

文章编号:1674-2869(2019)04-0322-05

壳聚糖氨基选择性功能化中的空间位阻效应

熊金辉,柏正武*

武汉工程大学化学与环境工程学院,湖北 武汉 430205

摘要:为探索空间位阻效应对壳聚糖的N-酰基化、脲基化和氨基甲酸酯化这3种反应的影响,用不同空间位阻的修饰剂对壳聚糖上的氨基进行衍生化,以¹H NMR确定其取代度。结果表明:当修饰试剂的空间位阻不大时,产物的取代度接近100%;而当空间位阻较大时,用离子液体或者LiCl/DMAc为溶剂进行第2次修饰能提高产物的取代度。

关键词:壳聚糖;空间位阻;选择性功能化;取代度

中图分类号:O633 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2019.04.004

Influence of Steric Hindrance on Amino-Selective Functionalization of Chitosan

XIONG Jinhui, BAI Zhengwu*

School of Chemistry and Environmental Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: To explore influences of steric hindrance on chitosan acylation, ureidolation and carbamylation, the amino group in chitosan was selectively modified by agents with different steric hindrance, and the degree of substitution (DS) was determined by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. The results demonstrate that the DS can approach 100% with low steric hindrance. When the steric hindrance of the agent is high, the DS can increase by the second modification with an ionic liquid or LiCl/DMAc as the solvent.

Keywords: chitosan; steric hindrance; selective functionalization; degree of substitution

甲壳素是由D-2-乙酰氨基-2-脱氧-葡萄糖经 β -1,4-糖苷键连接而成的线型缩聚物^[1],当侧链上乙酰基的脱除率达到55%时,生成的产物被称为壳聚糖^[2]。因为甲壳素很容易从虾或蟹的躯壳中获得,虾壳和蟹壳是常用海鲜食品的残渣,所以甲壳素和壳聚糖的来源非常丰富,廉价易得。壳聚糖的用途非常广泛,如用来制备生物医用材料^[3-5],用作吸附剂除去污染物或重金属离子等^[6-7]。因壳聚糖有单手螺旋的高级结构,能形成不对称的空腔,所以壳聚糖还能用来制备手性分离材料^[8-10]。

与其它的天然高分子化合物相似,在未被修饰之前,壳聚糖的功能很有限,但经过修饰以后,其功能才得以充分展示。壳聚糖重复单元的3-位

和6-位上是羟基,而2-位上是氨基。因羟基和氨基的反应活性不同,可对壳聚糖的氨基进行选择性的修饰,而无需对羟基进行保护和脱保护。有大量文献报道了对壳聚糖的氨基进行选择性的修饰,制备成不同用途的材料^[11-13]。但要对壳聚糖的氨基进行高取代度修饰,如取代度达到95%或以上,则很难实现。在现实中,往往存在这种情况,即要求壳聚糖修饰时的取代度近乎100%,才能满足材料应用的要求。如在合成多糖衍生物手性分离材料时,为保证多糖衍生物高级结构的规整性,就要求在修饰多糖时,取代度尽可能达到100%。在前期工作中,报道了选择性地修饰壳聚糖2-位上的氨基生成酰胺、脲或者氨基甲酸酯,但并未较

收稿日期:2019-01-22

基金项目:国家自然科学基金(51373127)

作者简介:熊金辉,硕士研究生。E-mail:barryinwit@126.com

*通讯作者:柏正武,博士,教授。E-mail:zwbai@wit.edu.cn

引文格式:熊金辉,柏正武.壳聚糖氨基选择性功能化中的空间位阻效应[J].武汉工程大学学报,2019,41(4):322-326,333.

深入地研究上述3种反应的影响因素,如修饰试剂的结构对反应的影响等。鉴此,本文就修饰试剂的空间位阻对以上反应产物取代度的影响进行了研究,并做了相应的讨论。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

甲壳素(山东潍坊海之源生物制品有限公司);2-甲基环丙基甲酸,二碳酸二叔丁基酯,特戊胺,其它用于合成的试剂(分析纯,国药集团试剂公司)。甲壳素的脱乙酰化反应按文献^[14]方法进行,脱乙酰度>98.3%。

