

基于 Diels-Alder 点击反应构建壳聚糖-*O*-聚乙二醇接枝共聚物*

金玉存¹ 卢毅¹ 於麟¹ 曹墨源¹ 熊 晗¹ 王利群^{1,2**} 蒋宏亮^{1,2}

(浙江大学¹高分子系²高分子合成与功能化教育部重点实验室 杭州 310027)

摘 要 通过 Diels-Alder (D-A) 反应,合成了具有规整化学结构的接枝共聚物,壳聚糖-*O*-聚乙二醇 (CS-*O*-PEG). D-A 反应所需双烯体(呋喃环)通过糠基硫醇与端甲基丙烯酸酯聚乙二醇之间的巯基-丙烯酸酯(thioacrylate)反应合成得到;马来酰亚胺基丙酸通过活泼酯法偶联到十二烷基硫酸钠-壳聚糖复合物(SCC)羟基上,从而获得亲双烯体.采用红外光谱(FTIR)和核磁共振(¹H-NMR)表征了中间产物与最终产物的结构,并用原位核磁监测 D-A 反应及其逆反应过程.结果表明,聚乙二醇双烯体可在水介质中温和条件下定量接枝到壳聚糖羟基上,反应具有点击特征;同时,聚乙二醇与壳聚糖之间的连接键在高温下(90 ℃)可通过 D-A 逆反应而发生断裂.

关键词 壳聚糖, Diels-Alder, 聚乙二醇, 原位核磁

壳聚糖(CS)是一种线性聚阳离子多糖,在自然界中分布广泛,其储量仅次于纤维素^[1].由于壳聚糖具有优异的生物相容性、生物可降解性、低毒性等特点^[2,3],在组织工程^[4]、药物控释^[5,6]和基因传递^[7,8]等方面都有着重要的应用.但壳聚糖分子内与分子间存在强烈的氢键作用^[9],不溶于水 and 常见有机溶剂,这极大地限制了其应用范围.

为了克服这一缺点,人们制备了多种壳聚糖衍生物^[10],其中聚乙二醇化壳聚糖是最为行之有效的方法之一.聚乙二醇具有无毒、无免疫排斥、良好的生物相容性和蛋白排斥等特点^[11].Ouchi 等^[12]报道了聚乙二醇化的壳聚糖在水中和有机溶剂中有很好的溶解性.并且,与单纯的壳聚糖相比,聚乙二醇化的壳聚糖衍生物能提高其生物相容性和细胞存活性^[13-15].但是早期的研究发现,在提纯聚乙二醇化壳聚糖的过程中,除去未反应的聚乙二醇是一件费时费力的工作.Kulbokaite 等^[16]将叠氮与炔的“点击”反应用于壳聚糖聚乙二醇化,但叠氮与炔的 1,3-偶极环加成反应需要铜离子作为催化剂,而壳聚糖又特别容易吸附金属离子,这无疑给后期的生物应用带来了不可避免的隐患.

近些年来,Diels-Alder (D-A) 反应以其高效

性、多功能性、选择性等特点^[17,18],在构建和修饰高分子材料方面有着广泛的用途^[19-21].D-A 反应一般被称作“点击”反应,在较低的温度下,反应即可进行,且无需任何催化剂.本文在课题组前期研究基础上^[22,23],探索利用 D-A 反应,合成具有规整化学结构的壳聚糖基接枝共聚物,壳聚糖-*O*-聚乙二醇,研究该接枝反应的可控性与接枝效率.首先,通过十二烷基硫酸钠(SDS)与壳聚糖静电相互作用,形成十二烷基硫酸钠-壳聚糖复合物(SCC),增加壳聚糖在有机溶剂中溶解性,并避免氨基在改性过程中参与反应.进一步将 3-马来酰亚胺丙酸(MI)通过活泼酯法偶联到 SCC 羟基上,用三羟基氨基甲烷(tris)处理除去 SDS 后,即得到壳聚糖基亲双烯体;端呋喃聚乙二醇则通过糠基硫醇与端甲基丙烯酸酯聚乙二醇之间的巯基-丙烯酸酯反应制备得到.通过原位核磁法,研究了端呋喃聚乙二醇与马来酰化壳聚糖之间的 D-A 反应与 D-A 逆反应.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

