

· 研究简报 ·

亲核取代法制备壳聚糖 6-OH 固载环糊精衍生物*

陈 煜^{1*} 杨 凯² 叶彦春² 王立业² 初立秋² 谭惠民¹

(北京理工大学¹ 材料科学与工程学院² 理学院 北京 100081)

摘 要 通过苯甲醛对壳聚糖 2-NH₂ 希夫碱化保护后,将壳聚糖 C₆ 位—OH 与对甲苯磺酰氯反应形成对甲苯磺酰酯,然后用 β-环糊精(β-CD)的单一—NH₂ 取代衍生物与之发生亲核取代反应,将环糊精固载到壳聚糖分子链上;最后,将得到的固载产物中的希夫碱脱保护后得到壳聚糖 6-OH 定位固载环糊精衍生物.采用 FTIR, ¹³C-NMR, 元素分析, UV 等表征手段对各步产物的结构进行了表征.紫外光谱法测定表明,β-CD 在壳聚糖分子链 C₆ 位上的固载率达到了 170.81 μmol·g⁻¹, 远高于文献报道的其它方法制得的固载产物.采用 XRD 对各步产物的结晶性能进行了研究.

关键词 壳聚糖, β-环糊精, 对甲苯磺酰化, 亲核取代, 固载

壳聚糖吡喃环上的 2-NH₂ 赋予其良好的可修饰性和生理活性,使其成为新型功能高分子研究的热点^[1-3].环糊精具有独特的内疏水、外亲水的空腔结构,是超分子化学研究较多的一类大环主体化合物^[4-6].将环糊精在壳聚糖分子链上固载,可将两者的独特功能有效结合,制备出性能优异的生物大分子基超分子主体.目前以壳聚糖固载环糊精构筑超分子主体的文献报道很多^[7-8],但大多是将环糊精固载在易于改性的壳聚糖的 2-NH₂ 上,不利于对氨基的进一步改性及发挥其独特性能.若能在壳聚糖的 6-OH 实现环糊精的固载,并保留 2-NH₂,可大大扩展这类衍生物的应用领域.对这方面的研究有少量文献采取不同的方法进行了报道^[9-12],但所达到的环糊精定位固载效率普遍不高,远低于环糊精在壳聚糖 2-NH₂ 上的固载率.实现环糊精在壳聚糖 6-OH 上的高效定位固载,是扩展其功能性应用领域的重要基础.

由于对甲苯磺酰酯基良好的亲电性能及易离去性,可制备各种多糖的羟基定位衍生物. Kurita 等^[13-15]和 Morita 等^[16]在 1992~1994 年采用这类反应制得多种甲壳素/壳聚糖衍生物,但此后鲜见此方法制备甲壳素/壳聚糖衍生物的进一步报道.本研究利用上述方法,将壳聚糖 2-NH₂ 保护后,对其 6-OH 定位对甲苯磺酰基酯化,再采用单氨基取代的环糊精衍生物亲核取代对甲苯磺酰酯基,脱除壳聚糖氨基保护后构筑具有高固载率,可

靠结构的壳聚糖 6-OH 定位固载环糊精的超分子主体.主要反应路线如图 1 所示.

1 仪器与试剂

Nicolet NEXUS-470 型红外光谱仪;Vario EL 元素分析仪;Philips X'Pert Pro 型多晶 X 射线衍射仪;AL-300 型超导核磁共振仪,TMS 为参比;TU-1810 型紫外-可见分光光度计.壳聚糖,脱乙酰度 ≥95%,分子量 1.05 × 10⁶,浙江澳兴生物技术有限公司;β-环糊精,生物试剂,天津博迪化工有限公司;对甲苯磺酰氯,化学纯,天津光复精细化工研究所;其它试剂均为市售分析纯.

