓释片的累积释放率见表5.2。将累积释放百分率(Q)与时间(t)分别按零级动力学、一级动力学和Higuchi方程进行拟合,结果如下:

表 5.2 阿司匹林壳聚糖缓释片的体外累积释放率(%)

Table 5.2 Release of aspirin from aspirin entrapped hydrogel (%)

时间 t(h)	0.5	1	2	3	6	20	25	72	96
累计释放率 Q (%)	17.93	21.15	23.02	29.28	46.22	61.99	68.65	95.25	99.91

表5.3 阿司匹林壳聚糖缓释片的体外释放度拟合方程

Table 5.3 Release profile of aspirin from aspirin entrapped hydrogel

模型 Model	数学方程 Maths equation	R ²	拟合结果 Equation fitted
零级动力学 Zero order	$Q = k t$	0.8593	$Q = 22.271 + 0.0158 t$
一级动力学 First order	$\ln(100-Q) = k t$	0.992	$\ln(100-Q) = 4.436 - 0.0007 t$
Higuchi方程 Higuchi	$Q = k t^{1/2}$	0.9761	$Q = 1.2617 t^{1/2} + 11.883$

由表5.3可知,自制阿司匹林壳聚糖缓释片的释药模式符合一级动力学方程。

5.3 小结

自制CMCS-GA载药凝胶在3 h时累积释放百分率约为29.28%,96 h累积释放百分率为99%以上,1 h~96 h能缓慢释放,释药模式拟合符合一级动力学方程,说明自制CMCS-GA载药凝胶具有优良的缓释性能,可望能为临床提供平稳的血药浓度,减少副作用的发生及给药次数。有关阿司匹林壳聚糖缓释片体内吸收及体外释放度和体内吸收的相关性有待进一步研究。

6 羧甲基壳聚糖铜(II)、铬(II)配合物的合成、表征

引言

希夫碱(Schiff碱)配合物可以用作稳定剂、絮凝剂、催化剂、分析试剂及生物活性导剂,并且在许多方面得到应用。在医学领域,希夫碱具有抑菌、杀菌,抗肿瘤,抗病毒的生物活性。在催化领域,希夫碱的钴和镍配合物已经作为催化剂使用,在分析化学领域,希夫碱作为良好的配体,可以用来鉴别,鉴定金属离子和定量分析金属离子的含量。在腐蚀领域,某些芳香族的希夫碱经常作为铜的缓蚀剂。在光致不变色领域,某些含有特性基团的希夫碱也具有独特的应用。

过渡金属元素中有大部分是人类生命中不可缺少的微量元素,所以其 Schiff碱配合物具有多种优良性能。多年研究发现此类配合物具有抑菌、抗癌和抗病毒等生理功能,有些可用作生物载氧体的模型化合物和一些反应的催化剂等。

6.1 实验部分

6.1.1 仪器与试剂

AVATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪(Nicolet),TU-1900 双波长分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

壳聚糖(青岛海汇生物工程公司,脱乙酰度 96%),50%戊二醛(天津市科密欧化学试剂开发中心),KBr(光谱纯,国药集团上海化学试剂有限公司),无水硫酸铜(A.R,天津广成化学试剂有限公司),其它试剂均为分析纯。

6.1.2 Cu^{2+} 标准溶液的配制及标准曲线的绘制

6.1.2.1 Cu^{2+} 标准溶液的配制

准确称取分析纯 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3929 g 溶于100ml容量瓶中至刻线,从中量取1 ml至1000 ml容量瓶中以蒸馏水稀释至刻度,此时溶液中 Cu^{2+} 的浓度为 $1 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

柠檬酸 $0.5 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$;氨水溶液($V_{\text{氨水}}: V_{\text{水}}=1:1$),双环乙酮草酰二脲溶液0.1%(称取1g固体样品于200 ml烧杯中加入100 ml乙醇,50~60 °C温热溶解后转移至1000 ml容量瓶中,以蒸馏水稀释至刻线)。

6.1.2.2 标准曲线的绘制

在25 ml容量瓶中准确滴加0、2、4、6、8、10 ml $1.0 \text{ ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 标准溶液,再分别

滴加 1 ml 柠檬酸溶液, 2 ml 氨水溶液, 10 ml BCO 溶液摇匀, 蒸馏水稀释至刻度, 15 min 后, 190~800 nm 波长范围内进行全波长扫描, 确定最大吸收波长, 以吸光度 A 对 Cu^{2+} 浓度作图, 得标准曲线。

6.1.3 CMCS-Cu-GA 的制备

取 2 g CMCS 溶解在 50 mL 去离子水中, 调节 pH 至 6.30, 滴加 15% 的 CuSO_4 溶液 22 mL, 常温反应 3 h, 过滤, 用去离子水多次重复洗除游离 Cu^{2+} , 收集滤液, 用紫外分光光度计, 测滤液中 Cu^{2+} 的浓度, 进而计算 CMCS-Cu-GA 所吸附的 Cu^{2+} 含量。

取滤渣悬浮于 12 mL 去离子水中, 加入 50% 戊二醛 1 mL, 室温下反应 3 h, 过滤, 水洗至中性, 洗去多余的戊二醛, 60 °C 真空干燥至恒重, 得 CMCS-Cu-GA 凝胶。

用 KBr 压片法在 4000~400 cm^{-1} 波数范围内对 CMCS-Cu-GA 进行红外光谱表征。

6.2 结果与讨论

6.2.1 Cu^{2+} 在一次水中的标准曲线

用紫外分光光度计在 190~800 nm 波长范围内进行全波长扫描, 测得在 603 nm 处有最大吸光度, 测 Cu^{2+} 不同浓度时 λ_{max} 对应的 A_{max} , 数据见表, 标准曲线见图

表 6.1 不同铜离子浓度对应的吸光度值 A

Table 6.1 The Absorbency of Cu^{2+} at different concentration

C ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0.00	0.05	0.10	0.30	0.40	0.50
$A_{603\text{nm}}(\times 10^{-2})$	0.93	2.00	3.97	5.88	8.01	9.88

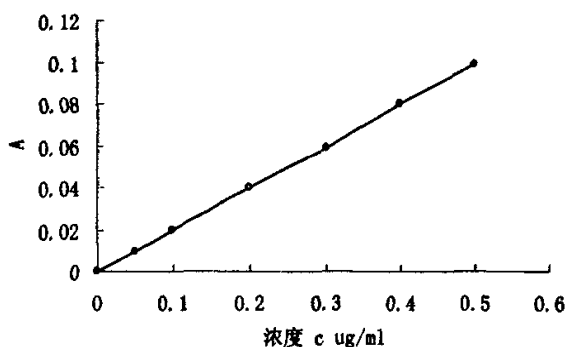


图 6.1 Cu^{2+} 在一次水中的标准曲线

Fig 6.1 Specification curve of Cu^{2+} in distilled water

回归曲线方程为 $y = 0.1986x - 0.0002$, $R^2 = 0.9998$, 由上图可知, 曲线具有良好的线性关系。

6.2.2 CMCS-Cu-GA凝胶中铜含量的测定

由标准曲线计算1 g CMCS-Cu-GA凝胶中所吸附Cu的含量为0.1040 g。

6.2.3 CMCS-Cd-GA 与 CMCS-Cu-GA 的 IR 分析

采用 KBr 压片法在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 波长范围内对样品进行红外光谱扫描。

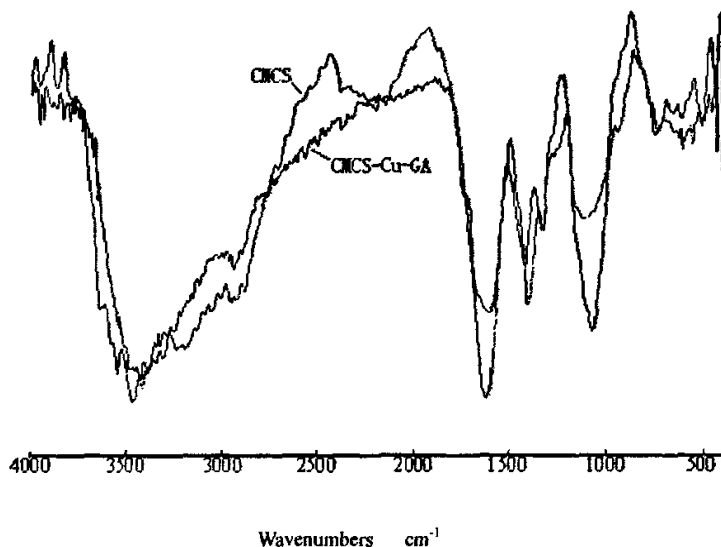


图 6.2 CMCS、CMCS-Cu-GA的红外光谱图

Fig 6.2 IR spectra of CMCS, CMCS-Cu-GA

由图6.2可以看出, 羧甲基壳聚糖铜凝胶 (CMCS-Cu-GA) 与羧甲基壳聚糖 (CMCS) 的红外谱图相比, 位于 3457.18 cm^{-1} 处的吸收峰向低频位移 22 cm^{-1} , 且 CMCS-Cu-GA 吸收峰变尖, 说明 -NH_2 和 -OH 参与了配位反应。CMCS 的红外光谱图在 1599.42 cm^{-1} 处有羧基的特征吸收峰, 反应后 CMCS 变尖变强, 且发生了一定的偏移, 说明 Schiff 碱反应发生, 形成了 -C=N- [99]。 616.51 cm^{-1} 处出现明显的吸收峰, 此处的吸收峰为金属离子与 COO^- 上的氧形成 O-Cu 键所产生的吸收峰。

