

# 胶体滴定法测定羧甲基壳聚糖的取代度

陈浩凡<sup>1, 2</sup>, 潘仕荣<sup>1</sup>, 胡瑜<sup>2</sup>, 钟跃思<sup>1</sup>

(1. 中山大学 附属第一医院 人工心研究室, 广东 广州 510089)

2. 深圳武警医院, 广东 深圳 518029)

**摘要:** 用胶体滴定法测定羧甲基壳聚糖取代度; 讨论 pH 值、溶液浓度、滴定速度和离子强度对胶体滴定的影响, 并比较胶体滴定法、电位滴定法和元素分析法的优劣; 结果表明胶体滴定法是一种快速、简便地定量测定 CMC 取代度的方法, 且是测定 CMC 取代度的优选方法。

**关键词:** 羧甲基壳聚糖; 取代度; 电位滴定法; 胶体滴定法; 元素分析法

**中图分类号:** O656.34; O636.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2003)06-0070-04

羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMC)是壳聚糖羧甲基化后的产物, 由于它既保留了壳聚糖的优点, 又极大地改善了水溶性, 与人体细胞有很强的亲和性和相容性, 且无毒副作用, 因而有望成为优良的生物医学材料, 在众多甲壳素衍生物中, 倍受关注。取代度(羧基含量)是其在生产、研究和应用中一个重要的技术指标。电位滴定法为 CMC 取代度测定的常用方法, 此外还有灰分分析法<sup>[1]</sup>、核磁共振(NMR)<sup>[2]</sup>和红外光谱分析法<sup>[3]</sup>。灰分分析法操作繁琐, 费时费力, 且常受共存盐离子及低相对分子质量化合物的干扰。NMR 显然是一个较准确的方法, 但由于一些壳聚糖衍生物难以找到合适的溶剂, 而且测定费用也高, 使其应用受到限制。红外光谱分析法用以定量分析受影响的因素多, 且费用昂贵。胶体滴定是以聚阴离子与聚阳离子之间迅速的化学计量反应为基础的微量容量分析方法。本实验探讨影响胶体滴定的因素, 确定胶体滴定的最佳条件, 并比较胶体滴定、电位滴定和元素分析测定 CMC 取代度的优劣。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

红外光谱仪(EQUINOX 型, 德国 Bruker 公司); 核磁共振谱仪(INOVA\_500 型, 美国 Varian 公司); 元素分析仪(Vario EL 型, 德国 Elementar 公司)。定时恒温磁力搅拌器 JB\_3 型, 酸度计 pHHS\_3C 型(上海虹益仪器厂), 20 mL 碱式滴定管, 50 mL 酸性滴定管; 5 mL 微量滴定管, 乌氏粘度计。

甲壳素和壳聚糖(脱乙酰度 87%, 江苏南通双林生物制品有限公司); 乙醛酸(德国 Merk-Schuchardt 公司); 硼氢化钠(NaBH<sub>4</sub>, 常州新华活性材料研究所); 聚乙烯醇硫酸钾(PVSK, 天津轻工业学院提供); 聚二丙烯二甲基氯化铵(PDMAAC, 上海恒谊化工有限公司); 甲苯胺蓝(TB, 日本和光纯药工业株式会社)配成 1% 水溶液; 盐酸和氢氧化钠为分析纯, 其它试剂为化学纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 PVSK 标准溶液的配制与标定 称取 PVSK 0.1 g, 用去离子水溶于 100 mL 容量瓶中, 稀释至刻度。另称取基准物质溴代十六烷基吡啶 0.02 g(称准至 0.000 2 g), 用去离子水溶于 100 mL 容量瓶中, 稀释至刻度, 用移液管准确吸取 5 mL, 放入 50 mL 锥形瓶中, 加 1 滴 TB 指示剂, 用待标定的 PVSK 标准液滴定至溶液呈红紫色, 此时被滴液体由浑浊转清并有沉淀出现, 同时作一个空白试验。

PVSK 标准液的浓度  $c$  按下式计算:

$$c = \frac{0.05m}{0.384(V - V_0)}$$

式中:  $c$  为 PVSK 溶液的浓度, mol/L;  $m$  为基准物溴代十六烷基吡啶的称样量, g;  $V$  为滴定基准物消耗 PVSK 溶液的体积, mL;  $V_0$  为滴定空白消耗 PVSK 溶液的体积, mL。