CS,玉环金壳生物化学有限公司,黏均分子量(M_η)为 2.5×10^4 ,¹H-NMR 测定脱乙酰度(DD)为 91.2%;聚乙二醇甲基丙烯酸酯

* 2012-09-25 收稿,2012-11-02 修稿;国家自然科学基金(基金号 21074112,21174125)资助项目.

** 通讯联系人,E-mail:lqwang@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12307

(PEGMEMA), $M_n = 950$, 纯度大于 99.8%, 美国 Sigma-Aldrich 公司; N, N' -二环己基碳二亚胺 (DCC), 糠基硫醇, 比利时 Acros 公司; N -羟基丁二酰亚胺 (NHS): 百灵威化学技术有限公司; SDS, Tris, 国药集团化学试剂有限公司; N, N -二甲基甲酰胺 (DMF) 与二甲亚砜 (DMSO), 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司, 使用前用分子筛和 CaH_2 处理; β -丙氨酸, 顺丁烯二酸酐, 阿拉丁试剂有限公司.

德国布鲁克光谱仪器有限公司 Bruker Vector 22 傅里叶红外光谱仪; 美国 Bruker 公司 Advance DMX 500 型超导核磁共振仪 (以 TMS 为内标); 美国 Waters 2690 液相色谱仪 (AcOH/AcONa 缓冲液作为洗脱液, 流速 1.0 mL/min).

1.2 SDS-壳聚糖复合物 (SCC) 的制备

取 5.0 g CS 溶于 500 mL 2% (V/V) 的醋酸水溶液中, 16.0 g SDS 溶解于 200 mL 2% (V/V) 的醋酸水溶液中. 完全溶解后, 将 SDS 溶液缓慢加入到 CS 溶液中剧烈搅拌 3 h 后, 离心收集黄色沉淀, 并用去离子水洗涤至少 5 次, 冷冻干燥得 SCC, 产率 85.3%.

1.3 3-马来酰亚胺丙酸 (MI) 的制备

顺丁烯二酸酐 (9.95 g, 102 mmol) 和 β -丙氨酸 (9.18 g, 103 mmol) 溶解到 75 mL 醋酸中, 加热至 170 °C, 反应 90 min. 溶液冷却后旋蒸除去醋酸, 残余液溶于 75 mL 纯水中, 用乙酸乙酯萃取 (100 mL $\times$ 4). 旋蒸除去乙酸乙酯后, 残余固体用二氯甲烷重结晶. 产率为 57%.

1.4 马来酰亚胺取代壳聚糖制备 (CS-MI)

取 3-马来酰亚胺丙酸、NHS、DCC 溶解于 DMF 中, 室温搅拌 24 h 后, 过滤除去生成的 N, N' -二环己基脲 (DCU) 得到红棕色滤液. 将滤液逐滴加入到溶有 SCC 的 DMSO 溶液 (0.05 g/mL) 中, 得棕红色澄清溶液. 40 °C 反应 48 h 后, 将反应液倒入丙酮和乙醚 (2/1, V/V) 的混合溶剂中, 得红棕色沉淀, 离心收集并用乙醚洗涤 3 次后, 真空干燥得 SCC-MI.

取 SCC-MI (2.0 g) 溶解于 20 mL DMSO 中, 待溶解后将溶液逐滴加入到 200 mL 15% Tris 溶液中, 剧烈搅拌 15 min, 离心, 用甲醇沉淀, 收集沉淀, 用甲醇和去离子水洗涤 3 次, 最后冻干得 CS-Mi, 产率 60.1%.

