

壳聚糖的化学改性及其产物的 红外解析研究

邢荣娥^{1,2} 刘 松^{1,2} 于华华^{1,2} 李智恩¹ 李鹏程¹

(1 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

甲壳素是一种天然高分子多糖, 具有与纤维素相近的骨架结构, 其资源丰富, 用途广泛(方波, 1998)。但由于分子内和分子间存在很强的氢键作用力, 因而不能熔融, 也不溶于普通溶剂(如水、乙醇等)(董炎明等, 2002), 实际应用中较多的是其部分或全部脱乙酰化产物——壳聚糖。壳聚糖虽然可以溶于酸性水溶液, 但不能直接溶于水中, 且在酸性水溶液中不稳定, 也不溶于一般的有机溶剂, 这在很大程度上限制了它的应用(董炎明等, 2002)。所以, 水溶性壳聚糖衍生物的研制正成为一个新的研究方向。壳聚糖分子中 C₂ 位上的-NH₂, C₃、C₆ 位上的-OH, 均具有较强的反应活性, 在适当条件下可进行多种化学修饰, 如酰基化、羧烷基化、硫酸酯化、烷基化、羟烷基化及氰烷基化等。引入上述功能性基团, 可增加壳聚糖的溶解性和功能性, 拓宽了壳聚糖的应用范围。这些衍生物的制备研究已成为壳聚糖应用开发的主要方向之一。

1. 酰基化反应

壳聚糖的性质很大程度上取决于脱乙酰度, 它是壳聚糖最基本的结构参数之一, 用甲壳素制备特定脱乙酰度壳聚糖不易定位, 而由全脱乙酰度壳聚糖反制备特定脱乙酰度壳聚糖则相对较容易。

酰基化反应通常是在酸酐或酰基氯条件下进行的, 反应条件温和, 反应介质对酰化反应程度影响很大。高溶胀甲壳胺在非质子性溶剂(如甲醇 / 乙醇或甲醇 / 甲酰胺)中可以完全乙酰化, 而在甲醇 / 乙酸溶剂中只能获得部分酰基化产物。也可先制成高溶胀胶状物, 实现非均相快速酰基化反应, 或在三氯乙酸 / 二氯乙烷溶剂中进行均相反应。用酸酐作酰化试剂, 所得酰化产物的优化条件为: 1g 壳聚糖分散于 30mL 甲酰胺中, 加入 2.75g 邻苯二甲酸酐或 1.86g 丁二酸酐在 N₂ 气保护下于 125℃ 回流 0.5~6.5h, 冰水沉淀得产物(Nishimura *et al.*, 1990, 1991; Kutita *et al.*, 1982)。

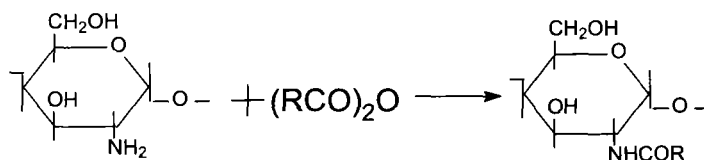
在 1740 cm⁻¹ 左右出现了羰基伸缩振动谱带, 原壳聚糖 ν(C-H) 谱带随着酰化剂烷基

通信作者: 李鹏程, 责任研究员, 博士生导师, 现从事海洋生物活性物质研究, E-mail: pcl@ms.qdio.ac.cn

第一作者: 邢荣娥, 出生于 1975 年, 博士。电话: 0532-2898707

收稿日期: 2003 年 4 月 10 日

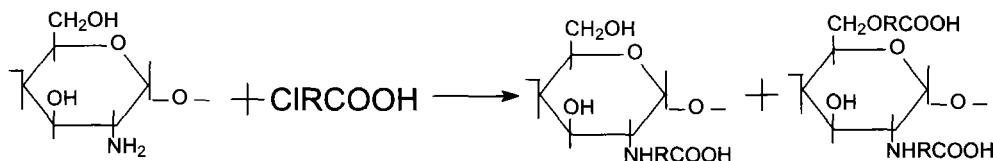
的增加及取代度的增加而增强。并且随着酰化剂烷基链的增长,在 784 cm^{-1} 出现了 C-H 面内摇摆振动峰。



