

키틴유도체의 Amphilic Supramolecule 응집구조에 관한 연구

한 애 란[†] · J. -H. Fuhrhop*

국립공업기술원 공업용수시험과, *Berlin 자유대학 유기화학 연구소
(1994년 4월 6일 접수)

Amphiphile Überstrukturen aus Chitin-Derivaten

A. Hahn[†] und J. -H. Fuhrhop*

National Industrial Technology Institute, 2 Jungangdong, 427-010 Kwacheon, Korea

*Institut für Organische Chemie der Freien Universität-Berlin,

Takustr. 3, D-14195 Berlin, Germany

(Received April 6, 1994)

요 약 : 1N NaOH와 1N HCl로 대하의 천연 키틴을 정제하여 순수한 키틴을 제조하였다. 47%의 NaOH용액으로 키틴을 탈아세틸화 시켜 순수한 키토산을 얻었다. 여기에 화합물 5를 반응시켜 소수성의 긴사슬을 가지는 유도체를 얻었으며 그것의 응집구조를 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과는 여러개의 판상층이 평행으로 모여진 결정구조였으며 그 구조의 모델을 제시하였다.

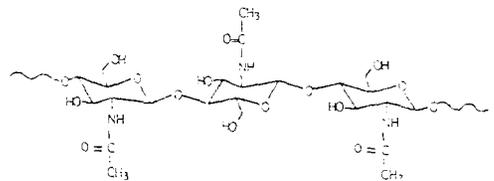
Abstract : Pure Chitin was obtained from lobster shell by simple treatments with 1N NaOH and 1N HCl solutions. It was converted into Chitosan by deacetylation with an aqueous 47% NaOH. By selective stearylation with an amphiphile 5 a Chitosan having hydrophobic side chains was prepared and its supramolecular structure investigated by scanning electron microscopic means. It was found that this Chitin derivative aggregates into a lamellar crystal structure.

Keywords : amphiphilic, supramolecule, chitin.

EINLEITUNG

Chitin 1, das als Rohmaterial mehr als 25% Proteine und Lipide enthält,^{1,2} ist eine Strukturkomponente der Panzer von Krustentieren und der Zellwände von Fungi.³ Die zurückbleibenden Protein- und Lipidreste in Chitin lassen sich durch ein drastisches Reinigungsverfahren bis auf eine Menge von 0,5 Prozent reduzieren.^{3,4} Die Primärstruktur von Chitin besteht aus geraden Ketten von β -1,4-Glycosid verknüpften N-Acetyl-D-Glucosaminresten.^{5,6}

Chitinketten bilden amorphe Feststoffe, die in Wasser, verdünnter Säure und Base fast unlös-



1

lich, aber in Ameisensäure, Methansulfonsäure und N,N-Dimethylacetamid mit 5% Lithiumchlorid löslich sind. Durch die alkalische Deacetylierung der 2-Stellung von Chitin entsteht Chitosan, das aufgrund seiner hohen Ladungsdichte in wässrigen Medien zahlreiche Verwendungs-

möglichkeiten besitzt. Beispielsweise lassen sich Chitin und Chitosan durch geeignete chemische Prozesse in regenerierte Chitin- und Chitosanmembranen umwandeln, die in der Medizin für Arzneimittel und als Tiernahrung, der Wasseraufbereitung, und als Fasern und Filme dienen können.⁷ Ziel dieser Arbeit war es nun, durch die Lipophilisierung des Naturstoffs "Chitin" polymere Membranstrukturen in Analogie zu früher bearbeiteten Lipidmembranen aus monomeren Glyconamid zu erzeugen.⁸ Das war von Interesse, weil (I) Chitin ein wohlfeiles Kohlenhydratamid darstellt, (II) der Ersatz der offenkettigen Glucosamingruppen durch cyclische Kohlenhydrate möglicherweise zu starren Membranstrukturen führen sollte und (III) auch die Überstrukturen polymerer amphiphiler Glucosamide aus Chitosan untersucht werden sollten. Hier interessierte vor allem die Frage, ob polymere Amphiphile in ähnlicher Weise aggregieren wie Monomere.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die **Schmelzpunkte** wurden mit einem Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Fa. Reichert bestimmt und sind nicht korrigiert.

Die **Elementaranalyse** wurden im mikroanalytischen Labor des Instituts für Organische Chemie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Infrarotspektren wurden in einem IR 257 Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen.

Die **¹H-NMR-Spektren** wurden an einem WH-270 bzw. 250 Kernresonanzspektrometer der Fa. Bruker gemessen. Die δ -werte beziehen sich auf Tetramethylsilan als inneren Standard.

Für die **Dünnschichtchromatographien** wurde Kieselgel mit Fluoreszenzindikator der Fa. Riedel-de Haen und silanisierter Kieselgel und Aluminiumoxid(neutral) mit Fluoreszenzindikator auf Glasplatten der Fa. Merck verwendet. Zur Sichtbarmachung der Substanzflecken dien-

te UV-Licht, Jod-Kammer oder für die Zuckerbindungen Phenol/Schwefelsäure-Sprühreagenz.