1.5 合成端呋喃环聚乙二醇 (F-PEG)

PEGMEMA (1 equiv) 和糠基硫醇 (1.2 equiv)

溶解于 DMF 中, 加入中性三氧化二铝作为催化剂, 70 °C 加热 2 h. 过滤除去三氧化二铝后, 旋蒸除去溶剂, 残留溶液用冰冻后的乙醚进行沉淀. 收集沉淀, 真空干燥, 得 F-PEG, 产率 87.4%.

1.6 F-PEG 和 CS-MI 的 D-A 反应

CS-MI (100 mg) 溶解于 10 mL 2% (V/V) 醋酸水溶液中, 待完全溶解后加入 F-PEG (200 mg), 40 °C 下反应 48 h. 反应完成后, 将反应液沉淀到 50 mL 乙醚和丙酮的混合溶液中 (1/1, V/V). 离心收集沉淀, 用乙醚洗涤后真空干燥.

1.7 原位核磁跟踪 D-A 反应及其逆反应

CS-MI 和 F-PEG 加入核磁管中, 用 2% (V/V) 的氘代水和氘代醋酸溶解, 将核磁管至于 40 °C 水浴锅中, 每隔 1 h 取样测试. 逆反应的研究与此相似, 将 CS-PEG 溶于氘代水中, 将核磁管置于 90 °C 油浴中加热, 每隔 1 h 检测一次.

1.8 CS-PEG 溶解性的研究

将 CS 或 CS-Mi (10 mg) 溶于 2% (V/V) 醋酸水溶液中, 用 3.0 mol/L 和 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液将其 pH 从 3.0 依次调节到 11.0, 并用紫外分光光度计测量溶液的浊度, 从而判定在水中的溶解性. 紫外分光光度计采用日本岛津公司 UV-1800.

2 结果与讨论

2.1 CS-MI 和 CS-PEG 的表征

CS-MI 和 CS-PEG 的合成路线如图 1 所示. 通过壳聚糖-十二烷基硫酸钠之间静电相互作用形成聚电解质-表面活性剂复合物, 一方面提高了壳聚糖在有机溶剂中溶解性, 从而使得马来酰亚胺丙酸可在均相条件下偶联到壳聚糖主链上, 另一方面, 也避免了壳聚糖胺基参与偶联反应. 图 2 为 CS, CS-MI 与 CS-PEG 的红外谱图. 与 CS 的谱图相比, CS-MI 在 1760 cm^{-1} 出现一个酯键吸收峰, 表明马来酰亚胺成功地通过酯键连接到壳聚糖主链上; 而 1700 cm^{-1} 处吸收峰是五元环酰胺键的特征吸收峰. 在 $^1\text{H-NMR}$ 谱图上 (图 3), 将 CS 与 CS-MI 的图谱对比可以发现, 在 $\delta = 6.3$ 处出现了一个新的峰, 这个峰对应的是马来酰亚胺双键上的氢. 通过计算化学位移为 $\delta = 3.0$ 处 (壳聚糖糖环上 2 号位的氢) 与 $\delta = 6.3$ 处峰面积的比例, 得到 MI 的取代度为 12% 左右.