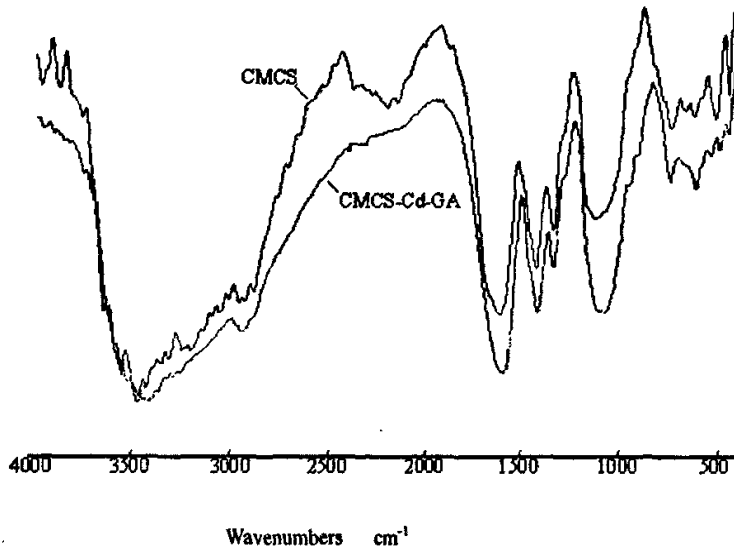


图 6.3 CMCS、CMCS-Cu-GA的红外光谱图

Fig 6.3 IR spectra of CMCS, CMCS-Cd-GA

由图 6.3 CMCS-Cd-GA 与 CMCS 配合物的红外谱图可知: CMCS 位于 1599.42 cm^{-1} 处的 $\delta_{\text{N-H}}$ 吸收峰向高频位移了 9 cm^{-1} , 且在: 1416.42 cm^{-1} 处 COO^- 的对称吸收峰形成配合物后, 向低频位移了 8 cm^{-1} , 说明 $-\text{COO}^-$ 参与了配位; 1089.44 cm^{-1} 处表征仲羟基的吸收峰有一定位移, 向低频位移了 19 cm^{-1} , 这说明 CMCS 分子中的仲羟基参与了配位反应。 1326.05 cm^{-1} 处的吸收峰处 C-N 的伸缩振动峰吸收峰几乎没有变化, 说明 CMCS-Cd-GA 以内盐的形式存在的。

7. 羧甲基壳聚糖铜配合物凝胶在人工海水及海水中缓释性能的研究

引言

对赤潮的治理,已成为全社会共同关注的课题.目前最有效的方法是向洋面播撒 CuSO_4 .也即利用赤潮藻类吸附 Cu^{2+} ,以影响藻类的生长代谢、抑制光合作用,使原生质膜的渗透性受到影响,起到 Cu^{2+} 杀藻的目的^[102],但 CuSO_4 直接投入海水中,容易造成局部 Cu^{2+} 浓度太高,影响非赤潮生物的生长且对生态环境产生副作用。

水产养殖中传统用的杀菌剂二氧化氯存在用前需活化、有毒、药效过短、容易因杀菌剂播撒不均,造成局部水域浓度过高,导致鱼虾不适等问题^[103]。

羧甲基壳聚糖(CTS)是一种无毒、无害,且易降解的天然高分子材料,其分子链上具有活性基团 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 及 $-\text{COOH}$,能够发挥电中和凝聚及粘结架桥絮凝的双重作用.近年来,它作为重金属离子的螯合絮凝剂逐渐应用于水处理中.本实验考察了合成的CMCS-Cu-GA凝胶在人工海水及海水中缓释性能,为其在海洋赤潮的治理应用及作为水产养殖中的长效杀菌剂提供了一定的理论依据。

7.1 实验部分

7.1.1 仪器及试剂

AVATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪(Nicolet), TU—1900 双波长分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

壳聚糖(青岛海汇生物工程公司,脱乙酰度 96%), 50%戊二醛(天津市科密欧化学试剂开发中心), KBr(光谱纯,国药集团上海化学试剂有限公司), 无水硫酸铜(A.R,天津广成化学试剂有限公司), 双环乙酮草酰二脲(A.R,上海科丰化学试剂有限公司), 柠檬酸(A.R,天津广成化学试剂有限公司), 氨水(A.R,烟台三和化学试剂有限公司), 海水(鲁迅公园), 其它试剂均为分析纯。

7.1.2 溶液的配制及标准曲线的绘制^[87]

准确称取分析纯 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.3929 g 溶于100 ml容量瓶中至刻线,从中量取1 ml至1000 ml 容量瓶中以蒸馏水稀释至刻度,此时溶液中 Cu^{2+} 的浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

配制 0.5 g/mL 柠檬酸溶液, 0.1% BCO 溶液: 称取 1.00 g 固体样品于 100 mL 乙醇中, 60 °C

加热溶解，冷却，转移至 1000 ml 容量瓶中，用水定容定容至刻度线。

在 25mL 容量瓶中分别滴加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Cu^{2+} 标准溶液 1.00~5.00 mL, 1 mL 柠檬酸溶液, 2 mL 氨水溶液 ($V_{\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$), 10 mL BCO 溶液, 用人工海水稀释至刻度线, 显色 15 min 后, 190~800 nm 波长范围内进行全波长扫描, 确定最大吸收波长 λ_{max} , 根据不同 Cu^{2+} 浓度的溶液 λ_{max} 处对应的吸光度值 A, 绘制标准曲线。

Cu^{2+} 在海水中的标准曲线的绘制方法同人工海水。

7.1.3 CMCS-Cu-GA 凝胶的制备

同 6.1.3。

7.1.4 CMCS-Cu-GA 凝胶在人工海水及海水中的缓释性能研究

各取 0.5 g CMCS-Cu-GA 凝胶分别置于 200 ml 人工海水及海水中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温匀度磁力搅拌, 每隔一段时间, 取 5 ml 样品, 溶液以空白补足, 标准曲线法计算样品中铜含量, 按以下公式计算溶液中铜的累计释放率:

$$Q(\%) = (5\sum C_{(i-1)} + 50C_i) / m_0$$

C_i 为第 i 次取样时 Cu^{2+} 的浓度, m_0 为所加入 Cu 的总量

7.2 结果与讨论

7.2.1 CMCS-Cu-GA 在人工海水中的缓释性能研究

7.2.1.1 Cu^{2+} 在人工海水中的标准曲线

用紫外分光光度计在 190~800 nm 波长范围内进行全波长扫描, 测得 Cu^{2+} 在人工海水中的最大吸光波长为 600 nm, Cu^{2+} 不同浓度时测其 λ_{max} 对应的 A_{max} , 相关数据见表及标准曲线如下:

表 7.1 不同铜离子浓度对应的吸光度值 A

Table 7.1 The Absorbency data of Cu^{2+} at different concentration

C ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
$A_{600\text{nm}}$	0.0	0.2581	0.5258	0.7759	1.0265	1.2692	1.5383	1.8045

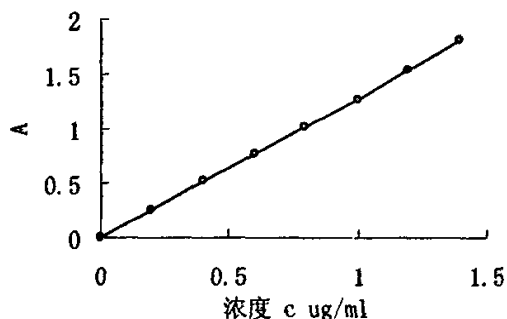


图7.1 铜离子在人工海水中标准曲线

Fig 7.1 Specification curve of Cu(II) in simulated seawater

回归方程: $y=1.2806x+0.0034$, $R^2=0.9998$, 标准曲线显示出良好的线性关系。

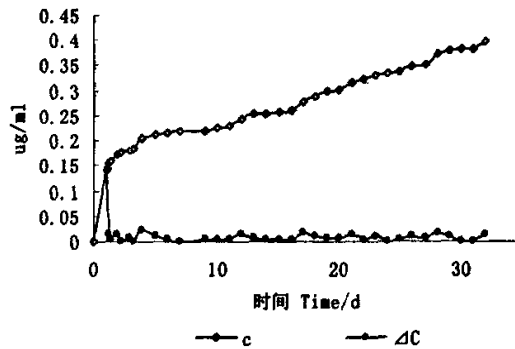
7.2.1.2 CMCS-Cu-GA在人工海水中的缓释

表 7.2 CMCS-Cu-GA 在人工海水中缓释的各项数据

Table 7.2 The release data of CMCS-Cu-GA in simulated seawater

样品/sample	时间 Time (d)	吸光度 A	浓度 c (ug/ml)	累积释放率 (%)
1	1.0625	0.1841	0.1411	0.0543
2	1.1875	0.2023	0.1553	0.06107
3	1.3542	0.2067	0.1587	0.0639
4	1.9792	0.2263	0.174	0.0713
5	2.2708	0.2274	0.1749	0.0733
6	2.9792	0.2351	0.1809	0.0773
7	3.2708	0.2356	0.1813	0.0792
8	3.9583	0.2628	0.2025	0.0891
9	5	0.2756	0.2125	0.0949
10	6	0.2796	0.2157	0.0981
11	7.0208	0.2812	0.2169	0.1007
13	9	0.2847	0.2197	0.1038
14	10	0.2907	0.2243	0.1077
15	11	0.2964	0.2288	0.1116
16	12.0208	0.3155	0.2437	0.1195