2. 羧烷基化反应

壳聚糖的羧烷基化产物主要作为表面活性剂,以羧甲基、乙基、丁基研究居多。甲壳质或甲壳胺在碱性条件 NaOH 下,与氯乙酸反应可得到羧甲基化甲壳质或甲壳胺。也可在 DMSO 溶剂中对溶胀甲壳质或甲壳胺进行羧甲基化,即可避免强 NaOH 对甲壳质或甲壳胺的降解现象,从而更好地完成其基化反映。现较优化条件为:5g 壳聚糖悬浮于 50mLDMSO 中,搅拌下 20min 内加入 10mol NaOH13mL。碱性悬浮物搅拌 45min 后,加入氯乙酸,反应混合物在 60°C 下反应 2h 后加入 5mL 冰冻蒸馏水,然后用冰醋酸调节 pH 到 7.0。抽滤得羧甲基壳聚糖。

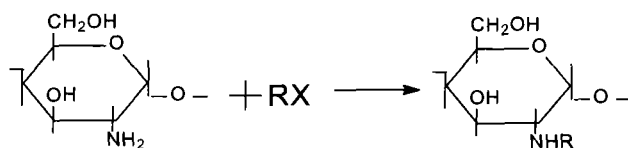
羧酸的 $\nu(\text{C}=\text{O})$ 谱带(1734 cm^{-1})及叔胺的 $\nu(\text{C}-\text{N})$ 谱带(1627 cm^{-1} 、 1550 cm^{-1} 、 1380 cm^{-1} 与 1321 cm^{-1})是主要的特征谱带。 2900 cm^{-1} 附近 $\nu(\text{C}-\text{H})$ 变得很宽,是羧酸的标志。桥键 $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ 谱带 1153 cm^{-1} 和一级醇羟基 $\nu(\text{C}-\text{O})$ 谱带 1038 cm^{-1} 和二级醇羟基 $\nu(\text{C}-\text{O})$ 谱带 1070 cm^{-1} 均比原壳聚糖稍强,说明出现了氧上取代。叔胺伸缩振动强谱带出现在 3300 cm^{-1} 左右,从而与 3420 cm^{-1} 的羟基谱带合并产生 3366 cm^{-1} 的一个很宽的谱带。



3. 烷基化反应

与合成材料相比,壳聚糖是一种毒性低,可降解生物相容性良好的天然聚合物,在药物控释领域已受到广泛重视。科学家们将壳聚糖制成微球或微胶囊等用于控释系统(Yao *et al.*, 1994, 1995)。但阻碍壳聚糖在药物释放方面应用的原因是壳聚糖的亲水性,使得一些药物释放速率过快,难以达到缓释和控释的目的。壳聚糖的烷基化衍生物可以提高其疏水性,解决了壳聚糖亲水这一难题。壳聚糖与卤代烷在碱性溶液中反应即可得烷基化产物。将 2g 壳聚糖加入到含有 10%(质量分数)NaOH 的异丙醇中, 70°C 搅拌 30min,逐滴加入卤代烷,反应 4h 后,用乙醚沉淀得烷基化壳聚糖(Dunn *et al.*, 1993)。

饱和 C-H 的伸缩振动(2962 cm^{-1} 、 2920 cm^{-1} 、 2874 cm^{-1})和变形振动(1383 cm^{-1} 、 1424 cm^{-1})都比原壳聚糖突出,是分子中增加了一些乙基的缘故。 1383 cm^{-1} 也是 C-N 伸缩振动的体现。C-O 的三条谱带(1153 cm^{-1} 、 1068 cm^{-1} 、 1031 cm^{-1})与壳聚糖相比从强度和位置都相似,说明反应未发生在羟基上。



4. 羟烷基化反应

壳聚糖溶于酸性溶液中, 从而形成直链聚阳离子, 成膜性好, 可附于角蛋白与类脂质上, 有一定的水分调节功能。配入化妆品中具有保湿、抑菌作用, 又不引起任何的过敏刺激反应(李同信等, 1993)。而在壳聚糖上引入强亲水性基团羟烷基, 可改善其水溶性, 提高吸湿、保湿性能, 增强抑菌活性(林友文等, 2002)。壳聚糖在乙醇、异丙醇溶剂中可与环氧乙烷或 2-氯乙醇反应制得壳聚糖的羟基化产物。现常用方法是: 将 1g 壳聚糖用 50mL 50%(W/W)NaOH 制成碱性壳聚糖后, 放入 -18°C 冰柜中冷冻过夜。将冰冻的碱性壳聚糖中加入 19mL 环氧乙烷, 于 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 冰浴中搅拌 2h, 再于 34°C 下恒温搅拌反应 10h。冷却加入 100mL 蒸馏水, 用 HCl 滴至中性, 乙醇沉积得产物。