MI 取代度为 12% 的 CS-Mi 与 F-PEG 反应后, CS-PEG 的红外图谱中, 在 2875, 950 和

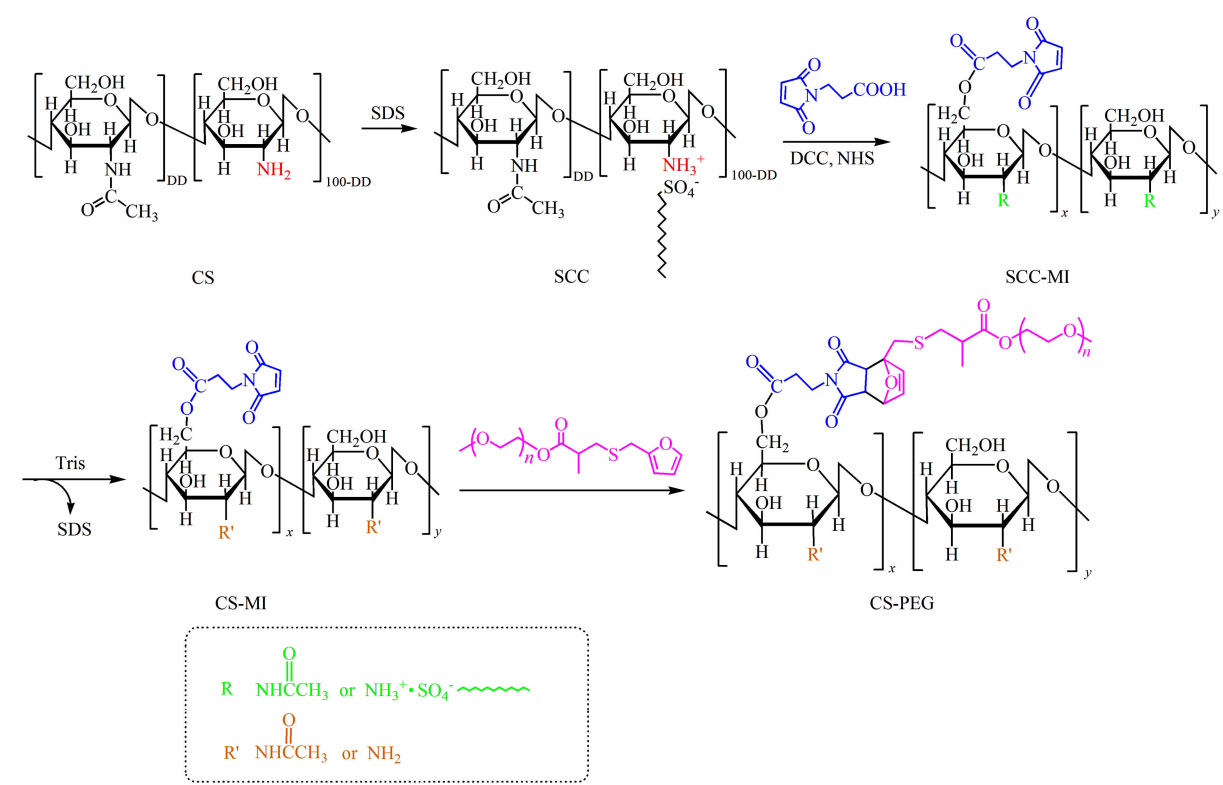


Fig. 1 Synthetic route of CS-PEG

840 cm^{-1} 处分别出现了新的吸收峰,分别对应的是 PEG 上的 C—H, C—O—C 和—CH₂—的特征吸收峰. 表明 PEG 已接枝到壳聚糖主链上.

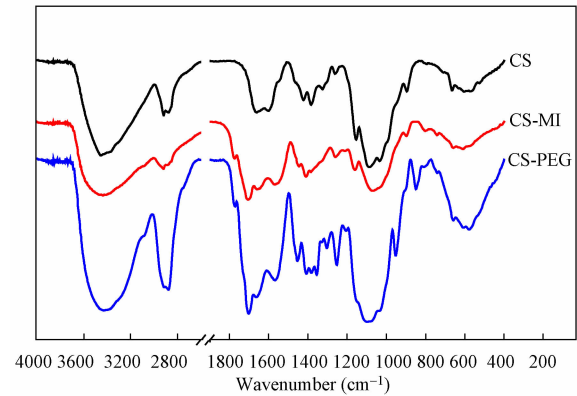


Fig. 2 IR spectra of CS, CS-MI and CS-PEG

从¹H-NMR 图谱(图 3)也可以看出,在进行 D-A 反应后,马来酰亚胺位于 $\delta = 6.3$ 处的特征峰(H8)几乎消失,而 PEG 的特征峰(H18, 19, 22)出现在 CS-PEG 的核磁图谱中. 通过计算化学位移为 $\delta = 3.3$ (PEG 末端甲基)和 $\delta = 3.0$ (糖环上 2 号位氢)处峰面积积分之比,可以得到 PEG 的接枝度.