17	13.0209	0.3256	0.2516	0.1249
18	14	0.3284	0.2538	0.1282
19	15	0.3340	0.2582	0.1323
20	16	0.3377	0.2611	0.1359
21	17	0.3610	0.2792	0.1454
22	18	0.3744	0.2897	0.1521
23	19	0.3844	0.2975	0.1579
24	20	0.3918	0.3033	0.1630
25	21	0.4098	0.3174	0.1713
26	22	0.4162	0.3223	0.1762
27	23	0.4282	0.3317	0.1829
28	24	0.4302	0.3333	0.1867
29	25	0.4349	0.3369	0.1913
30	26	0.4470	0.3464	0.1982
31	27	0.4544	0.3522	0.2038
32	28	0.4790	0.3714	0.2146
33	29	0.4908	0.3806	0.2217
34	30	0.4921	0.3816	0.2257
35	31	0.4924	0.3818	0.2294
36	32	0.5118	0.397	0.2390

图 7.3 Cu^{2+} 在人工海水中的浓度随时间变化情况Fig 7.3 The concentration of Cu^{2+} and its changing along with time in simulated seawater

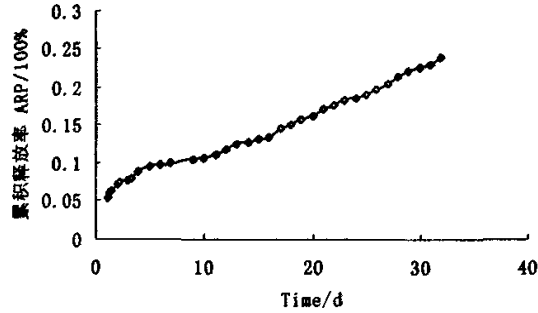


图7.4 CMCS-Cu-GA在人工海水中的累积释放率

Fig 7.4 The curve of ARP of CMCS-Cu-GA in simulated seawater

由以上数据可知, CMCS-Cu-GA 凝胶在人工海水中缓释 32 天的累积释放度为 0.2390%, 且释放平稳, 说明合成的 CMCS-Cu-GA 凝胶在人工海水中具有良好的缓释性能。

7.2.2 CMCS-Cu-GA 在海水中的缓释性能研究

7.2.2.1 Cu^{2+} 在海水中的标准曲线

用紫外分光光度计在 190~800nm 波长范围内进行全波长扫描, 测得 Cu^{2+} 在海水中的最大吸光波长为 598nm, Cu^{2+} 不同浓度时测其 λ_{max} 对应的 A_{max} , 相关数据见表及标准曲线如下:

表 7.3 不同铜离子浓度对应的吸光度值 A

Table 7.3 The Absorbency data of Cu^{2+} at different concentration

C ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
$A_{598\text{nm}}$	0.0	0.0216	0.0530	0.0750	0.0980	0.1332	0.1584	0.1792	0.2107	0.2333

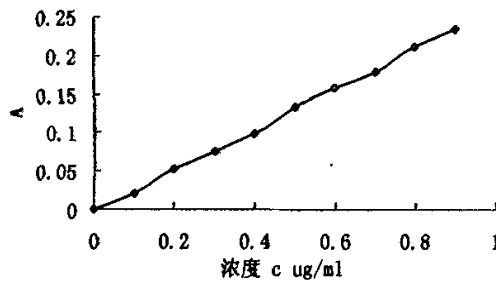


图 7.5 铜离子在海水中标准曲线

Fig 7.5 Specification curve of Cu (II) in seawater

回归方程: $y=0.2631x-0.0021$, $R^2=0.9985$, 标准曲线显示出良好的线性关系。

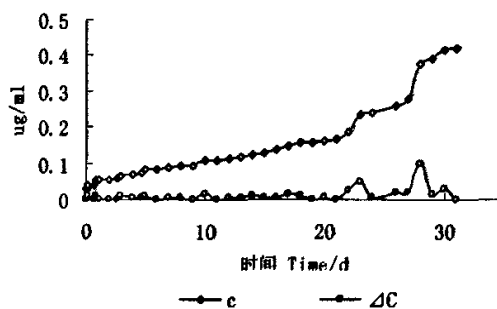
7.2. 2.2 CMCS-Cu-GA在海水中的缓释结果

表 7.4 CMCS-Cu-GA 在海水中的缓释数据

Table 7.4 The release data of CMCS-Cu-GA in seawater

样品/sample	时间 Time (d)	吸光度 A	浓度 c (ug/ml)	累积释放率 (%)
1	0	0.00523	0.028	0.0108
2	0.0417	0.0059	0.0304	0.0120
3	0.0833	0.0062	0.0315	0.0127
4	0.125	0.0065	0.0326	0.0134
5	0.1667	0.0065	0.0328	0.0138
6	0.2083	0.0087	0.0409	0.0172
7	0.6667	0.0087	0.041	0.0176
8	0.7917	0.0108	0.0492	0.0212
9	0.9167	0.0116	0.0519	0.0227
10	1.0833	0.0119	0.0533	0.0237
11	2	0.0123	0.0547	0.0248
12	2.7083	0.0128	0.0566	0.02605
13	3	0.0148	0.0643	0.02960
14	4	0.0155	0.067	0.03120
15	4.729	0.0167	0.0714	0.0336
16	5	0.0195	0.0822	0.0384
17	6	0.0199	0.0837	0.0398
18	7	0.0211	0.0881	0.0423
19	8	0.0221	0.0919	0.0446
20	9	0.0224	0.093	0.0459
21	10	0.0262	0.1076	0.0524
22	11	0.0264	0.1085	0.0538
23	12	0.0274	0.1121	0.0562

24	13	0.0285	0.1162	0.0588
25	14	0.0305	0.1239	0.0629
26	15	0.0321	0.1299	0.0664
27	16	0.0339	0.1368	0.0677
28	17	0.0371	0.1491	0.0764
29	18	0.0391	0.1565	0.0806
30	19	0.0394	0.1576	0.0826
31	20	0.0410	0.1639	0.0865
32	21	0.0412	0.1646	0.0883
33	22	0.0472	0.1874	0.0987
34	23	0.0600	0.2359	0.1191
35	24	0.0612	0.2406	0.1232
36	25	0.06617	0.2595	0.1328
37	26	0.0710	0.2778	0.1423
38	27	0.0966	0.3752	0.1825
39	28	0.1005	0.3898	0.1917
40	29	0.1079	0.418	0.2063
41	30	0.1085	0.4203	0.2112

图 7.6 Cu²⁺在海水中的浓度随时间变化情况Fig7.6 The concentration of Cu²⁺ and its changing along with time in seawater

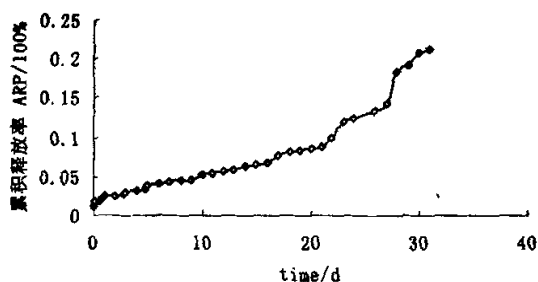


图7.7 CMCS-Cu-GA在海水中的累积释放率

Fig 7.7 The curve of ARP of CMCS-Cu-GA in seawater

由以上数据可知, CMCS-Cu-GA 凝胶在海水中缓释 30 天的累积释放度仅为 0.2112%, 且释放平稳, 说明合成的 CMCS-Cu-GA 凝胶在海水中具有良好的缓释性能。

7.3 小结

本实验中合成的CMCS-Cu-GA凝胶在人工海水及海水中均具有优异的缓释性能, 且 Cu^{2+} 平稳释放, 克服了水产养殖中传统杀菌剂的用前需活化、有毒、药效过短、容易因杀菌剂播撒不均, 造成局部水域浓度过高, 导致鱼虾不适等问题, 为其在海洋赤潮的治理应用及作为水产养殖中的长效杀菌剂提供了一定的理论依据。

8 羧甲基壳聚糖盐的制备、表征及其应用性能研究

引言

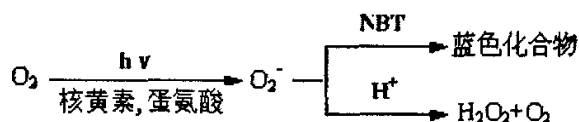
羧甲基壳聚糖(Carboxymethyl chitosan, CMCS) 具有免疫调节作用, 可通过增强机体的免疫力来发挥抗肿瘤作用, 又不损伤正常细胞, 经毒理学实验证明无任何毒副作用^[104], 具有促细胞生长, 抗心律失常作用等生物活性^[105, 106]。羧甲基壳聚糖可用作生物医用高分子材料, 是一种良好药物缓释辅料, 由于羧甲基壳聚糖上接枝了羧基, 所以极易与各种金属离子形成络合物, 这种络合物则可以在医药学上作为金属离子类药物应用, 因此是羧甲基壳聚糖制备微量元素补剂的理想配体。各种铝盐在医学上用于胃病的治疗, 羧甲基壳聚糖具有优良的成膜作用, 两者结合的铝盐在治疗胃病方面应具有良好的应用前景; 镁盐具有解热镇痛作用, 可以抑制胃酸分泌和缓解胃溃疡的疼痛; 羧甲基壳聚糖与亚铁的络合物可用于治疗缺铁性贫血; 羧甲基壳聚糖与锌的络合物可治疗因锌的缺乏导致的诸如生长障碍、男性性功能低下、皮肤损害、食欲不振等一系列生理缺陷。

氧气在生物体内产生的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$), 是一种高活性毒性物质, 是致癌、致突变、导致 DNA 断裂以及诱发衰老和炎症的主要因素之一, 过剩的超氧离子也能使 DNA 链断裂, 碱基降解和氢键破坏, 产生遗传突变等。如果在自由基化学行为过程中被清除, 就可以中断其毒害作用, 因此寻找高效、低毒、高选择性的能够阻断自由基反应的抗氧化药物具有重要的意义。