Bruker AVANCE III 600 MHz 核磁共振仪(瑞士布鲁克公司);Varian 400 MHz 核磁共振仪(美国瓦里安公司)。

1.2 壳聚糖的N-酰基化

方法一^[15]:将1.0 g壳聚糖加入到浓度约为0.3 mol/L的水溶性有机酸中,搅拌至澄清透明。向此溶液中加入30 mL甲醇,搅拌均匀,再加入9倍浓度的这种有机酸的酸酐溶于70 mL甲醇的溶液。反应混合液于室温下搅拌7 h。反应结束后,将反应液倒入270 mL 0.5 mol/L氢氧化钾乙醇溶液中,搅拌过夜。过滤,用乙醇洗涤至中性,真空干燥,得酰基化壳聚糖,产率在80%以上。

方法二^[16-17]:先按“方法一”修饰壳聚糖,得到不完全酰基化的壳聚糖。取1.0 g不完全酰基化的壳聚糖溶解于10 g 1-乙基-3-甲基咪唑醋酸盐离子液体中,搅拌至完全溶解。加入2 mL乙醇,搅拌均匀后,滴加6倍浓度的酸酐,在室温下搅拌反应7 h。后处理及纯化的方法与“方法一”中的相同。

方法三^[8]:将1.0 g壳聚糖加入30 mL质量分数为0.8%的盐酸溶液中,搅拌至澄清透明。在冰水浴冷却下,加入100 mL甲醇,搅拌均匀,在15℃下,滴加9倍浓度的酸酐溶于20 mL甲醇的溶液,同时加入三乙胺,使反应液的酸性保持在近中性。在室温下剧烈搅拌7 h。后处理及纯化方法与“方法一”中的相同。

1.3 脲基化壳聚糖的制备^[18]

将3.0 g壳聚糖溶于90 mL质量分数约为1%的盐酸溶液中,在冷却下加入90 mL甲醇,搅拌均匀。将溶液冷至5℃左右,在此温度下,加入9倍浓度的氯甲酸甲酯或者氯甲酸乙酯,滴加三乙胺,调反应混合液的pH值为2~7,控制反应温度在5℃左右,搅拌反应7 h。反应完毕,向反应液中加入100 mL乙醇,剧烈搅拌,过滤,用乙醇洗至中性,干

燥,得甲氧基羰基壳聚糖,产率95%。

在80℃下,将1.0 g甲氧基羰基壳聚糖溶于15 mL质量分数为10%的LiCl在DMAc中的溶液。稍冷后,加入10倍浓度的有机胺,搅拌均匀。将温度升至120℃,并保持12 h。冷却,用乙醇处理反应混合物,过滤,用乙醇彻底洗涤凝胶状的固体3次,干燥,得脲基化的壳聚糖,产率在90%以上。

1.4 烷氧基羰基壳聚糖的合成^[19]

将1.5 g壳聚糖溶于20 mL质量分数为1.2%的盐酸中,再加入20 mL甲醇,搅拌,冰水浴冷却。在4℃下,加入5倍浓度的氯甲酸烷基酯,搅拌反应约15 min。取与氯甲酸烷基酯相同摩尔数的三乙胺溶于10 mL甲醇相混合,将此溶液间歇地滴加到反应混合液中,使反应液的pH值维持在6左右,直至滴加完毕。按氯甲酸烷基酯中烷基的大小,在4~30℃内反应适当的时间。反应完毕,将反应混合物倒入250 mL乙醇中,同时搅拌。过滤,用乙醇洗涤中性,干燥,得部分取代的烷氧基羰基壳聚糖。上述过程称之为壳聚糖的“第一次”烷氧基羰基化反应。

在80℃下,将2.0 g LiCl溶解在20 mL DMAc中,加入上述部分取代的烷氧基羰基壳聚糖,搅拌24 h使之完全溶解。用冰水浴代替加热装置冷却得到的溶液,在5℃下,加入1 mL甲醇,再加入与原来使用的壳聚糖相同摩尔数的氯甲酸烷基酯,分批加入相同摩尔数的三乙胺,在4~30℃下搅拌反应8 h。反应完毕后,将反应液倒入乙醇中,搅拌,过滤,用乙醇洗至中性,干燥,得到烷氧基羰基壳聚糖,产率在90%以上。上述过程称之为壳聚糖的“第二次”烷氧基羰基化反应。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖的酰基化

在对壳聚糖的氨基进行选择性的酰基化时,先将壳聚糖溶解在与酰基化相应的有机酸中,比如进行乙酰化,就将壳聚糖溶解在乙酸中。避免用一种有机酸溶解,而用另一种有机酸的酸酐做酰基化试剂。因为一种有机酸和另一种有机酸的酸酐之间能发生反应生成混合酸酐,这种混合酸酐也能与壳聚糖上的氨基反应,可能生成不需要的酰基化产物。当有机酸在水中的溶解度较小时,可采用“方法二”或者“方法三”来合成酰基化壳聚糖。在“方法二”中,有机酸在水中有一定的溶解度,但较小,所以只能配置浓度较小的壳聚糖溶液。先以“方法一”合成取代度不高的酰基化壳聚