通过改变 MI/SCC 投料比,可以调节 MI 在 CS 上的取代度,进而调控 PEG 的接枝度. 如表 1 所示,随着 MI 与 SCC 投料比的增加,MI 在 CS 上的接枝度也显著提高,PEG 接枝度也相应增加;同时可看到,尽管核磁谱图上 MI 的特征峰(H8)几乎消失,MI 上的双键基本与 F-PEG 发生了 D-A 反应,但通过上述方法计算所得 PEG 接枝度与 MI 取代度并不完全吻合. 这可能是核磁积分存在误差(壳聚糖 2 号氢峰面积积分不准确,存在其他氢的干扰).

CS 和 CS-PEG 的水相 GPC 检测结果如图 4 所示,壳聚糖的保留时间在 12.5 min 左右,随着壳聚糖上 PEG 接枝度的增加,CS-PEG 的保留时间逐渐减少,样品的峰型变宽,多分散性增加. 这主要是由于随着 PEG 接枝度的增加,壳聚糖侧链 PEG 增多,整个分子链体积增大,使得多分散性增加.

2.2 D-A 反应和 D-A 逆反应的动力学研究

为了更加仔细地研究 D-A 反应和逆反应的过程,采用原位核磁技术跟踪整个反应的进程. 通过追踪 CS-MI 上马来酰亚胺的特征峰(H8)的变化,可以判定反应进行的程度. 采用糠醇和 F-PEG 进行对照,结果如图 5 所示. 从图中可以看出,同

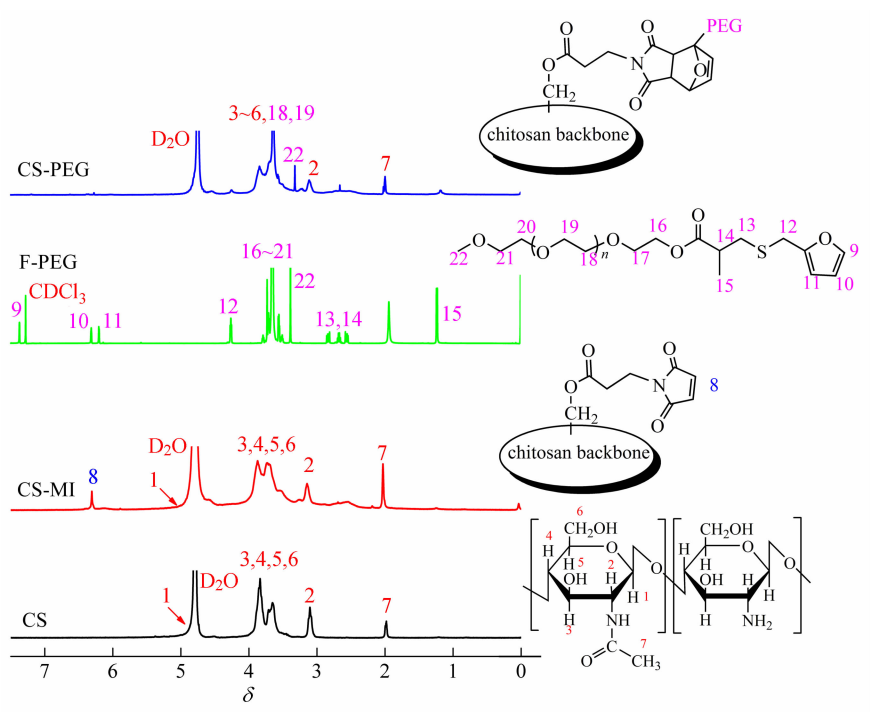


Fig. 3 ^1H -NMR spectra of chitosan, CS-MI, F-PEG and CS-PEG

Table 1 Characteristics of CS-MI and CS-PEG under different conditions

$n_{\text{maleimide}}/n_{\text{SCC}}^{\text{a}}$	4:1	6:1	8:1
DS of maleimide ^b (%)	5.6	8.1	11.4
DS of PEG ^c (%)	4.9	7.2	10.3

