



壳聚糖硫酸酯制备方法

The methods of preparation of chitosan sulfate

蒋玉湘¹, 李鹏程²

(1. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)06-0075-03

壳聚糖是甲壳素脱乙酰基的产物, 本身可生物降解, 具有良好的生物相容性。经过硫酸化引入 SO_4^{2-} 基团, 给予化合物重要生理功能, 使其具有增强机体免疫力, 抑制肿瘤, 抑制病毒, 降糖降脂, 抗凝血, 防治血栓, 治疗溃疡和肾衰等方面的作用, 国内外对其开发十分活跃^[1], 作者就壳聚糖硫酸酯的理化性质和几种制备方法进行介绍。

1 壳聚糖硫酸酯的理化性质

甲壳素是由 β -1, 4 糖苷键连接的 2-乙酰氨基-D 葡聚糖, 可通过对甲壳素进一步脱乙酰基制备壳聚糖, 只有脱乙酰度大于 75% 才可以称为壳聚糖, 脱乙酰基一般是在强碱、高温、搅拌的剧烈条件下进行的, 在这种情况下, 不可避免的伴随着甲壳素的降解, 也就是说壳聚糖是 β -1, 4 糖苷键连接的 2-氨基-D 葡萄糖和 β -1, 4 糖苷键连接的 2-乙酰氨基-D 葡萄糖组成的共聚物, 只是后者的量相对少一些, 而且每一个共聚体分子量大小不同^[2]。这样每一个壳聚糖单体中有 3 个官能团—— C_3 位醇基、 C_6 位醇基、 C_2 位氨基或乙酰氨基。3 种官能团都可以进行化学修饰, 但活性不同。壳聚糖本身是无定形晶体, 有三种晶型, 结构致密。壳聚糖的硫酸化方法不是很多, 大都伴随着壳聚糖自身的降解。壳聚糖本身性质(分子量、脱乙酰度等)不同, 采用的硫酸化方法不同, 制备出的壳聚糖硫酸酯的硫酸酯基含量不同, 引入位点不同, 这样一来壳聚糖硫酸酯的结构就更复杂多变了。不经化学修饰和基团保护直接用壳聚糖制备的壳聚糖硫酸酯就是由单取代硫酸酯、二取代硫酸酯、三取代硫酸酯、氨基葡萄糖、酰氨基葡萄糖等单体组成的共聚物。对壳聚糖单元上的某些位点官能团进行其它的化学修饰加以保护, 即对各种取代位置的壳聚糖硫

酸酯来进行定位制备。这样制备的壳聚糖硫酸酯的单体结构是可以确定的, 总体结构简单一些。经过磺化, 引入 SO_3^- 基团, 伴随着大分子降解而降低分子量, 使母体分子增加水溶性, 降低脂溶性, 保持高度溶剂化区域, 水溶性的壳聚糖硫酸酯明显呈两性电解质的特性。总之, 壳聚糖硫酸酯结构的多样性也为我们提供了多种生理功能, 对壳聚糖硫酸酯的活性和构效关系科技工作者也做了较多研究。

2 壳聚糖硫酸酯的制备

壳聚糖硫酸酯特殊的生理功能引起了各国学者的关注, 壳聚糖硫酸酯的制备方法已经有了很大改进。磺化试剂体系可分为 3 类: 第一类由溶剂和磺化剂组成磺化试剂对壳聚糖进行磺化。磺化试剂需要配制, 由溶剂和磺化剂组成。目前研究者大都采用这一类方法。第二类是在磺化剂中直接对壳聚糖进行磺化, 此磺化体系较少采用。第三类是在水溶液中, 采用溶剂和磺化剂配合物对壳聚糖进行磺化修饰。此方法的特点是磺化修饰的位置有较强的选择性。另一方面, 根据壳聚糖磺化前的状态不同, 又可分为两类: 第一类是针对所要制备壳聚糖硫酸酯的特殊要求, 对壳聚糖进行前处理, 比如活化、降解或者是对糖单元上某一个或两个官能团进行化学修饰或加以保护后, 再

收稿日期: 2002-12-16 修回日期: 2003-03-19

作者简介: 蒋玉湘(1974-), 女, 新疆石河子人, 硕士, 主要从事有机合成方面的科研工作, E-mail: dehuijiang@126.com; 李鹏程, 通讯联系人, 电话: 0532-2898705, 2898707