有关清除剂对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除机理大致分为两种类型, 一种类型是催化 $O_2^{\cdot-}$ 的歧化, 另一种类型是同 $O_2^{\cdot-}$ 发生氧化还原反应。

抗 $O_2^{\cdot-}$ 活性的测定需要测定超氧阴离子自由基, 国内外已建立了多种测定自由基的方法。一般可分为直接测定法和间接测定两大类。直接测定法包括脉冲辐解法、截流光谱法、电子顺磁共振 ESR 法及极谱法等; 通常直接测定法需用较特殊的仪器或试剂, 故常采用较简便的间接测定法测 SOD 活性, 常见的有黄嘌呤氧化酶—NBT 法、细胞色素 c 法、邻苯三酚自氧化法、NBT 光还原法、化学发光法、肾上腺素自氧化法、极谱氧电极法等^[107]。

本实验采用 NBT 光照还原法测定各种配合物及配体对超氧阴离子自由基的抑制作用, 其基本原理为:



氧在核黄素-蛋氨酸存在条件下进行光照可以产生超氧阴离子自由 $O_2^{\cdot-}$ ，当在反应体系中加入硝基四氮唑蓝 (NBT) 时， $O_2^{\cdot-}$ 可使 NBT 还原成蓝色的化合物。而 $O_2^{\cdot-}$ 在 H^+ 作用下可被歧化成 H_2O_2 ；当反应体系中没有 SOD 或活性物质时，歧化反应很慢，而当有 SOD 或活性物质时，歧化反应会被加速，从而使其与 NBT 反应生成的蓝色化合物的量就会减少；因此可以通过在一定波长下测定反应体系的吸光度值随时间的变化来测定化合物催化歧化 $O_2^{\cdot-}$ 的活性大小。

本文制备了羧甲基壳聚糖铝(III)、镁(II)、铁(II)、锌(II)、钙(II)、镉(II)和铈(II)盐，研究了它们的光谱特性及生理活性，为羧甲基壳聚糖及其金属配合物作为自由基清除剂的开发应用及制备 CMCS-M 类型生物活性多糖金属元素补剂的研究开发奠定基础。

8.1 实验部分

8.1.1 仪器及试剂

AVATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪 (Nicolet)，THZ-82 恒温振荡器(华北实验仪器有限公司)，78-1 型恒温磁力搅拌器，TU-1900 双波长分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)；日光灯。

羧甲基壳聚糖(自制，脱乙酰度 96%)，KBr(光谱纯，国药集团上海化学试剂有限公司)， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (AR, 天津市大茂化学试剂厂)， $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (AR, 天津天大化工实验厂)， $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (AR, 上海跃泾化工有限公司)， $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (AR, 天津市巴斯夫化工有限公司)， $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (AR, 天津广成化学试剂有限公司)，核黄素 (BR, 北京奥博星生物技术责任有限公司)，蛋氨酸 (BR, 中国惠兴生化试剂有限公司)，氯化硝基四氮唑蓝(NBT) (BR, 上海灵锦精细化工有限公司)，磷酸氢二钠 (AR, 天津市大茂化学试剂厂)，磷酸二氢钠 (AR, 天津市巴斯夫化工有限公司)，其它试剂均为分析纯。

8.1.2 羧甲基壳聚糖碱式铝盐的制备

配制质量浓度为 1% 的羧甲基壳聚糖水溶液，取等体积的三份，分别标号为 1 号、2 号和 3 号，然后按 CMCS: $AlCl_3 \cdot 6H_2O$: NaOH 摩尔比为 1: 1: 2, 2: 1: 1 和 3: 1: 0 的比例加入 1, 2, 3 号烧杯中，将 1, 2, 3 号烧杯放到磁力搅拌器上搅拌 2 h 后向 1, 2, 3 号烧杯分别倒入大量丙酮，得白色固体沉淀，抽滤，用大量的 70% 的乙醇和水的混合溶液反复洗涤至无 Cl^- 存在，55 $^{\circ}C$ 真空干燥得产品，分别记作 CMCS- $Al(OH)_2$, (CMCS) $_2$ -AlOH 和 (CMCS) $_3$ -Al。

8.1.3 羧甲基壳聚糖碱式镁盐的制备

配制质量浓度为 1% 的羧甲基壳聚糖水溶液, 按 CMCS: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: NaOH 摩尔比为 1:1:1 的比例加入烧杯中, 将烧杯放到磁力搅拌器上搅拌 2 h 后向烧杯分别倒入大量丙酮, 得白色固体沉淀, 抽滤, 用大量的 70% 的乙醇和水的混合溶液反复洗涤至无 Cl^- 存在, 55 °C 真空干燥得产品, 记作 CMCS-MgOH。

8.1.4 羧甲基壳聚糖铁、锌、钙、镉、铈盐的制备

称取 3 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 25 mL 的去离子水中, 置于三口瓶中在 70 °C 下回流搅拌。配制质量浓度为 1% 的羧甲基壳聚糖水溶液, 逐滴滴入三口瓶中 (CMCS 与 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比约为 1:1), 反应 2 h 后将所得液体浓缩, 用丙酮沉淀, 用 70% 的乙醇水溶液充分洗涤沉淀物, 抽滤得红褐色粉末, 即羧甲基壳聚糖铁盐, 记作 CMCS-Fe(II)。用同样的方法我们可以制备出羧甲基壳聚糖锌、钙、镉、铈盐。分别记作 CMCS-Fe(II), CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Cd(II)-GA, CMCS-Ce(II)。

8.1.5 羧甲基壳聚糖盐的红外表征

用 KBr 压片法在 $4000 \sim 400 \text{cm}^{-1}$ 波数范围内, 对以上合成的羧甲基壳聚糖盐作红外光谱分析。

8.1.6 羧甲基壳聚糖及其配合物抗 $\text{O}_2 \cdot^-$ 活性研究^[107]

用空气饱和的三次蒸馏水, 磷酸三氢钠和磷酸氢三钠配制 pH=7.8 的 $0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合磷酸盐缓冲溶液; 在分析天平上称取 373 mg 蛋氨酸, 用以上所配制的缓冲溶液配成浓度为 $0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 50 ml 溶液; 称取 18.8 mg NBT, 用缓冲溶液配成浓度为 $2.3 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液 100 ml; 6.2 mg 核黄素配成浓度为 $1.65 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液 100 ml, 移取 10 ml 此核黄素溶液, 用缓冲溶液稀释至 100 ml (此时浓度为 $1.65 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 用所配磷酸盐缓冲溶液配制一定浓度的待测物 (配合物) 溶液备用。

测定时, 依次移取上面所配核黄素、蛋氨酸、NBT 溶液各 5 ml, 用缓冲溶液稀释到 25 ml (此时各物质的浓度为: 核黄素: $3.3 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋氨酸: $0.01 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, NBT: $4.6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。置于 30 °C 的超级恒温槽中, 避光恒温 20 min, 然后将恒温后的混合溶液转入小烧杯中, 置于恒定光强日光灯 (92 W) 下进行光照, 光照 5 min 后, 每隔 3 min 移取部分溶液入 3 cm 比色皿中于 560 nm 波长下测定其吸光度值, 绘制吸光度值随光照时间的变化线, 拟合求出直线的斜率 ($\Delta A / \Delta t$)₀, 以此作为空白溶液 (未加配合物) 吸光度值随光照时间的变化梯度值。

分别配制 0.05 g/L 的 CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II) 配合物溶液, 按以上步骤分别移取三种溶液后, 再移取不同体积的某一浓度的配合物溶液, 用缓冲溶液稀释到 25 ml, 分别测定加入不同体积后的混合溶液的吸光度值随光照时间的变化, 拟合求出直线的斜率 $(\Delta A / \Delta t)_m$, 以此作为加入配合物后的溶液的吸光度值随光照时间的变化梯度值。

由公式^[108] $\text{Inhibition\%} = \{[(\Delta A / \Delta t)_0 - (\Delta A / \Delta t)_m] / (\Delta A / \Delta t)_0\} \times 100\%$

$(\Delta A / \Delta t)_0$ 表示空白溶液吸光度随光照时间的变化速率

$(\Delta A / \Delta t)_m$ 浓度为 m 的化合物吸光度随光照时间的变化速率

求得不同配合物在不同浓度下对超氧离子的抑制率, 作各浓度配合物抑制率随浓度的变化曲线

8.2 结果与分析

8.2.1 羧甲基壳聚糖盐的红外光谱分析数据

用 KBr 压片法在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 波数范围内, 对以上合成的羧甲基壳聚糖盐作红外光谱分析, 结果如下:

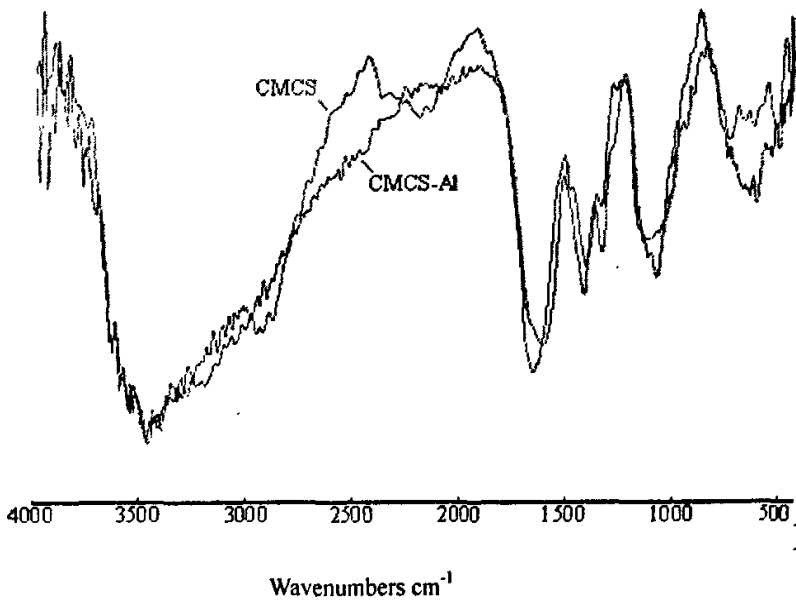


图 8.1 CMCS、CMCS-AI(III)的红外光谱图

Fig 8.1 IR spectra of CMCS, CMCS-AI(III)