^a The feed molar ratio of *N*-(2-carboxyethyl) maleimide to the repeating unit of SCC;

^b The degree of substitution of maleimide was evaluated as follows:

$$\text{DS} = \frac{\text{Proton integration ratio of H8 of maleimide}/2}{\text{Proton integration ratio of H2 of chitosan} + (\text{Proton intergrtion ratio of acetyl group of (chitosan)}/3)}$$

^c The degree of substitution of PEG was evaluated as follows:

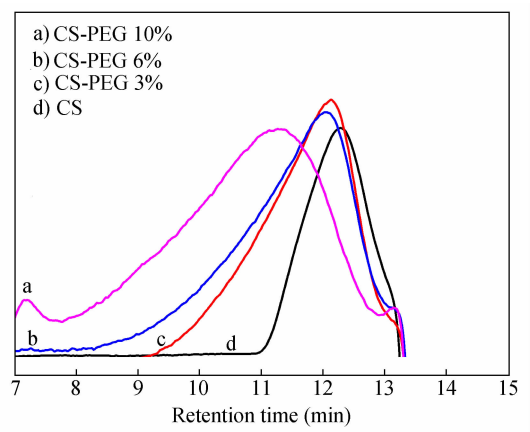
$$\text{DS} = \frac{\text{Proton integration ratio of methyl group of PEG}/3}{\text{Proton integration ratio of H2 of chitosan} + (\text{Proton intergrtion ratio of acetyl group of (chitosan)}/3)}$$


Fig. 4 GPC traces of the modified chitosan samples

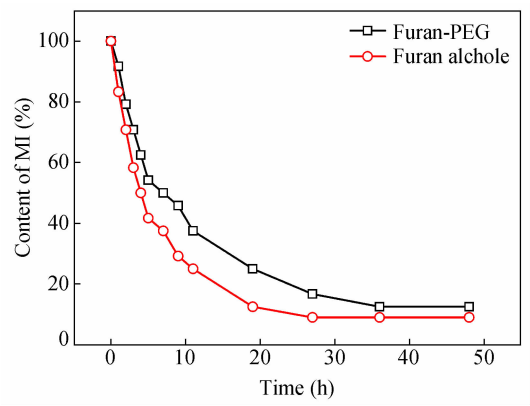


Fig. 5 *In situ* ^1H -NMR spectra for the synthesis of CS-PEG

样在 40 ℃ 条件下,CS-MI 与糠醇的反应速度明显要比 CS-MI 与 F-PEG 的反应速度快. 由于糠醇是小分子,在反应过程中位阻较小,因此,反应速度

较快. 另外从图中可以看出,CS-MI 与 F-PEG 的反应,大约在进行了 36 h 之后,反应基本完成.

众所周知,D-A 反应是一个可逆反应,在较高温度条件,反应会逆向进行,图 6 为利用原位核磁技术研究 D-A 逆反应的过程.如前文所述,在研究 D-A 反应时,采用马来酰亚胺的特征峰(H8)来追踪反应,但在研究其逆反应中,由于在高温条件下,马来酰亚胺的双键可以与壳聚糖上的氨基进行反应,所以只能采用逆反应过程中重新生成的呋喃环上的氢(H9)来追踪反应的进行.图 6 中曲线是 H9 的积分面积与壳聚糖 2 号氢积分面积的比例.从图中可以看出,在高温条件下,随着 D-A 逆反应的发生,H9 的含量迅速增加,在 8~24 h 之间变化不大,呈现出趋于平衡的状态;而 H8 的含量在初期也有较大增长,但 24 h 后含量有所下降,并且核磁管中出现了明显的沉淀,这表明壳聚糖上的氨基与 MI 发生了反应,壳聚糖自身交联后产生了沉淀.