糖,然后用离子液体做溶剂,再进一步使壳聚糖酰基化,从而制得近乎完全取代的酰基化壳聚糖^[16]。对于在水中溶解度太小的有机酸,则采用“方法三”来合成酰基化壳聚糖。先将壳聚糖溶解在稀盐酸中,再向反应液中加入酸酐和三乙胺。三乙胺使壳聚糖的氨基游离出来,然后再与酸酐反应。但在“方法一”和“方法二”中则无需加三乙胺等碱性物质,因为绝大多数有机酸的酸性较弱,有机酸与氨基生成的弱酸弱碱盐能较大程度上理解成游离的氨基。以“方法三”也能合成出近乎完全取代的酰基化壳聚糖^[8]。

在研究中发现,含不同大小空间位阻的酸酐与壳聚糖上氨基反应时的活性存在差异,进而对壳聚糖酰基化反应的取代度有较大影响。如以环丙基甲酸酐与壳聚糖反应,仅用“方法一”进行一次酰基化反应能得到近100%取代的环丙基羰基壳聚糖[图1(a)];而使用空间位阻稍大的2,2'-二

甲基环丙基甲酸酐与壳聚糖反应在相同的条件下,一次酰基化壳聚糖的取代度只有79%[图1(b)],当用“方法一”和“方法二”进行2次酰基化反应后,取代度才能达到100%[图1(c)]。同样地,采用“方法一”以特戊酸酐修饰壳聚糖氨基,一次酰基化反应产物的取代度只有47%[图2(a)],即使用“方法二”以特戊酸酐修饰2次,取代度也只有78.6%[图2(b)]。而用比特戊酸酐少1个甲基的异丁酸酐以“方法一”修饰壳聚糖,只需1次修饰,取代度就能达到近99%[图2(c)]。由此可见,空间位阻效应会明显影响一些酰基化反应的取代度。比较用环丙基甲酸酐、异丁酸酐和特戊酸酐修饰壳聚糖氨基产物的取代度可知,当酸酐中的羰基 α -碳原子为仲碳时,用“方法一”或者“方法一”与“方法二”连用,所制备的酰基化壳聚糖的取代度接近100%,当 α -碳原子为叔碳时,取代度相对较低。

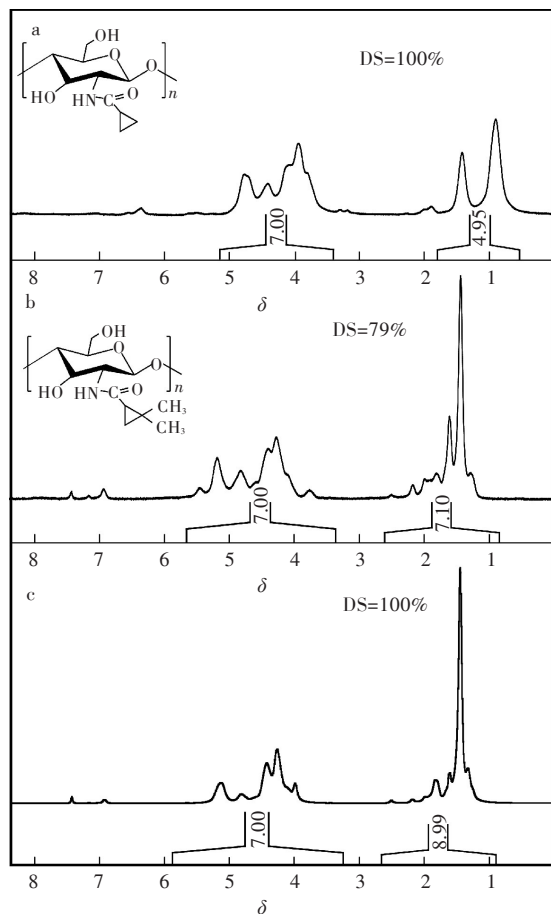


图1 ^1H NMR谱图(600 MHz, $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{D}$):(a)“方法一”制备的环丙基酰化壳聚糖,(b)“方法一”与(c)用“方法二”制备的2,2'-二甲基环丙基甲酰化壳聚糖