2 合成与表征

2.1 单-6-对甲苯磺酰化-β-环糊精(6-OTS-β-CD) [1] 的合成 向烧瓶中加入 10 g β-环糊精,加入 100 mL 1 wt% 的 NaOH 水溶液,将烧瓶置于冰水浴中搅拌,至完全溶解.将 1.689 g 对甲苯磺酰氯溶于 5 mL 乙腈中,用恒压滴液漏斗缓慢的滴加到反应体系中,逐渐有白色沉淀析出.继续搅拌反应 2 h 后,加入适量的氯化铵调节溶液的 pH 值到 8.0,有大量的白色物质析出.用去离子水和乙醇分别清洗抽滤 2 次,然后将滤饼真空干燥得到白色固体产品 6-OTS-β-CD,产率 78%. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, δ): 102.27(C₁, β-CD), 101.30(C₁', β-CD), 72.09(C₂, β-CD), 73.11(C₃, β-CD), 72.74(C₃', β-CD), 81.55(C₄, β-CD), 80.77(C₄', β-CD), 72.45(C₅, β-CD), 68.95(C₅', β-CD), 59.96(C₆, β-

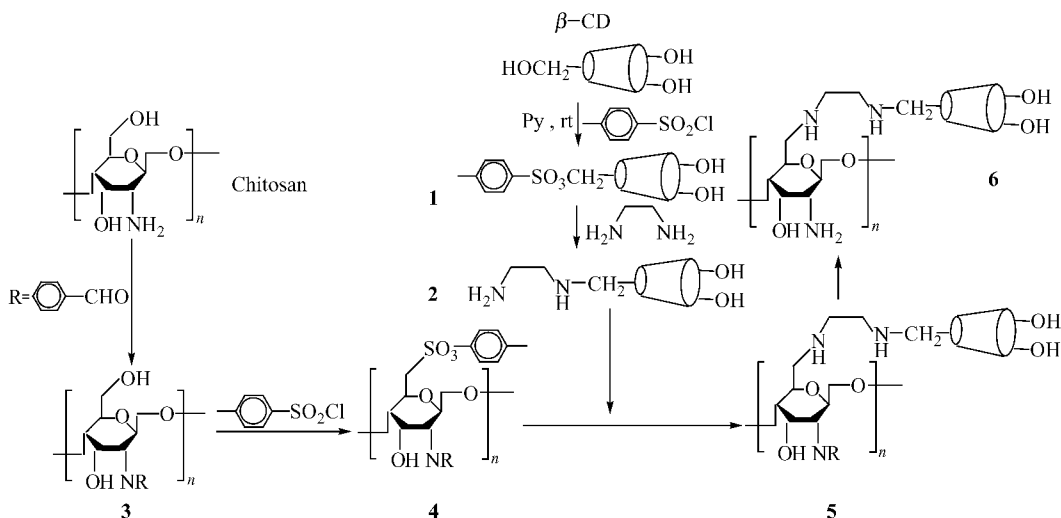


Fig. 1 The nucleophilic displacement reaction routes of immobilization of β -CD on the C_6 position of chitosan

CD), 69.77 (C_6' , β -CD), 21.26 (CH_3), 144.88 (C—S 苯环), 127.64 (苯环, 邻位 C), 129.95 (苯环, 间位 C), 132.69 (苯环, 对位 C). FTIR (KBr, cm^{-1}): 3395 (ν_{O-H}), 2936 (ν_{asCH_2}), 1641 (δ_{HOH} , β -CD 物理吸附水), 1599 ($\nu_{C=C}$, 苯环), 1450 (δ_{CH_2}), 1416 (δ_{O-H}), 1369 ($\nu_{asS=O}$), 1330 (δ_{CH}), 1175 ($\nu_{s=O}$), 1156 (ν_{C-O-C}), 1030 (ν_{C-O}), 931 (ν_{C-O-C}), 850 (δ_{C-H} , 苯环), 813 (δ_{C-H} , 苯环). UV (DMSO, nm): $\lambda_{max} = 267$ (—OTS 苯环) 274 (磺酸酯基).

2.2 单[6-(2-氨基乙基)-氨基-6-脱氧]- β -环糊精 (CDen) 2 的合成 在装有回流冷凝管的三口烧瓶中, 加入 6-OTS- β -CD, 氮气保护下加入过量的乙二胺, 升温至 70 $^{\circ}C$ 后搅拌反应 4 h, 在该温度下减压蒸除过量的乙二胺, 得到浅黄色固体. 用少量热水将其溶解后, 用无水乙醇沉淀, 抽滤, 得到白色粉末, 真空干燥得 CDen, 产率 86%. ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , δ): 104.61 (C_1 , β -CD), 104.36 (C_1' , β -CD), 74.53 (C_2 , β -CD), 75.85 (C_3 , β -CD), 86.25 (C_4 , β -CD), 83.84 (C_4' , β -CD), 73.09 (C_5 , β -CD), 74.79 (C_5' , β -CD), 60.14 (C_6 , β -CD), 62.97 (C_6' , β -CD), 21.26 (CH_3), 52.44 (α -C, 乙二胺), 44.06 (β -C, 乙二胺). FTIR (KBr, cm^{-1}): 3370 ($\nu_{O-H} + \nu_{N-H}$), 2936 (ν_{asCH_2}), 1583 (δ_{N-H}), 1450 (δ_{CH_2}), 1416 (δ_{O-H}), 1330 (δ_{CH}), 1156 (ν_{C-O-C}), 1031 ($\nu_{C-N} + \nu_{C-O}$, 强度较 6-OTS- β -CD 增强), 931 (ν_{C-O-C}).