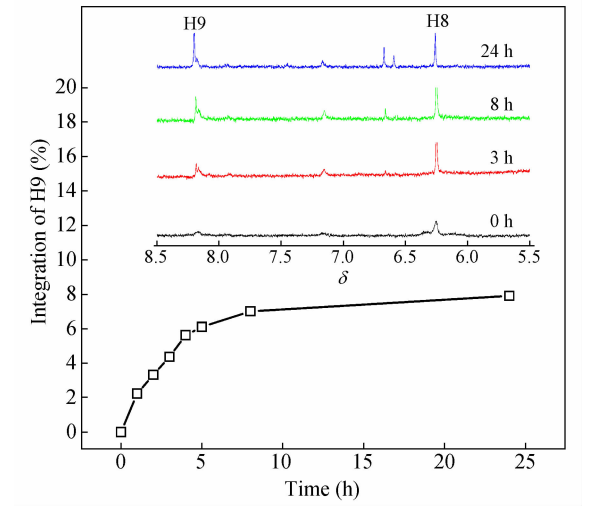


Fig. 6 *In situ* ¹H-NMR spectra for retro-DA reaction at 90 °C

2.3 CS-PEG 在水中溶解性的研究

利用紫外光谱测定溶液的浊度来确定样品在水中的溶解度.溶液的透光率越高,说明在溶液中的溶解性越好;同理,透光率越低,意味着样品在溶液存在着聚集现象,表明溶解性不好.图 7 是溶解性测试的结果,从图中可以看出,CS 在 pH 大于 7 的情况下,其溶解性急剧下降,而接枝 PEG 后的在 pH = 3~11 的条件下均有很好的溶解性.由此可以证明,PEG 能很好的提高壳聚糖在水中的溶解性.

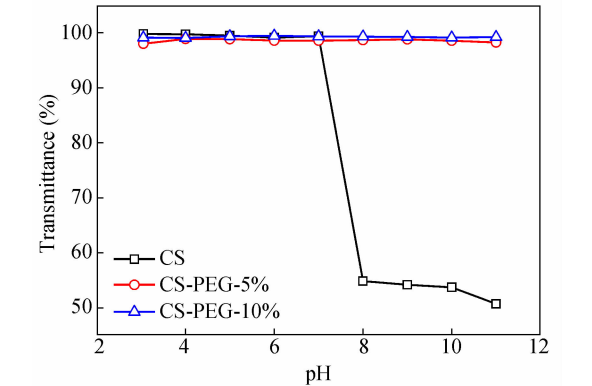


Fig. 7 Solubility of CS-PEG and CS in the aqueous solution as a function of pH changes

3 结论

本文利用 D-A 反应合成得到了壳聚糖-*O*-聚乙二醇接枝共聚物,反应条件温和可控,通过改变 MI 取代度,可以调控 PEG 接枝度.利用原位核磁技术,监测了 D-A 反应和逆反应的过程,证明 D-A 反应的可逆性.壳聚糖接枝 PEG 后,可以很好地提高壳聚糖在水中的溶解性.

REFERENCES

1 Dash M, Chiellini F, Ottenbrite R M, Chiellini E. *Prog Polym Sci*, 2011, 36 (8) :981 ~1014

2 Mourya V K, Inamdar N N. *React Funct Polym*, 2008, 68 (6) :1013 ~1051

3 Rinaudo M. *Prog Polym Sci*, 2006, 31 (7) :603 ~632

4 Sato T, Ishii T, Okahata Y. *Biomaterials*, 2001, 22 (15) :2075 ~2080

5 Mao J S, Liu H F, Yin Y J. *Biomaterials*, 2003, 24 (9) :1621 ~1629

6 Wei Lan (卫兰), Cai Chunhua (蔡春华), Lin Jiaping (林嘉平). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2011, (12) :1461 ~1469