Fig. 1 ^1H NMR spectra of (600 MHz, $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{D}$): cyclopropylcarbonyl chitosan prepared by (a) method 1 and 2,2'-dimethylcyclopropylcarbonyl chitosans prepared by (b) method 1 and (c) method 2

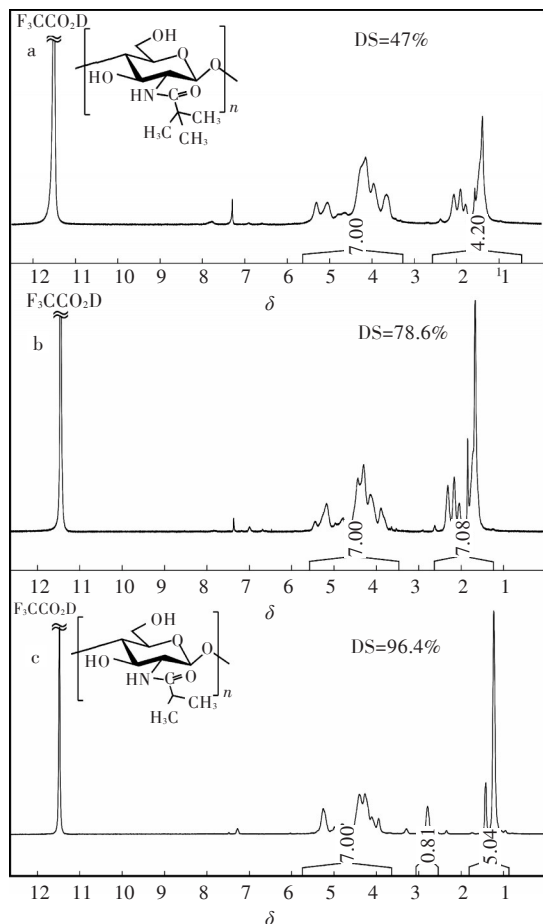


图2 ^1H NMR谱图(400 MHz, $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{D}$):(a)“方法一”与(b)“方法二”制备的特戊酰化壳聚糖,(c)用“方法一”制备的异丁酰化壳聚糖

Fig. 2 ^1H NMR spectra of (400 MHz, $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{D}$): tert-pentylcarbonyl chitosans prepared by (a) method 1 and (b) method 2 and (c) isobutylcarbonyl chitosan prepared by method 1

2.2 壳聚糖的脲基化

在本文中,壳聚糖的脲基化由2个反应组成,即壳聚糖的氨基甲酸酯化和随后的胺-酯交换反应。因氨基甲酯中的甲氧基或乙氧基容易离去,所以壳聚糖氨基甲酸甲酯或氨基甲酸乙酯对合成壳聚糖脲来说是理想的中间体。但壳聚糖氨基甲酸甲酯或乙酯对水、酸、碱和热都不太稳定,不宜长期保存,最好在较短的期间内使用。胺-酯交换反应需要在较高的温度下才能发生,经过实验摸索发现,当温度达到110~120 ℃时,反应迅速发生,并伴随着产物的凝胶化。

胺的空间位阻对胺-酯交换反应有明显影响,用异丁基胺发生胺-酯交换反应时,异丁基的取代度近乎100% [图3(a)],但用多一个甲基的新戊胺发生胺-酯交换反应时,新戊基的取代度只有87% [图3(b)]。比较异丁基胺和新戊胺的结构可知,两者氨基的 α -碳原子都是亚甲基,在 β -碳原子上,新戊胺比异丁基胺多连接1个甲基。虽然甲基并不是一个空间位阻很大的基团,但使新戊基的取代度比异丁基的取代度低11%,足可见胺的空间位阻对胺-酯交换反应的转化率有非常显著的影响。