2.3 2-苯甲醛希夫碱化壳聚糖 (BCTS) 3 的合成 称取 0.5 g 的壳聚糖溶于 100 mL 2 wt% 的稀

醋酸溶液中, 加 70 mL 甲醇稀释, 在室温下搅拌使之溶解. 将适量苯甲醛溶于 30 mL 甲醇后, 缓慢滴加到反应体系中, 在 60 $^{\circ}C$ 下搅拌反应. 然后加入 5% NaOH 溶液调节其 pH 值, 使产生的希夫碱沉淀析出, 60 $^{\circ}C$ 水浴条件下继续搅拌反应一段时间. 过滤, 用甲醇洗涤除去多余苯甲醛, 再依次用乙醇、乙醚洗涤, 60 $^{\circ}C$ 真空干燥得到 BCTS, 产率为 89%. FTIR (KBr, cm^{-1}): 3443 ($\nu_{O-H} + \nu_{N-H}$), 2926 (ν_{-CH_2-}), 2878 (ν_{-CH_3}), 1641 ($\nu_{C=N}$), 1601 ($\delta_{N-H} + \nu_{C-N}$, 较 CTS 明显减弱), 1578 ($\nu_{C=C}$, 苯环), 1460 (δ_{-CH_2-}), 1381 (δ_{-CH_3}), 1317 ($\nu_{C-N} + \delta_{N-H}$), 1270 (ν_{C-O-C}), 1151 (ν_{C-O-C}), 1050 (ν_{C-N}), 756 (δ_{C-H} , 苯环), 693 (δ_{C-H} , 苯环). 元素分析: CTS, 5.27 (C%/N%), BCTS, 11.37 (C%/N%), 计算得希夫碱取代度为 79.3%. UV (2% 醋酸的甲醇溶液, nm): $\lambda_{max} = 249, 281$ (希夫碱苯环). 对苯甲醛 249 nm 处的吸收做紫外吸光度-浓度标准曲线后, 对 2% 醋酸的甲醇溶液溶解的壳聚糖希夫碱测紫外吸收, 计算得希夫碱取代度为 75.3%.

2.4 6-对甲苯磺酰化-2-苯甲醛希夫碱化壳聚糖 (6-OTs-BCTS) 4 的合成 将 0.5 g 希夫碱化壳聚糖浸泡在 30 mL 1% 的 NaOH 水溶液中溶胀 1 h, 在冰水浴中向溶液体系中缓慢滴加含 0.6 g 对甲苯磺酰氯的三氯甲烷溶液, 30 min 滴完, 在冰水浴中反应 1 h 后接着在 30 $^{\circ}C$ 下反应 1 h, 抽滤, 得浅黄色固体, 用无水乙醇洗去未反应的对甲苯磺酰氯, 真空干燥得 6-OTs-BCTS, 产率 83%. FTIR (KBr, cm^{-1}): 3443 ($\nu_{O-H} + \nu_{N-H}$), 2926 (ν_{-CH_2-}),

2878($\nu_{-\text{CH}_3}$), 1641($\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 1594($\delta_{\text{N}-\text{H}} + \nu_{\text{C}-\text{N}} + \nu_{\text{C}=\text{N}}$ 较 BCTS 显著增强), 1490($\nu_{\text{C}=\text{C}}$, 对甲苯磺酰基), 1460($\delta_{-\text{CH}_2-}$), 1381($\delta_{-\text{CH}_3}$), 1367($\nu_{\text{asS}=\text{O}}$), 1185($\nu_{\text{sS}=\text{O}}$), 1151($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$), 1060($\nu_{\text{C}-\text{N}}$), 815($\delta_{\text{C}-\text{H}}$, 对位取代苯环, 新出现), 756($\delta_{\text{C}-\text{H}}$, 苯环), 693($\delta_{\text{C}-\text{H}}$, 苯环). UV(2% 醋酸的甲醇溶液, nm): $\lambda_{\text{max}} = 249$ (希夫碱苯环), 262($-\text{OTs}$) 273($-\text{OTs}$) 289(希夫碱苯环).