实施磺化(定位硫酸酯化)。不同的预处理方法和磺化方法相结合,就可制得到符合要求的壳聚糖硫酸酯。第二类是直接对壳聚糖进行磺化,壳聚糖没有经过预处理。

2.1 磺化体系的选择

有机溶剂在有机反应中的作用是不可忽视的。溶剂不同,反应效果相差悬殊。在壳聚糖磺化体系的溶剂选择上,溶剂的作用优劣集中表现在对壳聚糖硫酸酯的溶解能力和络合磺化剂的能力。就最近的研究文献,壳聚糖的磺化体系所用的溶剂基本上是吡啶、甲酰胺、二甲基甲酰胺。这3种溶剂各有优缺点,吡啶的毒性很大且有恶臭味,但很多学者仍在使用,甲酰胺对磺化剂的溶解能力比较强,但不易干燥。二甲基甲酰胺对磺化剂的溶解能力不是很强,它的优点是容易干燥,性质温和,毒性较小,所以被较多的研究者采用。磺化剂的选择主要是依据反应过程控制的难易程度和反应装置的情况。磺化剂的种类很多,三氧化硫、浓硫酸和发烟硫酸、氯磺酸、二氧化硫和氧气、二氧化硫和氯气、三氧化硫和二氧化硫的共变体(-10℃)、硫酰氯、亚硫酸盐。从理论上讲,三氧化硫是最有效的磺化剂。反应中直接引入-SO₃H,反应容易进行,可进行等摩尔反应,所得的磺酸盐产物中含盐量最少。用氯磺酸磺化可以在室温下进行,操作方便,适用与间歇工艺生产,氯磺酸可单独使用,也可在溶剂中使用。浓硫酸和发烟硫酸的应用范围很广,反应速度随酸浓度的下降呈数量级的下降,要保持高转化率则需要使用过量的磺化剂,后续处理很烦琐^[3]。实验室中壳聚糖磺化采用的磺化剂主要有氯磺酸、浓硫酸或发烟硫酸,以氯磺酸居多。磺化试剂的配制是壳聚糖磺化中的关键步骤。在前人的研究中,除了溶剂,磺化剂及其比例不同外,采用的实验装置,操作步骤和注意事项都大致相同。一般是向装有搅拌装置的密闭三口烧瓶中加入一定量的有机溶剂(预先冷却),置于冰盐浴中。在搅拌状态下,滴加一定体积磺化剂,控制滴加的速度,使反应体系的温度保持在5℃以下。滴加完毕后在室温下继续搅拌一定时间,再将三口烧瓶转移到恒温水浴中,加入壳聚糖的待磺化品,在一定的温度下搅拌反应一定的时间,形成粘稠的溶液,过滤,除去未反应的壳聚糖,将滤液倾入数倍乙醇中,形成的壳聚糖硫酸酯粗品沉淀经真空过滤分离,75%乙醇洗涤,蒸馏水溶解,饱和碳酸氢钠溶液中和,转入透析

袋中,用去离子水充分透析,透析后的溶液用乙醇沉淀或冷冻干燥就可获得壳聚糖硫酸酯钠的纯品。当然,也可用离子交换柱,超滤,凝胶柱进行脱盐。若是不用碳酸氢钠溶液中和,制备出的产品是壳聚糖硫酸氢酯^[4-5]。

2.1.1 磺化溶剂磺化壳聚糖

方波等^[6]采用二甲基甲酰胺与三氧化硫络合物的二甲基甲酰胺溶液直接磺化不经任何预处理壳聚糖。由于壳聚糖本身的结构致密,只有表面的分子参与反应,这样势必要提高磺化反应的强度,延长反应时间,造成产率下降,产物分子量严重不均,含硫量不高。别的类似方法也存在同样的问题。

2.1.2 磺化剂磺化壳聚糖

许加超等^[4]直接用浓硫酸对壳聚糖进行磺化,磺化过程操作基本一致,就是条件太过苛刻。反应温度保持在-5℃以下,乙醇沉淀温度-30℃以下,加之产率很低,硫酸根含量不高,所以这种方法现实意义不大。

上述两类磺化体系均为强酸性,在此环境中,C₂位氨基已质子化,不易发生硫酸化反应,得到的产物是以C₆-O-壳聚糖硫酸酯为主的壳聚糖硫酸酯共聚物。

2.1.3 采用溶剂和磺化剂的配合物对壳聚糖进行磺化修饰

Holme^[13]等采用三甲胺和三氧化硫的配合物作为磺化剂,在pH=9~10 Na₂CO₃水溶液中,对壳聚糖实施磺化修饰,经过脱盐、干燥处理得到的是以C₂-N-壳聚糖硫酸盐为主的壳聚糖硫酸化衍生物。

以上3种磺化体系均是对没有经过预处理的壳聚糖分子实行改性。由于壳聚糖晶体内部具有强烈的氢键作用,结构致密,表面分子的也不够活泼,基本上阻碍了磺化试剂的渗透和反应,所以上述3种磺化反应情况都不尽人意,因此,壳聚糖进行预处理是获得高质量壳聚糖硫酸酯的必经步骤。