1.2.2 CMC 取代度的测定 胶体滴定<sup>[6, 7]</sup>: PVSK 和 PDMAAC 均配成浓度为 1 mmol/L 标准溶液。

$-\text{NH}_3^+$  可用标准聚阴离子 PVSK 直接滴定, 聚  $-\text{COO}^-$  则用间接法测定, 即先加入过量的标准聚阳离子

收稿日期: 2003-03-13; 修回日期: 2003-09-10

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(20001398); 广东省科技攻关项目(2KB02902C)

作者简介: 陈浩凡(1972-), 男, 广东揭阳人, 博士研究生。

子 PDMDAAC, 再用 PVSK 返滴定过量的 PDMDAAC。样品于真空烘箱中 80 °C 干燥至恒重, 精确称取一定质量的样品(g), 以蒸馏水溶解, 25 mL 容量瓶定容, 配制成约 0.02% (w) 的稀溶液。

(1) CMC 氨基含量(—NH<sub>2</sub>%) 的测定: 准确移取上述稀溶液 5 mL 于锥形瓶中, 加入 0.2 mol/L 的 HCl 溶液 2 mL 和 TB 指示剂一滴, 摇匀后用 PVSK 标准溶液滴定至溶液由蓝色变为亮紫色(1 min 内不返色), 记下消耗的 PVSK 标准溶液的体积 V<sub>a</sub>; 另移取 5 mL 蒸馏水做空白实验, 得到空白值 V<sub>a0</sub>。

(2) CMC 羧基含量(—COOH%) 的测定: 准确移取上述稀溶液 2 mL 于锥形瓶中, 加 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液 1 mL、PDMDAAC 标准溶液 5 mL 和 TB 指示剂一滴, 摇匀后用 PVSK 标准溶液滴定至溶液由蓝色变为亮紫色(1 min 内不返色), 记下消耗的 PVSK 标准溶液的体积 V<sub>b</sub>(mL); 另做一空白实验, 得到空白值为 V<sub>b0</sub>(mL)。

以上均滴定 3 次取平均值。按下列公式分别计算 CMC 糖的氨基含量(—NH<sub>2</sub>%) 和羧基含量(—COOH%) 即总取代度(DS), N 位和 O 位的取代度, 结果见表 1。

$$w(\text{NH}_2)\% = \frac{M_{\text{CMC}}}{\frac{m \times 5/25}{c_{\text{PVSK}}(V_a - V_{a0})} + 58} \times 100\%$$

$$w(\text{CO}_2\text{H})\% = \frac{M_{\text{CHITOSAN}} - 42 \text{ DD}}{\frac{m \times 2/25}{c_{\text{PVSK}}(V_b - V_{b0})} - 58} \times 100\%$$

$$\text{DS}_N = \text{DD} - w(\text{NH}_2)\%$$

$$\text{DS}_O = \text{DS} - \text{DS}_N$$

式中: c<sub>PVSK</sub> 为 PVSK 标准溶液浓度(mmol/L); m 为样品质量(g); M<sub>CMC</sub> 为 CMC 的链节相对分子质量 219.19; M<sub>CHITOSAN</sub> 为壳聚糖的链节相对分子质量 161.15; 58 为羧甲基相对分子质量; DD 为脱乙酰度; DS<sub>N</sub> 为 N 位取代度; DS<sub>O</sub> 为 O 位取代度; DS 为羧基含量(w(—COOH%)) 即总取代度。

### 1.3 对照分析方法

1.3.1 电位滴定<sup>[4,5]</sup> 准确称取 CMC 0.2 g, 溶于一定量的 0.3 mol/L HCl 标准溶液中, 再加水配成 50 mL 的溶液, 精确量取 20 mL 于锥形瓶中, 用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定, 用 pHS\_3C 型 pH 计测定, 记录 NaOH 标准溶液体积(mL) 与 pH 值对应关系, 可得电位滴定曲线, 用二阶微商法确定突跃点 pH<sub>1</sub>(V<sub>1</sub>)、pH<sub>2</sub>(V<sub>2</sub>) 和 pH<sub>3</sub>(V<sub>3</sub>), 结果见图 1 和表 1。