2.5 2-苯甲醛希夫碱化壳聚糖 6-OH 定位固载环糊精衍生物(6-CD-BCTS) 5 制备 在装有回流冷凝管和滴液漏斗的三口烧瓶中, 按照质量比为 1.5:1 加入 CDen 和 6-OTs-BCTS 及 50 mL *N*-甲基吡咯烷酮(NMP), 搅拌 30 min 使反应物充分混合均匀. 升温至 70℃, 搅拌反应 6 h, 抽滤得到淡黄色固体, 用 NMP 洗去未反应的原料, 抽滤得到的淡黄色固体, 真空干燥得到 6-CD-BCTS, 产率 37%. FTIR(KBr, cm^{-1}): 3432($\nu_{\text{O}-\text{H}} + \nu_{\text{N}-\text{H}}$), 2927($\nu_{-\text{CH}_2-}$) 2878($\nu_{-\text{CH}_3}$ 较 6-OTs-BCTS 变弱), 1650($\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 1596($\delta_{\text{N}-\text{H}} + \nu_{\text{C}-\text{N}}$ 较 6-OTs-BCTS 变弱), 1450($\delta_{-\text{CH}_2-}$), 1416($\delta_{\text{O}-\text{H}}$), 1385($\delta_{-\text{CH}_3}$), 1330(δ_{CH}), 1260($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$), 1151($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$), 1060($\nu_{\text{C}-\text{N}}$), 1027($\nu_{\text{C}-\text{O}}$), 931($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$), 759($\delta_{\text{C}-\text{H}}$, 苯环, 较 6-OTs-BCTS 变弱), 693($\delta_{\text{C}-\text{H}}$, 苯环, 较 6-OTs-BCTS 变弱).

2.6 6-OH 定位固载环糊精衍生物(6-CD-CTS) 6 的制备 将得到的 6-CD-BCTS 浸泡在 5 wt% 醋酸水溶液中 24 h, 使希夫碱分解脱除保护, 过滤, 用乙醇洗涤两次后真空干燥, 得到固载产物 CTS-CD, 产率为 71%. FTIR(KBr, cm^{-1}): 3438($\nu_{\text{O}-\text{H}} + \nu_{\text{N}-\text{H}}$) 2927($\nu_{-\text{CH}_2-}$) 2878($\nu_{-\text{CH}_3}$), 1596($\delta_{\text{N}-\text{H}} + \nu_{\text{C}-\text{N}}$), 1450($\delta_{-\text{CH}_2-}$), 1416($\delta_{\text{O}-\text{H}}$), 1385($\delta_{-\text{CH}_3}$), 1330(δ_{CH}), 1260($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$), 1151($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$), 1060($\nu_{\text{C}-\text{N}}$), 1027($\nu_{\text{C}-\text{O}}$), 931($\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$).

2.7 β -环糊精固载率的测定 β -CD 在浓硫酸作用下, 水解生成单糖, 并迅速脱水生成糖醛衍生物, 然后与苯酚缩合成橙黄色化合物, 在波长 490 nm 处和一定的浓度范围内, 其吸光度与多糖含量呈线性关系正比^[17]. 参照文献^[18], 做出环糊精标准工作曲线, 如图 2 所示.

CTS-CD 与 CTS 在浓硫酸水解作用下得到的紫外吸收谱图如图 3 所示. CTS-CD 的浓硫酸水解

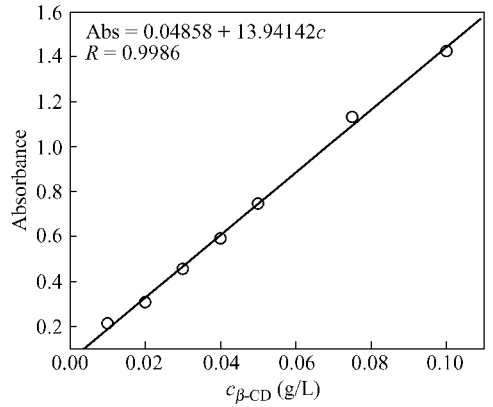


Fig. 2 The standard line of concentration to UV absorption of the hydrolysates of β -CD around 490 nm