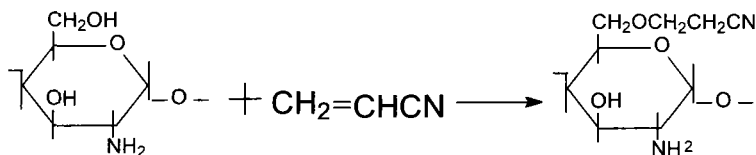
反应后由于 CH_2 基团的增加而使 CH_2 的伸缩振动 2924 cm^{-1} 和变形振动 1453 cm^{-1} 、 1410 cm^{-1} 三峰强度显著增加, 而在 3405 cm^{-1} 有很强的吸收说明羟乙基壳聚糖保留了与原壳聚糖同样数目的羟基, 即反应后羟基数目未变。 687 cm^{-1} 出现锐峰是 O-H 面外弯曲谱带, 而 867 cm^{-1} 应归属于 $\nu(\text{C-H})$ 。说明反应主要发生在 C_6 位的羟基上。



5. 氰烷基化反应

氰烷基化壳聚糖是制备其他壳聚糖衍生物的一类重要的中间体, 氰基可以被水解、还原等。壳聚糖在 NaOH 条件下与丙烯腈反应制得 O-氰基化产物。对室温反应, 氰基化取代反应主要发生在氧上, 高于室温, 反应在氮上也可发生, 因此可通过温度来调节氰乙基的取代位置; 而且在不同的反应时间下, 产物的取代度也不同, 如想得到不同取代度的样品可通过控制反应时间来实现。现较常用制备条件为: 将 1g 壳聚糖与 5mL NaOH 溶液混合, 室温下放置 12h 使其充分溶胀后置于 -18°C 冰柜中过夜, 将此冰冻壳聚糖直接与 20mL 丙烯腈混合, 在室温下控制不同的反应时间, 得不同取代度样品(Tokuta *et al.*, 1983; 董炎明等, 1998)。

氰乙基化壳聚糖的氰基特征吸收 2249 cm^{-1} 非常突出。同时原壳聚糖 $\nu(\text{O-H})$ 谱带减弱, 而 $\nu(\text{C-H})$ 和 $\nu(\text{C-O})$ 均增强, $\nu(\text{C-O})$ 表现为 1061 cm^{-1} 和 1107 cm^{-1} 双重峰, 也是由于形成新的 C-O 键而使原壳聚糖两类羟基伸缩振动峰向高波数移动。同样由于基团间相互作用的变化(新出现氰基, 羟基减少), 特别是氢键的变化, 原壳聚糖的 1655 cm^{-1} 、 1596 cm^{-1} 和 1317 cm^{-1} 三条谱带位移到 1660 cm^{-1} 、 1590 cm^{-1} 和 1320 cm^{-1} , 仍分别归属于酰胺 I 谱带, N-H 变形振动谱带和酰胺 III 谱带。