从图8.1可以看出, CMCS-AI(III)与CMCS红外谱图相比, 589.47 cm^{-1} 处出现明显的吸

收峰，此处的吸收峰为金属离子与 COO^- 上的氧形成O-Al键所产生的吸收峰。位于 1599.42 cm^{-1} 处的 $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ 吸收峰，与Al(III)配位后向高频位移了 50 cm^{-1} 左右，位于 1416.42 cm^{-1} 处 COO^- 的对称吸收峰向低频位移了 28 cm^{-1} 左右，说明 $-\text{COO}^-$ 参与了配位，这是由于羧酸钠盐转化为碱式羧酸铝盐后，铝氧键的共价性质的增加，羧甲基壳聚糖钠盐使得 $-\text{COO}^-$ 的离子性下降，C-O的双键性增强；位于 1089.44 cm^{-1} 处表征仲羟基的吸收峰有一定位移，向低频位移了 25 cm^{-1} ，这说明 CMCS 分子中的仲羟基参与了配位反应。 1326.05 cm^{-1} 处的吸收峰处C-N的伸缩振动峰吸收峰几乎没有变化，说明CMCS-Al以内盐的形式存在的。

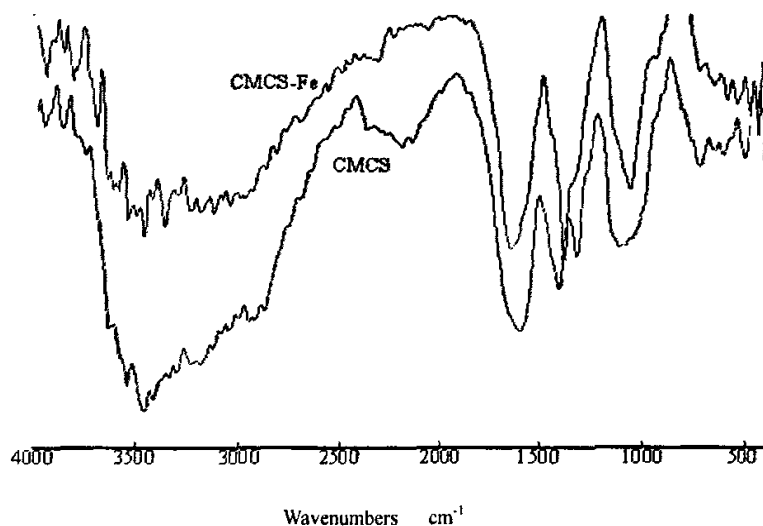


图 8.2 CMCS、CMCS-Fe 的红外光谱图

Fig 8.2 IR spectra of CMCS, CMCS-Fe

从图 8.2 可以看出，CMCS 形成 CMCS-Fe(II)配合物后，位于 3457.18 cm^{-1} 处的吸收峰变窄，说明 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 参与了配位反应。位于 1599.42 cm^{-1} 处的 $\delta\text{N-H}$ 吸收峰，与 Fe(II)配位后向高频位移了 45 cm^{-1} 左右，说明 $-\text{NH}_2$ 参与了配位反应；位于 1416.42 cm^{-1} 、 1326.05 cm^{-1} 处的吸收峰均发生一定位移，并且成为一个峰，说明 $-\text{COO}^-$ 及 CMCS 分子中的乙酰氨基也参与了配位；位于 1089.44 cm^{-1} 处表征仲羟基的吸收峰有一定位移，向低频位移了 35 cm^{-1} ，这说明 CMCS 分子中的仲羟基参与了配位反应。

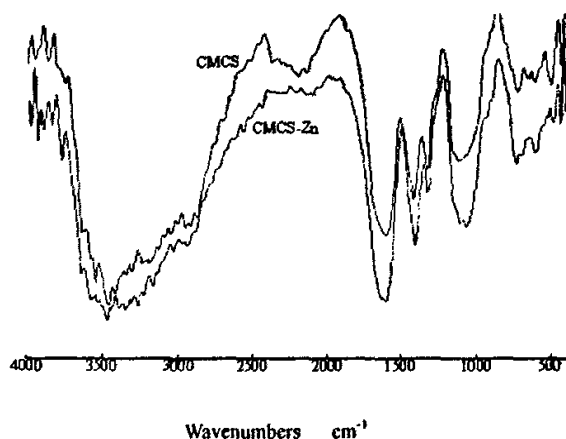


图 8.3 CMCS、CMCS-Zn 的红外光谱图

Fig 8.3 IR spectra of CMCS、CMCS-Zn(II)

从图 8.3 可以看出, CMCS 形成 CMCS-Zn(II)配合物后, 位于 3457.18 cm^{-1} 处的吸收峰向高频位移 18 cm^{-1} , 且吸收峰变缓, 说明 -NH_2 和 -OH 参与了配位反应; 位于 1599.42 cm^{-1} 处的 $\delta\text{N-H}$ 吸收峰, 与 Zn(II) 配位后向低频位移了 1 cm^{-1} 左右, 说明 -NH_2 参与了配位反应; 位于 1416.42 cm^{-1} 处的吸收峰发生一定位移, 说明 -COO^- 也参与了配位。位于 1326.05 cm^{-1} 处的 $\nu_{\text{C-N}}$ 吸收峰都发生一定位移, 说明 CMCS 分子中的乙酰氨基参与了配位反应; 位于 1089.44 cm^{-1} 处仲羟基的吸收峰有一定位移, 向低频位移了 34 cm^{-1} , 这说明 CMCS 分子中的仲羟基参与了配位反应。

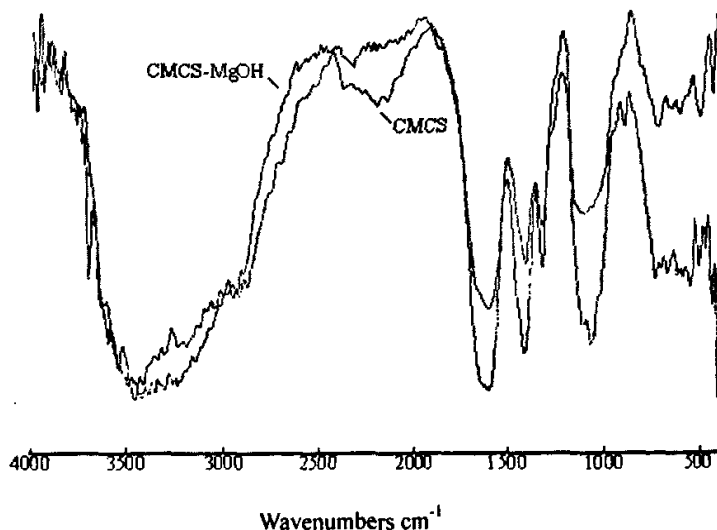


图 8.4 CMCS、CMCS-MgOH 的红外光谱图

Fig 8.4 IR spectra of CMCS, CMCS-MgOH

从图 8.4 可以看出, CMCS 形成 CMCS-Mg(II)配合物后, 位于 3457.18 cm^{-1} 处的吸收峰向高频分别位移 18 cm^{-1} , 且 CMCS-Cu 吸收峰变尖, 说明-NH₂ 和-OH 参与了配位反应。位于 1599.42 cm^{-1} 处的 $\delta\text{N-H}$ 吸收峰, 与 Zn(II)配位后向低频位移了 1 cm^{-1} 左右, 且吸收峰变尖, 进一步说明-NH₂ 参与了配位反应; 位于 1416.42 cm^{-1} 处的吸收峰发生一定位移, 说明-COO⁻也参与了配位; 位于 1326.05 cm^{-1} 处的 $\nu_{\text{C-N}}$ 吸收峰都发生一定位移, 说明 CMCS 分子中的乙酰氨基参与了配位反应; 位于 1089.44 cm^{-1} 处表征仲羟基的吸收峰有一定位移, 向低频位移了 34 cm^{-1} , 这说明 CMS 分子中的仲羟基参与了配位反应。