1.3.2 元素分析<sup>[4]</sup> 由中山大学测试中心对 CMC 做元素分析, 算得总的取代度作为参照(表 1)。

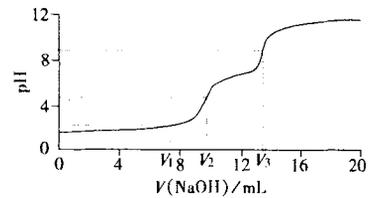


图 1 N, O-羧甲基壳聚糖的电位滴定曲线

Fig. 1 Titration curve of N, O-carboxymethyl chitosan

## 2 结果与讨论

### 2.1 影响胶体滴定分析的因素

2.1.1 pH 值 用 PVSK 滴定时, 不同 pH 值对 PDMDAAC 和 CMC 电荷密度的影响见图 2。

由曲线 3 可见, pH 值对 PDMDAAC 电荷密度在 pH 值小于 7 时无影响, 只有在碱性条件下, PDMDAAC 端基的叔胺基团对电荷密度略有影响, 但影响很小。PDMDAAC 结构中含有离子型的季铵盐, 无论在强酸还是强碱下均能与 PVSK 反应, 因此 pH 值对其离子度的测定影响不大。曲线 1 和 2 显示 pH 值对 CMC 正负电荷密度有很大的影响, 在 1 < pH < 4 时, CMC 的正电荷密度基本为一定值, 在近中性时则急剧下降, 说明溶液在中性及碱性范围能与阴离子试剂反应的阳离子减少; 而 CMC 的负电荷密度正相反, 在 10 < pH < 13 时基

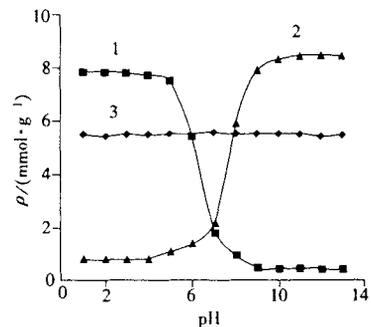


图 2 不同 pH 值对胶体滴定的影响

Fig. 2 The effect of pH on colloid titration  
1. CMC 正电荷密度 (positive charge density of CMC); 2. CMC 负电荷密度 (negative charge density of CMC); 3. PDMDAAC 正电荷密度 (positive charge density of PDMDAAC)

本为一定值, 在近中性时则急剧下降。这是因为 CMC 是两性聚电解质, 其分子结构中含有  $-\text{NH}_2$  和  $-\text{COOH}$ 。  $-\text{NH}_2$  在酸性下能解离生成  $-\text{NH}_3^+$ , 从而与 PVSK 上的阴离子反应。在中性及碱性下,  $-\text{NH}_2$  的解离度下降乃至不能解离出阳离子, 故 PVSK 消耗量减小。因此测定 CMC 正电荷密度一定要在 pH 值小于 4 的情况下进行, 才能获得正确的分析结果; 而  $-\text{COOH}$  则反之, 在中性及酸性下,  $-\text{COOH}$  的解离度下降乃至不能解离出阴离子。此外, 由于负离子胶体会与指示剂作用而使指示剂变色, 因此对于 CMC 负电荷密度 ( $\text{COO}^-$ ) 的测定, 应使用返滴定法, 即在  $10 < \text{pH} < 13$  范围使聚电解质充分解离成离子, 加入过量的阳离子试剂 PDMDAA 与其反应, 再用 PVSK 滴定剩余的 PDMDAAC。

2.1.2 溶液浓度 胶体滴定时试样的浓度均不宜过高, 浓度高会使反应体系变得较为混浊, 而且生成的沉淀还会吸附指示剂, 使指示剂的颜色在终点时变化不敏锐, 甚至看不出颜色的突变, 妨碍终点的判断, 故溶液浓度不宜太大<sup>[7]</sup>。实验发现, CMC(粘均相对分子质量 10~100 万) 的测定浓度在万分之一左右时, 指示剂变色敏锐, 终点易于判断。