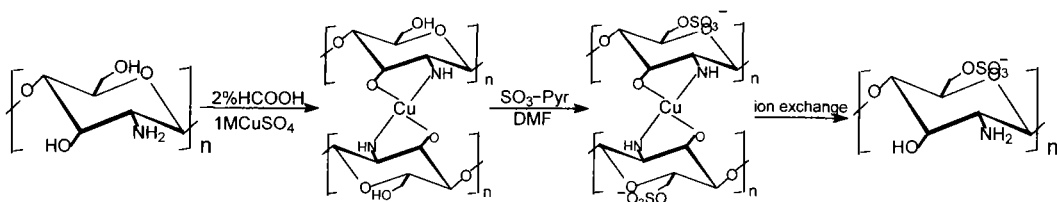
6. 硫酸酯化反应

壳聚糖硫酸酯化由于具有与肝素类似的结构和强聚阴离子性质而引起了广大学者的关注。通过对壳聚糖进行硫酸酯化修饰,不但可以大大提高它们的水溶性(Holme *et al.*, 1997),而且还表现出抗凝(Drozdz *et al.*, 2001)、抗栓(Amiji *et al.*, 1998)、抗动脉粥样硬化(Gamzazade *et al.*, 1997;丁华等,2001)、抗肿瘤(Narata *et al.*, 1990)和抗病毒(Nishimura,1998)等多方面的活性。在壳聚糖不同位置取代的硫酸酯化衍生物其活性不同,因此对壳聚糖硫酸酯的活性和构效关系进行了深入研究,首先就需要在壳聚糖的各种不同位置选择性地硫酸酯化,即对各种取代位置的壳聚糖硫酸酯来进行定位制备。

(1) 壳聚糖 C₆-O-位的硫酸酯化

因壳聚糖分子结构上含有反应活性很强的氨基,为制备 C₆-O-位取代衍生物需避免氨基参与酯化反应。并利用伯羟基和仲羟基的反应活性差异来使硫酸酯基只在 C₆-O-位上引入,可采用对 C₂-N-位氨基和 C₃-O-位仲羟基进行保护来制得,将 500mg 壳聚糖用 50mL 2%的甲酸溶解,滤去不溶物后滴加 8.3mL 1mol CuSO₄ · 5H₂O 溶液,在室温搅拌 16h 后过滤,分别用水、丙酮、乙醚洗涤,然后将沉淀在 30mL 无水 DMF 中浸润 16h,过滤后再分散于 30mL 无水 DMF 中,将溶于 15mL 无水 DMF 中的 1.9g SO₃ · 吡啶(12.0 mmol)在 0~2℃ 下慢慢滴入,搅拌 1h 后再升温至 50℃,在 N₂ 气中搅拌 16h。最后将该溶液用 NaHCO₃ 调节 pH 为 8,并加入 100mL 水透析 3d,再用 AmberliteIRC 718 离子交换柱去除铜离子,然后冷冻干燥即得产品(Baumann *et al.*, 2001)。

在 1 240 cm⁻¹(O=S=O)和 810 cm⁻¹(C-O-S)出现硫酸酯基的特征吸收,证明硫酸酯基已成功地引入到壳聚糖的 C₆ 位上。



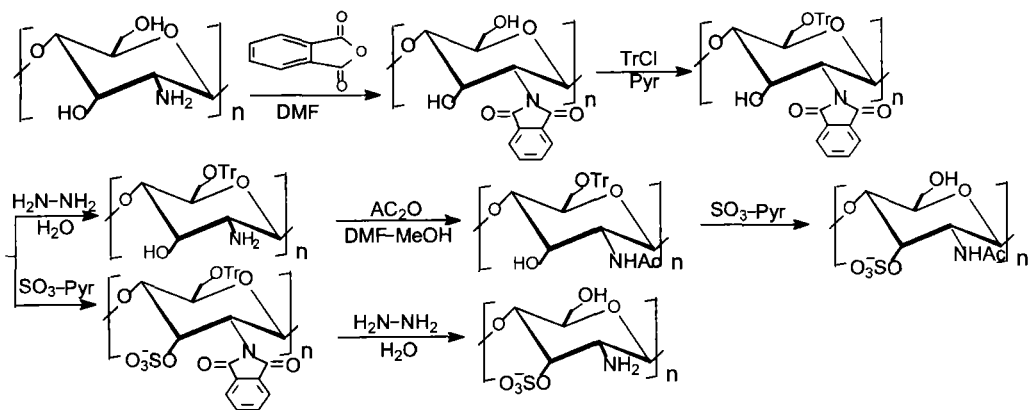
(2) 壳聚糖 C₃-O-位的硫酸酯化

为选择性制备 C₃-O-位硫酸酯,需先对 C₂-N-位氨基和 C₆-O-位羟基进行保护,C₃-O-位磺化后,水解去除保护基得产品。

将 5.0g 壳聚糖和 13.8g 邻苯二甲酸酐溶于 100mLDMF 中,在 130℃ 下用 N₂ 保护反应 5~7h,混合物变成黏性透明溶液后,倾入冰水中过滤,在索氏提取器中用乙醇提取,再用 P₂O₅ 干燥,得 8.7g2-苯二甲酰亚氨基壳聚糖。然后将 5.0g2-苯二甲酰亚氨基壳聚糖溶于 75mL 吡啶中,加入 47.9g 氯化三苯基甲烷,在 90℃ 下 N₂ 气氛中搅拌反应 24h,冷