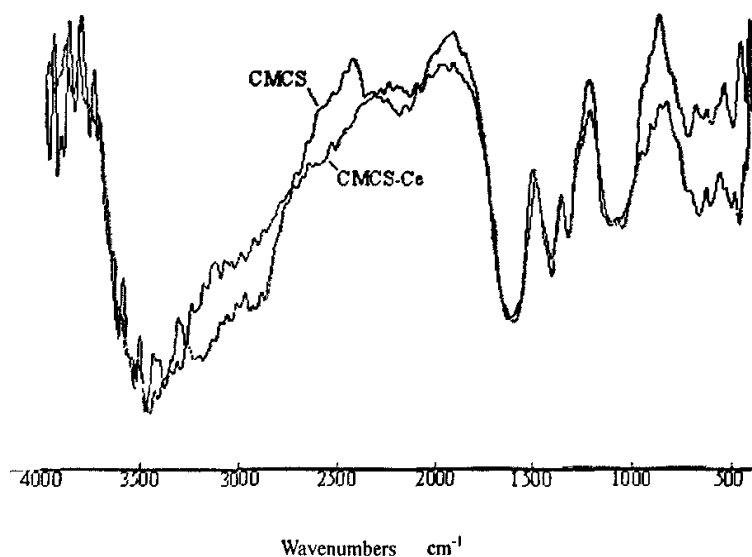


图8.5 CMCS、CMCS-Ce 的红外光谱图

Fig 8.5 IR spectra of CMCS, CMCS-Ce

从图 8.5 可以看出, CMCS-Ce 与 CMCS 红外谱图相比, 612.14 cm^{-1} 处出现明显的吸收峰, 此处的吸收峰为金属离子与 COO⁻ 上的氧形成 O-Ce 键所产生的吸收峰。位于 1599.42 cm^{-1} 处的 $\delta_{\text{N-H}}$ 吸收峰, 与 Ce(II)配位后向高频位移了 24 cm^{-1} 左右, 且强度减小, 说明-NH₂ 参与了配位反应; 位于 1416.42 cm^{-1} 处 COO⁻ 的对称吸收峰向低频位移了 3 cm^{-1} 左右, 且强度减小, 说明-COO⁻ 参与了配位; 位于 1089.44 cm^{-1} 处表征仲羟基的吸收峰有一定位移, 向低频位移了 30 cm^{-1} , 这说明 CMCS 分子中的仲羟基参与了配位反应。 1326.05 cm^{-1} 处的吸收峰处 C-N 的伸缩振动峰吸收峰几乎没有变化, 说明 CMCS-Ce 以内盐的形式存在的。

8.2.2 羧甲基壳聚糖及其配合物的抑制活性研究

不同配合物浓度时的超氧自由基抑制率分析结果如下:

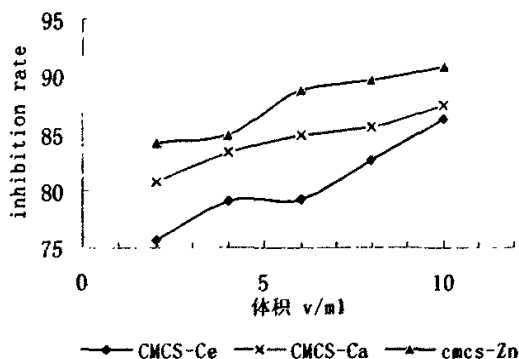


图 8.6 不同 CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II)配合物浓度时的超氧自由基抑制率

Table 8.6 The relationship between the inhibition rate to $O_2^{\cdot-}$ and concentration of complexes CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II)

由图 8.6 可知, CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II)各配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 均有较好的抑制作用, 且抑制率与浓度均表现为正相关关系。在 0.004 g/l~0.2 g/l 浓度范围内, 3 种配合物中, CMCS-Zn(II)配合物催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化的活性最强, CMCS-Ca(II)组配合物次之, CMCS-Ce(II)配合物最弱。即同一配体与不同的金属离子配位, 形成结构类似的配合物, 但具有不同的活性, 说明抗 $O_2^{\cdot-}$ 活性与金属离子的种类密切相关。

8.3 小结

合成了羧甲基壳聚糖配合物, 对其结构进行了红外光谱分析, 对以羧甲基壳聚糖为基质制备微量元素补剂的理想配体提供了理论依据。对 CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II)三种配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制作用作了研究, 结果表明, 配合物浓度在 0.004 g/l~0.2 g/l 范围内时, 各配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 均有较好的抑制作用, $O_2^{\cdot-}$ 抑制率与配合物浓度为正相关关系, 且其抑制作用与金属配位离子的种类有关, 为今后应用羧甲基壳聚糖衍生物作为清除自由基材料提供了理论依据。

9 总结

9.1 论文主要结论

本文合成了壳聚糖铜(II)配合物,考察了脱乙酰度、温度对产品中铜含量的影响。研究了产品在人工海水中的缓释行为及其对大肠埃希氏菌的抑菌效果,产物在人工海水中15天的累积放度仅为0.76%,说明其具有优异的缓释性能。抑菌第六天时,抑菌率可达54.5%。

以壳聚糖与一氯乙酸在碱性条件下通过加热制备了羧甲基壳聚糖(CMCS)。考察了浓度、温度、金属盐对羧甲基壳聚糖溶液粘度的影响。羧甲基壳聚糖溶液的表观粘度随浓度的增加而增大,随温度升高而降低,且溶液的浓度愈大,其表观粘度受温度影响愈大;加入NaCl,会造成羧甲基壳聚糖水溶液体系的表观粘度的下降,并且表观粘度随加入的NaCl量的增大而平缓下降。

以羧甲基壳聚糖作为骨架材料,采用戊二醛交联法制备CMCS-GA,对产品进行了红外表征。考察pH及温度对溶液溶胀度的影响,凝胶在pH 7左右达最大溶胀度,在碱性条件下,随pH增大CMCS-GA溶胀度减小,在酸性条件下,随pH减小CMCS-GA溶胀度减小,酸性较强时,凝胶溶解。当温度在25℃~55℃变化时,CMCS-GA在水中溶胀度先升高再减小,在40℃左右达到最大值13.57。

通过吸附制备阿司匹林载药凝胶,观察载药凝胶在人工肠液中的溶胀动力学特点及体外释放行为。在pH 7.4的人工肠液中CMCS-GA 2 h达最大溶胀度1.38。CMCS-GA的载药量为4.6 mg/g,凝胶在人工肠液中的96 h的累积释放度为99.91%,具有优良的缓释性能,药物的体外释放模型符合一级动力学方程。

通过戊二醛交联合成羧甲基壳聚糖铜、镉配合物,用红外光谱进行结构表征。测定羧甲基壳聚糖铜中铜的量,分别考察其在人工海水及海水中的缓释性能,在人工海水中缓释32天的累积释放度为0.2390%,在海水中缓释30天的累积释放度为0.2112%,且均释放平稳,说明其具有优异的缓释性能。

合成了羧甲基壳聚糖镁(II)、钙(II)、锌(II)、铁(II)、铝(III)、铈(II)配合物,用红外光谱进行结构表征。考察对超氧自由基的抑制作用,结果表明,并对CMCS-Zn(II), CMCS-Ca(II), CMCS-Ce(II)三种配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制作用作了研究,结果表明,各配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 均有较好的抑制作用, $O_2^{\cdot-}$ 抑制率与配合物浓度为正相关关系,当配合物的质量浓度在0.004 g/l~0.2 g/l范围内时,CMCS-Zn(II)抑制率最高,CMCS-Ca(II)其次,CMCS-Ce(II)最低,表明配合物对超氧自由基的抑制作用与配位金属离子的种类有关。

9.2 论文的主要创新点

本文所研究的内容,具有以下几点创新点:

1. 本文合成了壳聚糖铜配合物,考察了脱乙酰度、温度对产品中铜含量的影响。研究了产品在人工海水中的缓释行为及其对大肠埃希氏菌的抑菌效果。
2. 以壳聚糖为原料采用氯乙酸法制备羧甲基壳聚糖(CMCS)。考察了浓度、温度、金属盐对羧甲基壳聚糖溶液粘度的影响。进而以羧甲基壳聚糖作为骨架材料,采用戊二醛交联法制备 CMCS-GA, 考察 pH 及温度对溶液溶胀度的影响。
3. 以阿司匹林为模型药物,通过吸附制备阿司匹林载药凝胶,观察载药凝胶在人工肠液中的溶胀动力学特点及体外释放行为,初步探讨了其释放机制及缓释动力学,为在药物缓释领域的应用提供了一定的理论依据。
4. 合成了羧甲基壳聚糖铜配合物,测定其中铜的含量,考察其在人工海水及海水中的缓释性能,为其作为水产养殖中的长效杀菌剂提供了一定的理论依据。
5. 合成了羧甲基壳聚糖钙、锌、铈配合物,用红外光谱进行结构表征,并考察它们对超氧自由基的抑制作用,为羧甲基壳聚糖金属配合物作为自由基清除剂的开发应用及应用羧甲基壳聚糖作为人体补充微量元素的载体提供一定的理论依据。

9.3 存在的不足及待解决的问题

本文还存在一些不足之处,需要在以后的工作中着手解决的,有以下几个方面:

1. 对于壳聚糖铜配合物的研究还仅限于比较粗浅的方面,没有考虑壳聚糖的分子量对产品缓释性能的影响,抑菌研究上采用菌种过于单一,对其对其它菌种的抑制作用没有作系统的研究。
2. 对羧甲基壳聚糖水凝胶对酸碱敏感和温度敏感方面同样缺少一个完整的理论来解释以及缺少有效的手段来证明对其解释的正确性。
3. 有关阿司匹林壳聚糖缓释片体内吸收及体外释放度和体内吸收的相关性有待进一步研究。
4. 羧甲基壳聚糖铜配合物合成时,没有深入探讨不同配合条件对配合物的配位方式的影响,对其也缺乏系统的表征。