产物在 490 nm 处出现强的紫外吸收峰, 而 CTS 的浓硫酸水解产物在此处无紫外吸收峰, 由此可排除浓硫酸的吡喃糖环对 β -CD 固载率测定的干扰. 称取 0.0040 g CTS-CD 溶于 2 mL 水中, 加入 1 mL 质量分数为 80% 的苯酚水溶液, 慢慢滴加 5 mL 浓硫酸, 室温反应 30 min. 测定紫外吸收曲线, 并按下式计算 β -环糊精的固载率:

$$Q = c \times V \times 1000 / (1135 \times m) \quad (1)$$

其中 Q , 壳聚糖分子链上环糊精的固载率, $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$; c , 环糊精的浓度, 测定吸光度后由环糊精标准工作曲线得出, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; V , 样品溶液的体积, mL; m , 测定物质量.

由测得的紫外吸收峰强度, 通过 β -CD 标准工作曲线及公式(1)计算得到, 实验所得产物 β -CD 固载率为 $170.81 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, 远高于文献 5 报道的固载率.

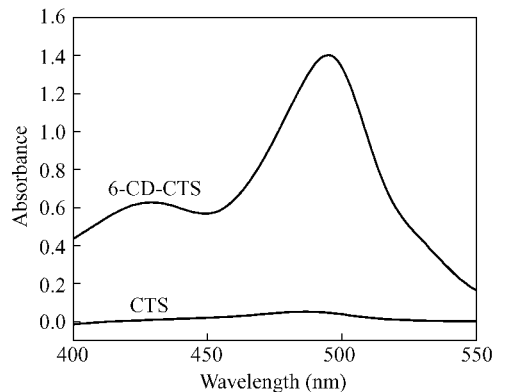


Fig. 3 The UV absorption curves of the hydrolysates of 6-CD-CTS and CTS

2.8 XRD 表征 通过 XRD 谱图(图 4)对产物的结晶性能进行研究. 由于 CTS 较强的分子内和

分子间氢键作用,在 13° 、 20° 附近出现衍射峰.壳聚糖希夫碱化改性后, 13° 附近的衍射峰消失,但 20° 附近的衍射峰明显增强.同时在 7° 附近出现新的衍射峰,这与文献^[19]的报道一致.壳聚糖 6-OH 引入较大的对甲苯磺酰基后, 13° 和 20° 附近的结晶峰强度显著降低,但在 32° 和 45° 左右出现了两个新的峰衍射峰.进一步取代生成 6-CD-BCTS 后, 32° 和 45° 处的衍射峰消失, 13° 和 20° 处的衍射峰进一步发生了弥散.但脱除希夫碱保护后,氨基又容易与环糊精的—OH 以及壳聚糖分子量上残存的—OH 形成氢键作用,结晶峰又有所变锐.

3 结论

将希夫碱化壳聚糖的 C_6 位—OH 对甲苯磺酰酯化后,通过单— NH_2 取代的 β -CD 衍生物对对甲苯磺酰基进行亲核取代反应,再脱希夫碱保护,可将环糊精定位固载到壳聚糖的 C_6 位.紫外光谱法

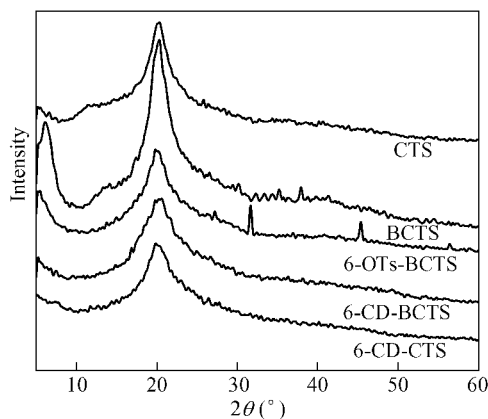


Fig. 4 XRD patterns of each resultant

测定表明, β -CD 在壳聚糖分子链 C_6 位上的固载率达到了 $170.81 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$,远高于文献报道路线所获得的环糊精定位固载率.