2.1.3 滴定速度 滴定速度对分析结果有一定的影响。胶体滴定是分子胶体间的离子反应, 滴定的速度受氢离子电离速度的限制, 反应需要一定时间, 如果滴定速度太快, 正负离子间来不及反应, 滴入的 PVSK 就易于和指示剂作用而变色, 实验发现, 滴定速度应控制在 0.02 mL/s 左右, 溶液由蓝色变为亮紫色(1 min 内不返色) 为终点。为了减小大分子扩散慢带来的不利影响, 滴定时要不断快速搅动。TB 指示剂加入量要一致, 否则, 终点的变色不一致, 造成滴定误差。

2.1.4 离子强度 在体系中加入强电解质氯化钠, 使体系的离子强度增加。氯化钠浓度增大, PVSK 消耗量减小。实验发现, 当氯化钠含量小于  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时终点变色明显; 含量为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时终点变色不太明显; 这是因为聚电解质与带相反电荷的聚电解质形成复合物时的作用力包括静电作用、憎水相互作用、氢键和范德华力等。当 CMC 在极稀的水溶液中解离后, 由于分子链侧基的静电排斥作用, 使分子链处于伸展状态, 离子基团外露, 分子之间相邻链段由于不需要发生分子构型的显著变化, 易于发生复合反应。当有盐类存在时, 体系的极性增强, 使试样的非极性相对提高, 降低在水中的溶解度, 使链的扩展作用减弱而趋于蜷曲, 使高分子间的离子反应受到妨碍, 来不及反应的 PVSK 就会与指示剂结合而使指示剂变色, 故而使 PVSK 消耗量下降。当盐浓度达到一定值后, 分子已蜷曲为自然形态, 故再加盐, 不会有太大的变化<sup>[6]</sup>。因此进行胶体滴定时, 溶液中应尽可能减小共存盐的浓度。

## 2.2 胶体滴定法与电位滴定法和元素分析法的比较

以甲壳素和壳聚糖为原料制备了一系列 CMC, 并对其相对分子质量、取代位置及取代度进行测定, 结果见表 1。

表 1 胶体滴定法与电位滴定法、元素分析法测定 CMC 取代度及取代位置的分析结果

Table 1 Degree of substitution and substituted position of CMC determined by colloid titration, electrolytic titration and elemental analysis

Sample	Total DS of CMC			DS at O		DS at N	
	Electrolytic titration	Elemental analysis	Colloid titration	Electrolytic titration	Colloid titration	Electrolytic titration	Colloid titration
N,O_CMC_1	0.56	0.40	0.38	0.19	0.10	0.37	0.28
N,O_CMC_2	0.75	0.66	0.64	0.35	0.26	0.40	0.39
N,O_CMC_3	0.84	0.80	0.75	0.34	0.31	0.50	0.44
N,O_CMC_4	0.93	0.85	0.86	0.61	0.32	0.61	0.54
N,O_CMC_5	1.18	1.03	1.09	0.46	0.33	0.72	0.76

与电位滴定法比较: 从表 1 中 DS 的数值可以看出, 电位滴定法测定总取代度的结果与胶体滴定法的结果有一定的差异, 而对于 N 位取代度, 两种方法的结果比较接近。这主要是因为电位滴定法在确定第一个突跃点时误差比较大。图 1 为羧甲基壳聚糖 3 号样品的电位滴定曲线,  $\text{pH}_1(V_1)$ 、 $\text{pH}_2(V_2)$  和  $\text{pH}_3(V_3)$  分别为过剩 HCl、 $-\text{COOH}$  和  $-\text{NH}_3^+$  的滴定终点。羧甲基壳聚糖的  $\text{p}K_1$  约为 2.5,  $\text{p}K_2$  约为 6.8<sup>[4,5]</sup>, HCl 看作完全电离, 表观解离常数为 1,  $1/K_1 < 10^4$ , 故  $\text{H}^+$  和  $-\text{COOH}$  合并为一个突跃,