参考文献

- [1] Panka j R. Rege, Lawrence H. Block. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. *Carbohydrate Research*[J],1999,321:235~245.
- [2] 杜予民.中国化学会第二届甲壳素化学与应用研讨会论文集[C],武汉 1999:4~10.
- [3] 蒋挺大.壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社,2001: 9~12, 33~63, 69, 6, 127, 160~1203.
- [4] A.A.Chitin, Oxford, Pergamon Press,1977.
- [5] 谢雅明.化学世界[J],1983,(4):118~121.
- [6] 那海秋, 刘宝忠, 张德志.辽宁化工[J],1997,26(4):194~195.
- [7] Muzzarelli RAA. Carboxymethylated Chitins and Chitosans.*Carbohydr Polym*,1988, (8):1~21.
- [8] 余艺华, 何炳林.甲壳质/壳聚糖的化学修饰.高分子通报[J],1997,(12):232~236.
- [9] 于海峰,甲壳素/壳聚糖及其衍生物的合成与性能研究.河北工业大学硕士研究生学位论文[C].2000:3.
- [10] Majeti N.V. Ravi kumar. A review of chitin and chitosan applition. *Reactive &Functional Polymers*[J], 2000,(46):1~27.
- [11] 张廷军, 甲壳素/壳聚糖及其衍生物的应用情况.水产科技情报[J],1999,26(26):243~247.
- [12] 王小红, 马建标, 何炳林.甲壳素、壳聚糖及其衍生物的应用.功能高分子学报[J],1999,12(2):197~202.
- [13] 钟 超.N,O-羧甲基壳聚糖的制备及表征.北京化工大学硕士研究生学位论文[C].2004:2~3.
- [14] 王爱勤, 闫志红, 贾宝全. 羧甲基壳聚糖的制备与质量分析.中国生化药物杂志[J],1996, 17(4):147~149.
- [15] 韩 笑, 谭天伟. 羧甲基壳聚糖制备新工艺的研究.北京化工大学学报[J],2000, 27 (23): 1~4.
- [16] 李继绍, 虞有文, 于燕玲, 沈伟.中国生化药物杂志[J],2000,21(4):175.
- [17] 魏玉西, 李钊. N,O-羧甲基甲壳胺的制备及其对草莓保鲜效果的初步研究.海洋科学[J],1998,(2):3~5.
- [18] 邵 建, 杨宇民.水溶性O-羧甲基壳聚糖的制备.南通医学院学报[J],2000,20(2):155~156.
- [19] Ragnhild J.Nordtveit Hjerde, Kjell M.Varum, Hans Grasdalen, Seiichi Tokura and Olav Smidsrod. Chemical composition of 0-(carboxymethyl)-chitins in relation to lysozyme degradation rats, *Carbohydrate Polymers* [J], 1997,(34):131~139.
- [20] 吴 勇, 黎碧娜.羧甲基壳聚糖的制备与应用研究进展.香料香精化妆品[J],2001,(2):17~19.
- [21] KnorrD. *Food Technology*, 1984(1):3.
- [22] 杨志宽, 单崇新, 苏帕拉.环境科学与技术[J],2000,(1):10.
- [23] 陈 天, 汪士新.离子交换与吸附[J],1997,13(5):466.

- [24] 韩吉慧.壳聚糖的改性及其对稀土离子的吸附性能研究.辽宁师范大学硕士研究生学位论文[C], 2001:6~7.
- [25] 徐兆瑜.甲壳素及其衍生物的应用新进展.化学工程与工业技术[J],2002, 23(5):19~23.
- [26] Muzzarelli R AA .Chitin.London:Oxford Pergamon Press,1977.262.
- [27] 唐兰模, 符迈群, 张 萍, 沈敦瑜.化学世界[J],2001,(2):59.
- [28] 刘 松.壳聚糖衍生物金属配合物的制备及其抑菌、抗氧化活性研究.中国科学院研究生院硕士学位论文[C],2004:6.
- [29] 刘和森, 刘东辉.几丁质在农业上的应用.应用技术[J],2001,(3):11~13.
- [30] Kim C H,Choi J W,Heung,et al.Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. Polymer Bulletin[J],1997,38(4):387~393.
- [31] Shin Y, Yoo D I,Min K. Antimicrobial finishing of polypropylene nonwoven fabric by treatment with chitosan oligomer . Appl Polym Sci[J],1999,74(12):2911~2916.
- [32] Song J W,Ghim H D,Choi J H,et al. Preparation of antimicrobial sodium alginate with chito-oligosaccharide side chains. Appl Polym Sci[J],2001,39(10):1810~1816.
- [33] 李 治, 刘晓非, 管云林.O-羧甲基壳聚糖抗菌性的研究.日用化学工业[J],2000,(3):10~11.
- [34] 杨冬枝, 刘晓非, 李治等.壳聚糖抗菌活性的影响因素.应用化学[J],2000,17(6):598~602.
- [35] Muzzarelli R A A. Chitosan and its derivatives. Carbohydrate Polymers[J], 1983,(3): 53~75.
- [36] 王海青.壳聚糖及其衍生物的开发及应用.河北工业大学硕士学位论文[C],2003:13.
- [37] 湛学军, 熊远珍, 柳喆等.羧甲基壳聚糖银的合成及抑菌实验的研究.中国生化药物杂志[J], 2001, 22(3):142~144.
- [38] Muzzarelli R A A,Pamos V, Stanicv, et al.Osteogenesis promoted by calcium phosphate N,N-dicarboxymethyl chitosan.Carbohyal Polym[J],1998,36(4):267.
- [39] Jing S B,Yamaguchi TaTsuaki.Chem Express,1992,7(1):93;Bull Chem Soc JP,1992,65(7):1866.
- [40] 师素云, 薛启汉.壳聚糖对玉米的生长调节作用.天然产物研究与开发[J],1999, 11(2):32~36.
- [41] 夏文水, 吴炎楠.羧甲基壳聚糖-一种多用途的甲壳素衍生物.无锡轻工大学学报[J],1995,14(4):372~375.
- [42] 张声辉.壳聚糖衍生物果蔬保鲜剂的配制.中国, 发明专利[P], 94101978.
- [43] 瞿秀静, 刘晓霞.壳聚糖制膜研究.化学世界[J],1995,(6):302~305.
- [44] 何培思.甲壳素膜对果蔬保鲜效果的研究.食品科学[J],1991, (12):57~59.
- [45] 夏文水, 吴炎楠.甲壳素酶研究现状.生物工程进展[J],2000,20(5):12~15.

- [46] 张秋华, 唐小琪.羧甲基壳聚糖处理印染废水试验.环境污染与防治[J],1995.17(5):7~9.
- [47] 王海青.壳聚糖及其衍生物的开发及应用.河北工业大学硕士学位论文[C],2003:7.
- [48] 黄增慰, 黄道战.羧甲基壳聚糖防止硫酸钙水垢的性能研究.民族学院学报[J], 自然科学版,2001,7(2):104~106.
- [49] 管云林.壳聚糖/纤维素抗菌纤维的研究与展望.化工进展[J],2002,21,(5):310~313.
- [50] 刘松.壳聚糖衍生物金属配合物的制备及其抑菌、抗氧化活性研究.中国科学院研究生院硕士学位论文[C],2004:8~9.
- [51] Inaki Y,Qtsuru M,Takemoto K J.Polymerization by metalplexes XXXI initiation by chitisan-copper(II) complex. *Macromol Sci Chem*[J],1978, A12(7):953.
- [52] 蒋挺大.壳聚糖金属配合物的催化作用研究进展.化学通报[J],1996,(1):22~27.
- [53] 关怀民.壳聚糖-Cu(II)配位聚合物的合成表征及催化性能研究.福建师范大学学报(自然科学版) [J], 1996,12(1)75~80.
- [54] Yaku F,Koshijima T. Proceedings of the 1st International Conference on Chitin/Chitosan,Muzzarelli R A A., Parriser E R, ED,1978:386.
- [55] P J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University press, Ithaca, NewYork,1953.
- [56] 何天白, 胡汉杰, 海外高分子科学的新进展[M], 北京:化学工业出版社,1997:174.
- [57] 翟茂林, 哈鸿飞.水凝胶的合成、性质及应用.大学化学[J],2001,16 (5):22~27.
- [58] 李贤真, 李彦锋, 朱晓夏.高分子水凝胶材料研究进展.功能材料[J],2003, (4):382~385.
- [59] Maitra A N, Ghash P K. Synthesis and characterization of sol-gel phase reversible hydrogels sensitive to glucose. *Polym Prep*,1994,(35):391~393.
- [60] Tae G K.B. Temperature modulated protein release from pH/temperature-sensitive hydrogels. *Biomaterials*, 1999,20:517~521.
- [61] 卓仁禧, 张先正.温度及pH敏感聚(丙烯酸)/聚(N-异丙基丙烯酰胺)互穿网络水凝胶的合成及性能研究. *高分子学报*[J],1998, 1:39~42.
- [62] Chen G H, Hoffman A S. Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH. *Nature*[J], 1995, 373(5): 49~52.
- [63] 石艳丽.温度及pH敏感天然高分子水凝胶的制备及结构性能表征.东华大学硕士论文[C],2005: 1.
- [64] Nicole J E ,Kelly R S ,Kao WJ .*Biomaterials*,2002,24:509~523.
- [65] Dusek K, Patterson D. Transition in swollen polymer networks induced by intra molecular condensation. *Polym. Sci*[J], PartA-2, 1968,6:1209~1216.