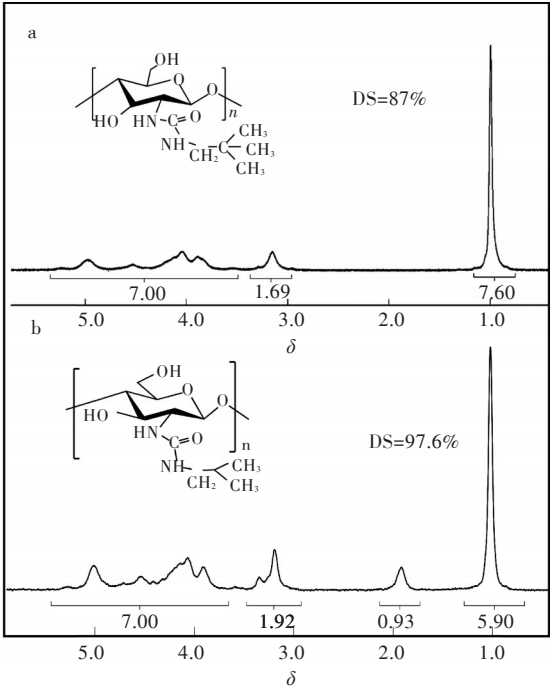


图3 ¹H NMR谱图(600 MHz, F₃CCO₂D):
(a)壳聚糖异丁基脲,(b)壳聚糖新戊基脲
Fig. 3 ¹H NMR spectra (600 MHz, F₃CCO₂D):
(a) chitosan isobutylurea, (b) chitosan neopentylurea

2.3 壳聚糖 N-甲酸烷基酯化

过量的氯甲酸甲酯和氯甲酸乙酯这两种烷基较小的酯能使壳聚糖完全氨基甲酸酯化,但对于

烷基稍大一些的氯甲酸酯来说,只发生一次反应,不能使壳聚糖完全氨基甲酸酯化,即取代度不能达到接近100%。如氯甲酸异丙基酯与壳聚糖反应,经过一次反应,异丙基的取代度仅为85% [图4(a)],以LiCl/DMAc为溶剂进行第二次N-甲酸酯化后,异丙基的取代度才能达到98% [图4(b)],说明氯甲酸烷基酯的空间位阻对壳聚糖的氨基甲酸酯化也有显著的影响。由于不同的氯甲酸酯空间位阻大小不同,其对壳聚糖进行氨基甲酸酯化时的反应活性亦有差异,因此,在实施该反应时有一个适应的反应温度。如果温度过低则反应速率过慢;反之,如果温度过高则氯甲酸酯的水解也会加剧。这些情况都不利于壳聚糖的完全氨基甲酸酯化。采用氯甲酸十二烷基酯与壳聚糖反应,发现在室温下该反应几乎不能发生,而当温度高达40 ℃时,十二烷基的取代度也只有59%(图5)。其原因可能是由于氯甲酸十二烷基酯的烷基链太长,空间位阻大,当一部分氯甲酸十二烷基酯与壳聚糖的氨基反应后,给生成的壳聚糖十二烷基氨基甲酸酯带来太大的空间位阻,导致氯甲酸十二烷基酯无法再与其剩余的氨基反应。当反应温度过高时,大部分的氯甲酸十二烷基酯与水发生了反应,只有少部分与壳聚糖氨基反应。

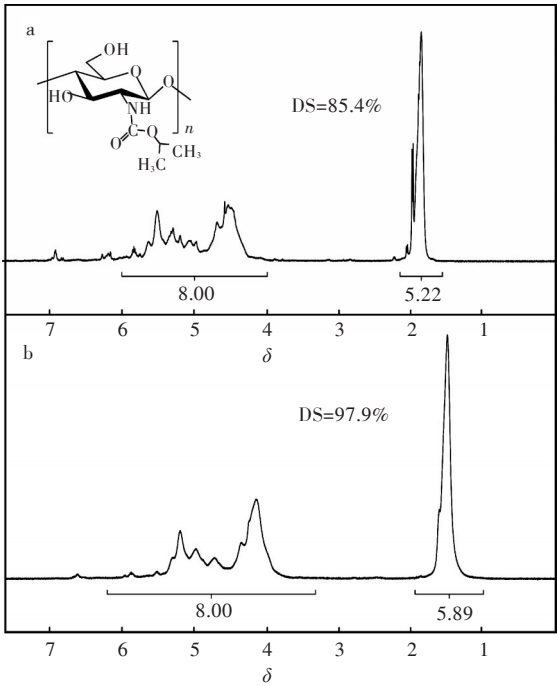


图4 ¹H NMR谱图(400 MHz, F₃CCO₂D): (a)一次修饰, (b)两次修饰制备的壳聚糖异丙基氨基甲酸酯
Fig. 4 ¹H NMR spectra (400 MHz, F₃CCO₂D) of isopropoxyxycarbonyl chitosans prepared by (a) the first time and (b) the second time modifications