2.2 磺化溶剂磺化预处理后的壳聚糖

目前,预处理的方法主要有活化处理、降解处理、基团保护处理等。

2.2.1 活化处理

活化处理目的是打破壳聚糖分子间强烈的氢键,使壳聚糖以疏松的状态存在,加快反应的进程。马恩忠和张千弘^[7]将壳聚糖溶于一定量1%醋酸溶液中,



过滤除去不溶性的杂质和凝胶,滤液加入 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液中和,同时搅拌,直至形成粉末状的壳聚糖沉淀。高速离心出壳聚糖沉淀,用蒸馏水洗至中性,乙醇洗涤数次,真空抽滤,再将得到的壳聚糖沉淀浸泡于二甲基甲酰胺中 12 h 以上^[7],得到具有较高活性和巨大面积的壳聚糖。但磺化制得的是壳聚糖硫酸酯产率较低,且活性和构效关系也不太明确。

2.2.2 降解处理

壳聚糖的降解方法很多,其中以污染少,操作简单,产品质量好的双氧水降解使用为最多。赵霞首先将壳聚糖溶解在乙酸溶液中,加入一定量的双氧水,控制温度,搅拌一定时间,过滤,滤液用数倍 95% 乙醇沉淀,洗涤后的壳聚糖沉淀在 40 °C 下真空干燥,可获得一定分子量的壳聚糖^[8]。由于分子键的断裂,晶体结构被破坏,糖单元上的官能团更多地暴露出来,反应活性得以提高。制备过程中需注意分子量变小带来的影响。

2.2.3 定位硫酸酯化

壳聚糖单体上具有 3 个官能团,可以选择性进行化学修饰或加以保护,磺化后去保护。定位硫酸酯化可得到很多种壳聚糖硫酸酯。例如选择性制备 C_{3,6}-O-壳聚糖硫酸酯(36S)需对 C₂-N-位氨基进行保护,Baumann 等^[12]将 5.0 g 壳聚糖和 13.8 g 邻苯二甲酸酐溶于 100 mL 二甲基甲酰胺中,在 130 °C 下用氮气保护反应 5~7 h,混合物变成粘性透明溶液后,倾入冰水后过滤,在索氏提取器中用乙醇提取后,用五氧化二磷干燥,得到 2-苯二甲酰亚胺基壳聚糖,为了去除保护基团,将其磺化产物溶解于水中,加入适量水合肼在 70 °C 反应 16 h,然后加入 50 mL 的水浓缩至近干,反复操作两次以消除剩余水合肼,透析和冷冻干燥即得 36S,取代度小于 2^[9,14]。定位硫酸酯化步骤多,操作复杂,制备周期长都是制约其大规模生产的不利因素。是否可以通过改变磺化试剂和反应条件达到定位制备的目的,尚待进一步研究。

2.3 壳聚糖直接磺化

用磺化剂或磺化溶剂直接磺化不经任何预处理壳聚糖,由于壳聚糖本身的结构特点,反应结果不是很理想。这个问题前面已有探讨,在此不再详述。

总之,根据壳聚糖自身结构的特点,采用不同磺化方法可制备出符合要求的壳聚糖硫酸酯,应本着高效、经济的原则设计适用的工艺路线。

参考文献:

- [1] 严共鸿,李鹏程.甲壳质/壳聚糖硫酸酯的研究进展[J].海洋科学,1994(4):24-26.
- [2] 蒋挺大.壳聚糖[M].北京:化学工业出版社,1999.113-116.
- [3] 周晴中.磺化反应和技术[J].精细化工,1995,12(3):59-63.
- [4] 徐加超,肖英龙.水溶性甲壳素的制备[J].海洋湖沼通报,1994(1):90-93.
- [5] 吴勇,黎碧娜.磺化壳聚糖的研制[J].广州化工,2000,28(4):99-100.
- [6] 方波,江体乾.新型类肝素物质的研究——水溶性磺化羟丙基壳聚糖的研究[J].华东理工大学学报,1998,24(3):286-290.
- [7] 马恩忠,张千弘.壳聚糖硫酸氢酯的合成[J].天津师大学报(自然科学版),2000,20(2):54-56.
- [8] 赵霞,吕志华.一种低分子壳聚糖硫酸酯铝的制备[J].中国海洋药物,2001,81(3):28-32.
- [9] 赵霞,于广利.壳聚糖定位硫酸酯化的制备工艺[J].中国海洋药物,2002,82(3):15-20.
- [10] 赵霞,吕志华.N-羧烷基-6-O-壳聚糖硫酸酯的制备[J].中国海洋药物,2001,81(4):4-8.
- [11] Nishimura S I, Kai H. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates[J]. *Carbohydrate Research*, 1998 306: 427-433.
- [12] Baumann H, Faust V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl, and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives[J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 331: 43-57.
- [13] Holme K R, Perlin A. Chitosan N-sulfate, A water-soluble polyelectrolyte [J]. *Carbohydrate Research*, 1997, 302: 7-12.
- [14] Huang Rong hua, Du yumin, Yang Jianhong. Preparation and anticoagulant activity of carboxybutyrylated hydroxyethyl chitosan sulfates[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 51: 431-438.

(本文编辑:张培新)