至室温后浓缩成浆状, 倾入 300mL 乙醇中, 过滤, 用乙醚洗涤后在用 P_2O_5 干燥得 9.07g 2-苯二甲酰亚氨基-6-O-三苯甲基壳聚糖。将上述产物与 20mL 水合并混合后, 再在 N_2 保护下于 $100^\circ C$ 搅拌反应 15h, 冷却后加入 50mL 水稀释, 旋转浓缩, 再用乙醇和乙醚洗涤后干燥得 C_3 -O-位硫酸酯化壳聚糖产品(Nishimura *et al.*, 1991)。

在 1230 cm^{-1} ($S=O=S$) 和 809 cm^{-1} ($C-O-S$) 硫酸酯基的特征吸收, 证明硫酸酯基已成功地引入到壳聚糖的 C_3 位上。

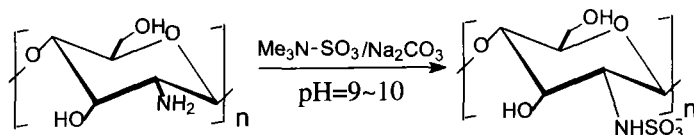


(3) 壳聚糖 C_2 -N-位的硫酸酯化反应

为选择性制备 C_2 -N-位磺化产品, 需避免 C_3 和 C_6 位羟基参与反应。研究表明脱硫酸肝素在碱性水溶液条件(pH9~10)下用 Me_3N-SO_3 或 SO_3 /吡啶作为磺化试剂可使其 C_3 和 C_6 位羟基不参与反应(Ayutte *et al.*, 1986)。受此启示, 用此法制备出了 C_2 -N-位的磺化产品。

将 1.0g 壳聚糖分散于 50~200mL 水中, 加入 1.3~2.2g Na_2CO_3 和 2.5~4.5g Me_3N-SO_3 后在 $50\sim70^\circ C$ 反应 4~12h 直至形成透明的黏性溶液或凝胶, 冷却后依次用蒸馏水、含 Amberlite IR-120 离子交换树脂的蒸馏水、0.025mol NaOH 溶液和蒸馏水透析, 再冷却干燥可得 1.1~1.5g 各种取代度的白色绒状固体。

在 1232 cm^{-1} ($S=O=S$) 和 1027 cm^{-1} ($N-S-O$) 出现了硫酸酯基的特征吸收, 证明硫酸酯基已成功地引入到壳聚糖的 C_2 位上。



对于硫酸酯化定位反应的鉴别, 还需借助核磁谱才能鉴别出在哪个位上进行了取代反应。

采用其他一些制备技巧, 保护措施, 还可对 C_3 、6-O-位、 C_2 、3-位、 C_2 、6-位、 C_2 、3、6-位进行磺化得到相应的硫酸酯化产物(Holme *et al.*, 1997)。