REFERENCES

- 1 Prabakaran M. J Biomater Appl 2008 23(1):5 ~ 36
- 2 Song Ru(宋锐),He Lingha(何领好),Xue Ru(薛瑞),Liu Ying(刘莹). Acta Polymerica Sinica(高分子学报) 2008 (4):355 ~ 360
- 3 Hein S,Wang K,Stevens W F,Kjems J. Mat Sci Tech 2008 24(9):1053 ~ 1061
- 4 Kozlowski C A,Sliwa W. Carbohydr Polym 2008 74(1):1 ~ 9
- 5 Li J,Loh X J. Adv Drug Deliver Rev 2008 60(9):1000 ~ 1017
- 6 Liu Ta(刘涛),Fan Xiaodong(范晓东),Tian We(田威),Huang Y(黄怡). Acta Polymerica Sinica(高分子学报) 2008 (3):1020 ~ 1024
- 7 Prabakaran M,Mano J F. Carbohydr Polym 2006 63(2):153 ~ 166
- 8 Hitoshi S,Sei-ichi A. Prog Polym Sci (Oxford) 2004 29(9):887 ~ 908
- 9 Zhang X,Wang Y T,Yi Y. J Appl Polym Sci 2004 94(3):860 ~ 864
- 10 Zha F,Lu R H,Chang Y. J Macromol Sci,Part A:Pure Appl Chem 2007 44(4):413 ~ 415
- 11 Ma Zhiwei(马志伟),Zhang Bang(张邦乐),He Wei(何伟),Wu Zhifer(吴织芬),Sun Jiyun(孙纪元),Wang Qingtao(王勤涛). Chinese Journal of Synthetic Chemistry(合成化学) 2007 15(5):605 ~ 607
- 12 Sreenivasan K. J Appl Polym Sci 1998 69(9):1051 ~ 1055
- 13 Kurita K,Yoshino S,Yokota K,Ando M,Inoue S,Ishii S,Nishimura S. Macromolecular 1992 25(14):3786 ~ 3790
- 14 Kurita K,Yoshino S,Nishimura S,Ishii S. Carbohydr Polym 1993 20(4):239 ~ 245
- 15 Kurita K,Inoue S,Nishimura S. J Polym Sci Part A:Polym Chem 1991 29(6):937 ~ 939
- 16 Morita Y,Sugahara Y,Takahashi A,Ibonai M. Eur Polym J 1994 30(11):1231 ~ 1236
- 17 Shen B J,Tong L H. Synthetic Communications 1991 21(5):635 ~ 641
- 18 Michel D,Gilles K,Fred S. Anal Chem 1956 28(3):350 ~ 356
- 19 Liu Pu(刘蒲),Li Sanhua(李三华),Wang Xiangyu(王向宇),Li Limin(李利民). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006 26(4):666 ~ 669

PREPARATION OF CHITOSAN IMMOBILIZED WITH β -CD AT C₆ POSITION BY A NUCLEOPHILIC DISPLACEMENT REACTION

CHEN Yu¹, YANG Kai², YE Yanchun², WANG Liye², CHU Liqiu¹, TAN Huimin¹

(¹ Department of Materials Science and Engineering, ² Department of Science, Beijing Institute and Technology, Beijing 100081)

Abstract A novel reaction route to prepare the derivate of chitosan with β -CD immobilized at C₆ position is proposed. It is reliable and of high efficiency. The amino group of the chitosan was protected by reacting with the benzaldehyde, and the schiff base structure was generated. The hydroxyl group in the schiff base chitosan was tosylated by reacting with *p*-toluenesulfonyl chloride. Then the mono amino substituted β -cyclodextrin was immobilized onto C₆ position of chitosan by a nucleophilic displacement reaction between the tosylated chitosan and the amino in cyclodextrin derivate. Finally, the schiff base structure was deprotected in the acetic acid solution, and β -CD immobilization derivate of chitosan on C₆-OH (CTS-CD) was prepared. The chemical structure of each resultants was analyzed by FTIR, ¹³C-NMR, elemental analysis and UV, respectively. The UV absorption peak around 490 nm could be observed for the concentrated sulfuric acid hydrolysis products of CTS-CD. However, the corresponding hydrolysis products of CTS did not show any absorption peak near this range. By drawing the calibration curve of the concentrated sulfuric acid hydrolysis products of β -CD through the UV spectrum, the immobilization amount of β -CD on the C₆ position of chitosan could be quantitative detected. The obtained immobilization amount was 170.81 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, which was by head and shoulders high than the corresponding values reported in literature. The crystallization properties of each resultants were studied through XRD characterization.

Keywords Chitosan, β -Cyclodextrin, Tosylated, Nucleophilic displacement reaction, Immobilization