很难区分, 取代度越低, 误差越大。  $K_1/K_2 > 10^4$ , 故  $-\text{NH}_3^+$  独成一个突跃, 实验中  $V_2$ 、 $V_3$  可用二阶微商法确定, 氨基含量( $-\text{NH}_2\%$ )测定的结果与胶体滴定法接近, 因此计算出 N 位取代度较一致。实验发现, 用电位滴定法测定, 操作时间长达 6 h, 测定误差一般为 5% 左右, 重现性小。而胶体滴定法仅需几分钟, 且重现性好。两种滴定法都要求产品形成均匀稳定的溶液, 不能有不溶物和沉淀。

与元素分析法的比较: 从表 1 中 DS 的数值可以看出, 电位滴定与元素分析相差较大, 胶体滴定则与元素分析很接近, 即胶体滴定比电位滴定更准确。元素分析法的优点是, 无论产品处于什么物理状态, 都能测定其元素组成, 且准确度较高; 但元素分析是靠 C、H、O、N 之组成来推断结构式的, 因此对样品的纯度要求很高, 而壳聚糖衍生物常含有结晶水甚至吸附水, 且壳聚糖的脱乙酰度也常不完全, 这些复杂的因素给计算带来很大困难。并且元素分析法只能测定总取代度, 难以对羧甲基在不同位置的取代进行定量分析。与其它仪器测试方法一样费用昂贵。

### 3 结 论

胶体滴定法可用于 CMC 取代度的定量测定, 用直接法和间接法可分别测定产物中氨基和羧基的含量。分析测定时, pH 值一定要在能使 CMC 充分解离成离子的 pH 范围内进行, 并且要尽可能除去共存盐类, 滴定速度以 0.02 mL/s 左右为宜, CMC 的测定浓度在万分之一左右。与电位滴定法和元素分析法相比, 胶体滴定法的试样无需特殊纯化精制, 简单、准确, 费用低, 重现性好且不需任何复杂设备。

参考文献:

- [1] 王志铭, 叶心宇. 灰分分析法测定羧甲基壳聚糖羧甲基取代度[J]. 分析化学, 1994, 22(11): 1121- 1124.
- [2] DONG Y, YUAN Q, WU Y, *et al.* Studies on the effect of substitution degree on the liquid crystalline behavior of cyanoethyl chitosan[J]. J Appl Polym Sci, 2000, 76(14): 2057- 2061.
- [3] 董炎明, 梅雪峰, 袁清, 等. 用 FTIR 测定羧酰化壳聚糖和氰乙基壳聚糖的取代度[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(1): 44- 49.
- [4] MUZZARELLI R A A, TANFANI F, EMANUELLI M, *et al.* *N*-carboxymethylidene chitosans and *N*-carboxymethyl chitosans: Novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate[J]. Carbohydr Res, 1982, 107: 199- 214.
- [5] 陈凌云, 杜予民, 肖玲, 等. 羧甲基壳聚糖的取代度及保湿性[J]. 应用化学, 2001, 18(1): 5- 8.
- [6] 陈夫山, 谢来苏, 魏德津, 等. 用胶体滴定法测定聚合物的电荷[J]. 中国造纸, 2000, 19(2): 30- 35.
- [7] 王雅琼, 许文林. 聚电解质离子度的测定[J]. 精细石油化工, 1999, (6): 45- 47.

## The Determination of Substitution Degree of Carboxymethyl Chitosan by Colloid Titration

CHEN Hao\_fan<sup>1, 2</sup>, PAN Shi\_rong<sup>1</sup>, HU Yu<sup>2</sup>, ZHONG Yue\_si<sup>1</sup>

(1. The Artificial Heart Research Unit, the First Hospital Affiliated to Sun Yat\_sen University, Guangzhou 510089, China;

2. Shenzhen Frontier Amed Police Hospital, Shenzhen 518029, China)

**Abstract:** Colloid titration was used to determine the substitution degree of carboxymethyl chitosan. The effects of pH, concentration of solutions, speed of titration and NaCl concentration on colloid titration were discussed. The advantages and disadvantages of colloid titration were compared with electrolytic titration and elemental analysis. The results showed that colloid titration was a quick and simple quantitative and optimum method to determine substitution degree of carboxymethyl chitosan.

**Key words:** Carboxymethyl chitosan; Substitution degree; Electrolytic titration; Colloid titration; Elemental analysis