目前有关壳聚糖的各种化学改性衍生物的制备和应用研究都十分活跃, 本文对其几

类制备进行了简明阐述,为壳聚糖衍生物的制备和其应用提供了参考。

参 考 文 献

- 丁华、祝清芬、徐鲁源等, 2001. 几丁糖脂抗粥样硬化作用研究[J]. 中国海洋药物, **20**(1):12
- 方波、江体乾, 1998. 磺化羟乙基壳聚糖的研制. 中国生化药物杂志, **19**(4):163~166
- 李同信、王雪梅、李盟等, 1993. 3-氯-2-羟丙基三甲胺氯化物的全成及其固色作用. 精细化工, **10**(2):19
- 林友文、林青、蒋智清等, 2002. 羟丙基三甲基氯化铵壳聚糖的制备及其吸湿、保湿性能. 应用化学, **19**(4):351~354
- 董炎明、李志强, 1998. 新的液晶性壳聚糖-氰乙基壳聚糖的合成与表征. 高等学校化学学报, **19**(8):1343~1345
- 董炎明、吴玉松、王勉, 2002. 邻苯二甲酰化壳聚糖的合成与溶致液晶表征. 物理化学学报, **18**(7):636~639
- 董炎明、吴玉松、王勉等, 2002. 邻苯二甲酰化壳聚糖中酰胺酸取代度的红外测定. 化学通报, **2**:123~125
- Amiji M M, 1998. Platelet adhesion and activation on an amphoteric chitosan derivatives bearing sulfonate groups. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **10**:263
- Ayotte L, Perlin A S, 1986. NMR Spectroscopic observations related to the function of sulfate groups in heparin. Calcium binding VS biological activity. *Carbohydrate Research*, **145**:267
- Baumann H, Faust V, 2001. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl, and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. *Carbohydrate Research*, **331**:43
- Drozdz N N, Sher A I, Makarov V A *et al.*, 2001. Comparison of antithrombin activity of the polysulphate chitosan derivatives in vivo and in vitro system[J]. *Thrombosis Research*, **102**:445
- Dunn E J, Ahang x, Sun D *et al.*, 1993. Synthesis of N-(sminoalkyl) chitosan for microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.*, **50**:353~365
- Kittur F S, Harish K V, Prashanth *et al.*, 2002. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, **49**:185~193
- Gamzazade A I, Nasibov S M, Rogozhin S V, 1997. Study of lipoprotein sorption by some sulfoderivatives of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **34**:381
- Holme K R, Perlin A S, 1997. Chitosan N-Sulfate A Water-Soluble Polyelectrolyte[J]. *Carbohydrate Research*, **302**:7.
- Kurita K, Ichikawa H, Ishizeki S *et al.*, 1982. Modification reaction of chitin in highly swollen state with aromatic cyclic carboxylic acid anhydrides. *Makromol Chem*, **183**:1161~1169
- Murata J, Saiki I, Matsuno K *et al.*, 1990. Inhibition of Tumor Cell Arrest in lungs by Antimetastatic chitin Heparinoid. *Jpn. J. Cancer Res*, **81**:506
- Nishimura S I, 1998. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates. *Carbohydrate Research*, **306**:427
- Nishimura S, Kohgo O, Kurita K, 1991. Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide: syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic solvents by regioselective chemical modification. *Macromolecules*, **24**:4745~4748
- Nishimura S, Kohgo O, Kurita K *et al.*, 1990. Syntheses of novel chitosan derivatives soluble in organic solvents by regioselective chemical modification. *Chem Lett*, **243**~246
- Tokura S, Nishi N, Nishimura S *et al.*, 1983. Studies on chitin IX. Specific binding of calcium ions by carboxymethyl-chitin[J]. *Polymer J.*, **15**(7):553~556
- Yao K D, Peng T, Feng H B *et al.*, 1994. Swelling kinetics and release characteristic of crosslinked chitosan: Polymer network (semi-IPN) hydrogels. *J. Polym. Sci (P A)*, **32**:1213~1223
- Yao K D, Yin Y J, Xu M X *et al.*, 1995. Investigation of pH-Sensitive Drug Delivery System of Chitosan/Gelatin Hybrid Polymer Network. *Polym Intern*, **38**:77~82

The Research of Chemical Modification of Chitosan and IR Analysis

XING Rong^{1,2} LIU Song^{1,2} YU Huahua^{1,2} LI Zhien¹ LI Pengcheng¹

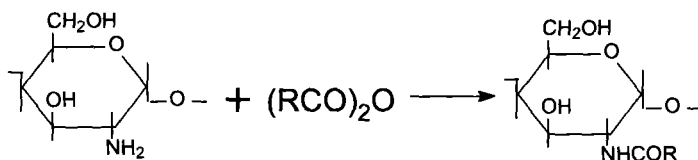
(1 Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(2 Graduate Institute, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

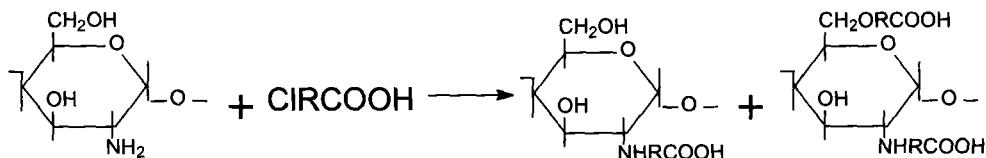
Abstract

Chitosan is a potential polysaccharide resource owing to its specific structure and properties. However, since chitosan itself is insoluble in water at neutral pH, the application of chitosan is quite limited. Therefore, chemical modification of chitosan to make it water-soluble materials is of prime importance for making novel biomaterials. This paper mainly expounds on the chemical modification of chitosan, such as N-acetylated chitosan, hydroxyacylated chitosan, sulfated chitosan, and so on. This paper can serve as reference for further development of chitosan. Above-mentioned examples follow:

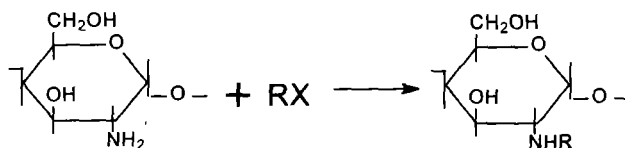
1. N-acetylated chitosan



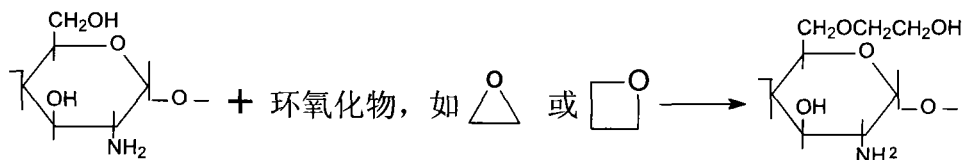
2. Carboxalkylated chitosan



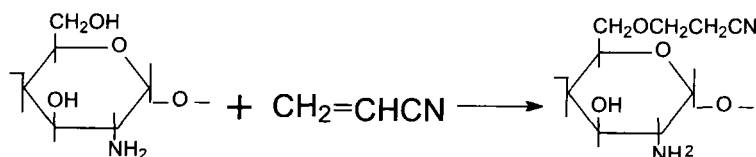
3. Alkylated chitosan



4. Hydroxyalkylated chitosan

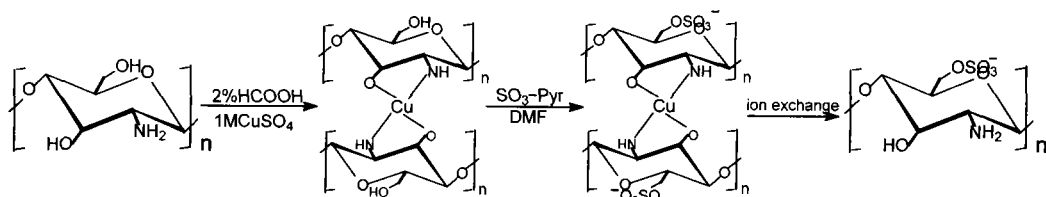


5. Cyanoalkylated chitosan

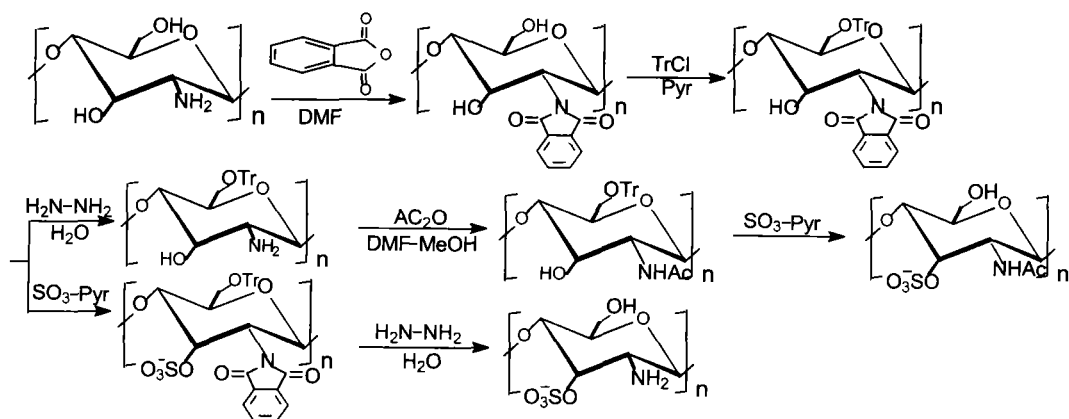


6. Regioselective sulfated chitosan

(1) C₆-O-sulfated chitosan



(2) C₃-O-sulfated chitosan



(3) C₂-N-sulfated chitosan