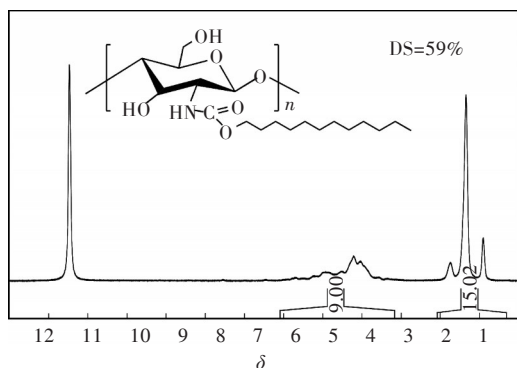


图5 十二烷基羧基壳聚糖¹H NMR谱图
(400 MHz, F₃CCO₂D)

Fig. 5 ¹H NMR spectrum of dodecyloxycarbonyl chitosan
(400 MHz, F₃CCO₂D)

3 结 语

在上述的反应中,所选用修饰试剂的取代基不同,修饰试剂空间位阻的大小会有差别,从而对壳聚糖衍生物取代度造成不同的影响。在合成N-酰基化壳聚糖、脲基化壳聚糖和壳聚糖氨基甲酸烷基酯时,修饰试剂的空间位阻都不能太大,否则要进行二次修饰,甚至在进行二次修饰后,也不能制备出完全取代的壳聚糖衍生物。空间位阻对壳聚糖的N-酰基化、脲基化和氨基甲酸酯化这3个反应的影响程度各不相同,从实验结果来看,修饰试剂的空间位阻对后2个反应的影响更大。

参考文献

- [1] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京:化学工业出版社, 2003: 2-5.
- [2] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京:化学工业出版社, 2001: 9-12.
- [3] AHMED S, IKRAM S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing[J]. *Achievements in the Life Sciences*, 2016, 10(1):27-37.
- [4] LARSSON M, HUANG W C, HSIAO M H, et al. Biomedical applications and colloidal properties of amphiphilically modified chitosan hybrids[J]. *Progress in Polymer Science*, 2013, 38(9):1307-1328.
- [5] LI K J, GUAN G L, ZHU J X, et al. Antibacterial activity and mechanism of a laccase-catalyzed chitosan-gallic acid derivative against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2019, 96:234-243.
- [6] ABDELAAL M Y, SOBAHI T R, AL-SHAREEF H F. Modification of chitosan derivatives of environmental and biological interest: a green chemistry approach[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*,

- 2013, 55(2):231-239.
- [7] SUYANTO, KOESOEMO H D, RURIYANTI R, et al. Application chitosan derivatives as inhibitor corrosion on steel with fluidization method [J]. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7(2): 260-267.
- [8] YANG F, CAI M L, CHEN W, et al. Performances comparison of enantiomeric separation materials prepared from shrimp and crab shells[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 204:238-246.
- [9] TANG S, MEI X M, CHEN W, et al. A high-performance chiral selector derived from chitosan (p-methylbenzylurea) for efficient enantiomer separation [J]. *Talanta*, 2018, 185:42-52.
- [10] RIBEIRO J, TIRITAN M E, PINTO M M, et al. Chiral stationary phases for liquid chromatography based on chitin-and chitosan-derived marine polysaccharides[J]. *Symmetry*, 2017, 9(9): 190.
- [11] MIRZAEI A, HASANZADEH M, JOUJBAN A. Cross-linked chitosan/thiolated graphene quantum dots as a biocompatible polysaccharide towards aptamer immobilization [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123:1091-1105.
- [12] KENAWY E, SAMEH S, AL-ETEWEY, et al. Synthesis, characterization and biomedical application of a novel Schiff base on methyl acrylate-functionalized chitosan bearing p-nitrobenzaldehyde groups [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 122: 833-843.
- [13] SHAHID-UL-ISLAM, BUTOLA B S. Recent advances in chitosan polysaccharide and its derivatives in antimicrobial modification of textile materials [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121:905-912.
- [14] ZHANG J, WANG X C, CHEN W, et al. Synthesis of substituted phenylcarbamates of N-cyclobutylformylated chitosan and their application as chiral selectors in enantioseparation [J]. *Analyst*, 2016, 141 (14): 4470-4480.
- [15] TANG S, BIN Q, CHEN W, et al. Chiral stationary phases based on chitosan bis (methylphenylcarbamate) - (isobutrylamide) for high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1440(1):112-122.
- [16] TANG S, LIU J D, CHEN W, et al. Performance comparison of chiral separation materials derived from, N-cyclohexylcarbonyl and, N-hexanoyl chitosans [J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1532: 112-123.