7 Gingras M, Paradis I, Berthod F. *Biomaterials*, 2003, 24 (9) :1653 ~1661

8 Wang Y C, Lin M C, Wang D M. *Biomaterials*, 2003, 24 (6) :1047 ~1057

9 Kang C J, Yu L, Cai G Q. *J Polym Sci Polym Chem*, 2011, 49 (16) :3595 ~3603

10 Shi Xiaowen (施晓文), Li Xiaoxia (李晓霞), Du Yumin (杜予民). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2011, (1) :1 ~11

11 Casetari L, Vilasaliu D, Castagnino E. *Prog Polym Sci*, 2012, 37 (5) :659 ~685

12 Ouchi T, Nishizawa H, Ohya Y. *Polymer*, 1998, 39 (21) :5171 ~5175

- 13 Veronese F M. *Biomaterials*, 2001, 22(5): 405 ~417
- 14 Veronese F M, Pasut G. *Drug Discov Today*, 2005, 10(21): 1451 ~1458
- 15 Harris J M, Chess R B. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(3): 214 ~221
- 16 Kulbokaite R, Ciuta G, Netopilik M. *React Funct Polym*, 2009, 69(10): 771 ~778
- 17 Nicolaou K C, Snyder S A, Montagnon T, Vassilikogiannakis G. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41(10): 1668 ~1698
- 18 Brocksom T J, Nakamura J, Ferreira M L, Brocksom U. *J Braz Chem Soc*, 2001, 12(5): 597 ~622
- 19 Tasdelen M A. *Polym Chem*, 2011, 2(2): 2133 ~2145
- 20 Hu Yuxi(胡玉玺), Qiao Lijun(乔立军), Qin Yusheng(秦玉升), Wang Xianhong(王献红), Zhao Xiaojiang(赵晓江), Wang Fosong(王佛松). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2011, (11): 1336 ~1340
- 21 Franc G, Kakkar A K. *Chem Eur J*, 2009, 15(23): 5630 ~5639
- 22 Cai G Q, Jiang H L, Tu K H. *Macromol Biosci*, 2009, 9(3): 256 ~261
- 23 Yu L, Cao M Y, Zhang H W, Xiong H, Jin Y C, Lu Y, Wang L Q, Jiang H L. *J Polym Sci Polym Chem*, 2012, 50(23): 4936 ~4946

SYNTHESIS OF CHITOSAN-*O*-POLY(ETHYLENE GLYCOL) THROUGH DIELS-ALDER REACTION

Yu-cun Jin¹, Yi Lu¹, Lin Yu¹, Mo-yuan Cao¹, Han Xiong¹,
Li-qun Wang^{1,2}, Hong-liang Jiang^{1,2}

(¹ *Department of Polymer Science and Engineering*, ² *Key Laboratory of macromolecule Synthesis and Functionalization*,
Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The feasibility of employing Diels-Alder reaction for improving the grafting efficiency and controllability of poly(ethylene glycol) (PEG) towards chitosan (CS) was evaluated. Diene-capped PEG (PEG-diene) was conveniently obtained through thio-acrylate reaction between furfuryl mercaptan and poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMEMA). By using sodium dodecyl sulphate-chitosan complex (SCC) as an organo-soluble precursor, the dienophile, (*N*-(2-carboxyethyl) maleimide), was regioselectively conjugated to the hydroxy groups of chitosan backbone through conventional coupling method. Sodium dodecyl sulphate (SDS) was then removed from the conjugate simply by precipitating the reaction solution into tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) solution to give the chitosan intermediate carrying dienophile moieties (CS-dienophile). *In situ* ¹H-NMR was further used for studying the Diels-Alder reactions between CS-dienophile and PEG-diene. It was found that PEG could be grafted onto chitosan backbone in aqueous media under mild conditions. In addition, the PEG grafts could be detached from the graft copolymers at high temperature through retro Diels-Alder reaction.

Keywords Chitosan, Diels-Alder, Poly(ethylene glycol), *In situ* ¹H-NMR spectroscopy