- [66] Tanaka T. Collapse of gels and the critical end point. *Phys. Rev. Lett*,1978.
- [67] 杨大智.智能材料与智能系统[M].天津:天津大学出版社,2000, 352~353;351~352.
- [68] 韩吉慧.壳聚糖的改性及其对稀土离子的吸附性能研究.辽宁师范大学硕士研究生学位论文[C], 2001:11~13.
- [69] 方允中, 李文杰.自由基与酶[M].北京:科学出版社,1994.2.
- [70] 孙存普, 张建中, 段绍瑾.自由基生物学导论[M].合肥市:中国科学技术大学出版社,1999.
- [71] 惠宏襄, 赵小宁, 金明等.由基与细胞凋亡.生物化学与生物物理进展[J],1996,23(1):12~15.
- [72] 张尔贤, 俞君丽, 肖湘.鼠尾藻多糖清除自由基作用的研究.中国海洋药物[J],1995,15(1):1~4.
- [73] 印大中, 刘希彬.自由基伤害衰老理论的严重缺陷.中国老年学杂志[J],2003,23(2):123~126.
- [74] 田晓华, 丛建波, 施定基等.褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学的 ESR 研究.营养学报[J],1997,19(1):32~37.
- [75] 周惠萍, 蒋巡天等.浒苔多糖的降血脂及其对 SOD 活力和 LPO 含量的影响.生物化学[J], 1995, 11(2): 161~164.
- [76] Xue C H, Yu G L, Takashi H, et al. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in Phosphatidyl choline-liposomal suspension and organic solvents. *Biosci Biotechnol Biochem*,1998, 62(2): 206~209.
- [77] Nicola V, Patrizia T. Influence of chondroitin sulfate charge density, sulfate group position, and molecular mass on Cu^{2+} -mediated oxidation of human low-density lipoproteins: Effect of normal human plasma-derived chondroitin sulfate. *Biochem*[J],1999,125:297~304.
- [78] Riccardo A, Pilar R, Andreas G, et al. Heparin exhibits inhibitory effect during Cu^{2+} -mediated DL oxidation. *EBS Lett*,1995,377:240~242.
- [79] 蒋焜, 薛培华, 陈士明等.壳聚糖对超氧阴离子自由基和亚油酸脂类自由基的抑制作用.科学通报[J],2002,47(3):182~184.
- [80] 徐桂云, 崔庆荣.甲壳低聚糖清除羟自由基性能的研究.山东轻工业学院学报[J],2001,15(2):39~41,68.
- [81] 林友文, 林青, 郑景峰等.壳聚糖、羧甲基壳聚糖降脂及抗氧化作用.中国海洋药物[J],2003,93(3):16~19.
- [82] 何德庆, 王丽.甲壳质/甲壳胺延缓衰老抗疲劳作用的探讨.中国甲壳资源开发应用学术研讨会论文集(下册).青岛:中国药学会海洋药物专业委员会,1997:12~15.
- [83] 薛长湖, 徐强, 赵雪.琼胶低聚糖清除自由基的活性.水产学报[J],2003,27(3):283~288.
- [84] 胡金凤, 耿美玉, 于广利等.甲壳质衍生物916体外抗氧化作用的研究.中国海洋药物[J],2001,(1):25~

27.

- [85] 孙胜玲, 王爱勤. N,O-羧乙基壳聚糖的合成及对金属离子的吸附性能. 高分子材料科学与工程[J], 2006, 22(3): 25~29.
- [86] 王爱勤, 邵士俊等. 甲壳胺与Cu(II) 配合物的合成与表征. 高分子学报[J], 2000, (3): 297~300.
- [87] 李荣勤, 何英伦, 齐向前. 丙烯酰胺中铜离子的测定. 齐齐哈尔师范学院学报(自然科学版)[J], 1996, 16(3): 35~37.
- [88] 杨红梅, 陈旭, 赵坤杰. 阿司匹林壳聚糖缓释片的体外释放度研究. 河南大学学报(医学版)[J], 2005, 24(1): 37~38.
- [89] 范玉华, 张冬梅, 毕彩丰等. 异双希夫碱与La(III) 配合物的合成、热分解反应动力学和抑菌活性. 中国海洋大学学报[J], 2005, 35(3) : 463~466.
- [90] 黄中华, 孙秀云等. 壳聚糖的吸附行为及其 FTIR 光谱研究. 光谱学与光谱分析[J], 2005, 25(5): 698~700.
- [91] 晋治涛, 陈国华, 孙明昆. 羧甲基壳聚糖水凝胶和羧甲基壳聚糖盐的制备、性质及其应用研究. 中国海洋大学研究生学位论文[C], 2004: 14.
- [92] 唐振兴, 钱俊青, 石陆娥. 羧甲基壳聚糖制备工艺的研究. 化工技术与开发[J], 2004, 33(2): 4~7.
- [93] Nicole J E, Kelly R S, Kao WJ. *Biomaterials*, 2002, (24) : 509~523.
- [94] Dodane V, Vilivalam V D. *Pharm Sci Techn Today*, 1998, 1(6) : 246~253
- [95] 孙立苹, 杜予民, 陈凌云等. 羧甲基壳聚糖水凝胶制备及其在药物控释中的应用. 高分子学报[J], 2004, (2) 191~194.
- [96] 陈凌云, 杜予民, 肖玲等. 羧甲基壳聚糖的取代度及保湿性. 应用化学[J], 2001, 18(1): 5~8.
- [97] Pham le Dung, Michel Milas, Marguerite Rinaudo, et al. Water Soluble Derivatives Obtained by Controlled Chemical Modifications of Chitosan. *Carbohydrate polymers*[J], 1994, 24 : 209~214.
- [98] Keisuke Kurita, Junji Amemiya, Tomonori Mori, et al. Comb - shaped Chitosan Derivatives having Oligo (ethylene glycol) side chains. *Polymer Bulletin*[J], 1999, 42: 387~393.
- [99] 晋治涛, 陈国华, 孙明昆. 羧甲基壳聚糖水凝胶和羧甲基壳聚糖盐的制备、性质及其应用研究. 中国海洋大学硕士论文[C], 2004: 32.
- [100] 屠锡德, 毛凤斐, 李娟. 阿司匹林缓释片的研制及体内药物动力学研究. 南京药学院学报[J], 1986, 17(2): 107~111.
- [101] 杨红梅, 陈旭, 赵坤杰. 阿司匹林壳聚糖缓释片的体外释放度研究. 河南大学学报 (医学版) [J], 2005, 24(1): 37~38.

- [102] 赵玲, 洪爱华, 尹平河等.沸石载铜除藻剂的探讨.中国环境科学[J], 2002, 22(3):207~209.
- [103] 邹玲媛, 承宪成.二氧化氯在水产养殖应用中的几个问题.齐鲁渔业[J],2003,20(8),27~28.
- [104] 刘万顺, 陈西广, 张学成等.羧甲基壳多糖毒理学研究.中国海洋药物[J],1997,(3):17~19.
- [105] 王丽娟, 李金鸣, 张沈丽等.羧甲基甲壳胺对豚鼠单一心室肌细胞钙离子电流的作用.中国海洋药物[J],1999,(4):8~10.
- [106] 张沈丽, 王丽娟, 肖庆桓等.羧甲基壳多糖对豚鼠单一心室肌细胞延迟外向钾电流的作用.中国海洋药物[J],2000,(1):11~13.
- [107] 雷文.Schiff 碱及其金属配合物合成与生物活性研究.重庆大学硕士学位论文[C], 2002:25~26.
- [108] 毛宗万, 杭庆伟, 唐雯霞.Cu, Zn-SOD 酶模型化合物催化O₂歧化作用研究.无机化学学报[J],1995,1.11(3):262~266.

附录:

攻读学位期间发表的论文目录

- [1] 徐甲坤, 毕彩丰, 范玉华, 郭锋等. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 羧甲基壳聚糖水凝胶制备及在药物控释中的应用, 已接收.
- [2] Feng Guo, Cai-Feng Bi, Yu-Hua Fan, Jia-Kun Xu, Jian-Chao Qiu and Zhi-Xian Gao
Fundamental electrochemical characteristics of a Cu(II) Schiff base complex and its interactivity with DNA. Asian Journal of Chemistry. 2007, Vol.19.
- [3] Feng Guo, Cai-Feng Bi, Yu-Hua Fan, Yan Xiao, Xue-Tao He and Jia-Kun Xu. Synthesis, Crystal Structure and Antibacterial Properties of N-(2-Hydroxy-1-naphthalidene) -4-amino antipyrine. Asian Journal of Chemistry. 2007, Vol.19(3): 1846-1852.
- [4] Feng Guo, Cai-Feng Bi, Yu-Hua Fan, Ai-Dong Wang, Jia-Kun Xu and Xia Zhang Crystal Structure and geometry-optimization study of $C_{22}H_{19}N_3O_2$. Journal of Ocean University of China. 2007, 6(3)

致 谢

本论文是在尊敬的导师毕彩丰教授和范玉华教授的悉心指导下完成的。从论文的选题、实验方案的设计、资料的收集以及论文的写作，无不凝结着导师的心血和汗水。两位导师严谨的治学态度、睿智的学术思维、渊博的学识、忘我的工作热情将使学生受益终身并永远激励学生不断进取；恩师的言传身教是学生做人的楷模！值此论文完成之际，谨向两位敬爱的恩师表示最衷心的感谢和最崇高的敬意！

感谢赵宇老师和张栋梅老师对我在生活、学习以及实验中所给予的无私帮助，他们是我人生中一笔宝贵的财富。

在论文的实验和撰写过程中，毕双玉本科生研究训练计划（SRTP）课题组以及本实验室的郭峰、何雪涛、张伟、邱建超、高志贤、王爱东、张霞、刘冬雪、肖艳、艾小康、张艳、包艳以及同宿舍胡信同学都曾给予了不遗余力的帮助，在此谨向他们致以最衷心的感谢！

中国海洋大学化学化工学院的领导、老师和同学在我学习的三年间，给予了许多帮助，在此向他们致以最诚挚的谢意！

值此论文付梓之际，向我的家人表示由衷的感谢！特别感谢我的父母及女友孙晓春三年中给予我无限的关爱、理解和支持，在此向他们表示衷心的感谢。

最后，向曾经给予我关心、帮助鼓励和支持的所有人表达我对他们的真诚感谢和美好祝愿！

徐甲坤

2007-5-1