Zu den **rasterelektronenmikroskopischen** Aufnahmen wurden die Proben leitfähig mit einer 20 nm dicken Goldschicht besputtert(SC 501 EMSCOPE) und mit dem Rasterzusatz zum Philips EM 400 bei einem Kippwinkel von 0° oder 24° bei 40 KV und einem Spot von 20 nm durchgemastert. die fotografische Registrierung erfolgt mit 2000 Zeilen/2 Min. auf rollfilm Agfapan 400.

Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie: Die Proben wurden auf Träger, leitfähig mit einer 20 nm Goldschicht, aufgetragen und im Abzug über Nacht getrocknet. Falls die einfachen Präparate zur Rasterelektronenmikroskopie nicht entstanden waren, wurde zur schonenden Trocknung der Präparate Ethanol durch das Trocknungsmittel Peldri II (Fluorkohlenwasserstoff, Fa. Ted Pella, Inc.) in der Flüssigphase über 30°C ausgetauscht (1 h Peldri II/abs. Ethanol 1:1, 1 h Peldri II/abs. Ethanol 2:1, 1 h Peldri II/abs. Ethanol 3:1, 1 h Peldri II), zur Erreichung der Peldri-Festphase im Gefrierschrank gekühlt und das Peldri über Nacht im Vakuum absublimiert.

Reinigung von Rohmaterial, Chitin, aus getrockneten Krebschalen 1. 100g des Rohmaterials Chitin wurden in 750ml 1N-Natronlauge bei 80°C drei Stunden erhitzt. Es wurde mit je 500ml warmen Wassers dreimal gewaschen, anschließend mußte es in 750ml 1N-Salzsäure 18 Stunden bei Raumtemperatur ausgeschüttelt werden. Diese Aufarbeitung wurde zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde das Chitin dreimal mit je 500 ml dest. Wasser gewaschen. Zur Entfärbung wurde das Chitin unter Rückfluß in Aceton 5 Stunden gekocht und abgesaugt. Der Rückstand wurde über Phosphorpentoxid bei 50°C im Vakuum 3 Tage getrocknet.

Ausbeute: 72.9g(72.9% der Th.), IR(KBr): 3420-3350(br. OH und N-H Stretching), 2930,

2880(CH), 1650(Amid I), 1550(Amid II), 950cm^{-1} (CH₃-Rocking)(C₈H₁₃NO₅ × OH)_n (220.201)_n, Ber. C 43.64 H 6.41 N 6.36, Gef. C 44.38 H 6.68 N 6.62.

Deacetylierung von Chitin (Präparat für reines Chitosan) 2. 2g des gereinigten Chitins wurden in 100ml 47%iger NaOH-Lösung in einem Nickel-Tiegel suspendiert. Anschließend wurde es bei 110°C unter Argon 2 Stunden gekocht. Das bei der alkalischen Verseifung erhaltene Chitosan-Produkt wurde jeweils dreimal bei 80°C eine Stunde mit 500ml dest. Wasser gekocht. Diese Aufarbeitung wurde zur Sicherheit dreimal wiederholt. Danach war das Chitosan zu 90-95 Prozent deacetyliert. Für die vollständige Deacetylierung wurde das Chitosan in 2%iger Essigsäure gelöst und filtriert. In 2%iger Essigsäure löst sich das Chitosan sehr gut. Das Filtrat wurde mit 200ml 1N-Natronlauge tropfenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe der Natronlauge sieht die Chitosanlösung fädig aus, da das Chitosan in einer alkalischen Lösung fadenartig gewonnen werden kann. Das Chitosan wurde zentrifugiert und über Phosphorpentoxid 4 Tagen bei 80°C im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.02g(50% der Th.), IR(KBr): 3420(OH und NH-Stretching), 2910, 2850(CH), 1380cm^{-1} (eine neue Bande für über 96% ige Deacetylierung){(C₆H₁₂O₄) × H₂O)_n (179.211)_n, Ber. C 40.44 H 7.31 N 7.82, Gef. C 42.66 H 7.29 N 7.94

Die substanzprobe war sehr schwer löslich in üblichen Lösungsmitteln, die weitere Bestätigung der Struktur durch Aufnahme eines ¹H-NMR-spektrums konnte deshalb nicht erfolgen.

Octadecylsäure-(ethylhydrogencarbonat)-anhydrid 5. 14.23g(50 mmol) Stearinsäure wurden in 100ml abs. THF gelöst und unter Rühren bei 5°C zunächst mit 6ml Triethylamin (ca. 50 mmol) und dann tropfenweise mit 5.42g(50 mmol) Chlorameisensäureethylester in 50ml abs. THF versetzt, wobei man darauf achten mußte, daß die Temperature nicht über 0°C

steigt. Das Ganze wurde gerührt und ber Nacht stehen gelassen.

Das Triethylaminhydrochlorid wurde abfiltriert, das THF im Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in Ether gelöst. Nicht Gelöstes wurde abfiltriert und die etherische Lösung je zweimal mit 0.5 M Natriumcarbonat und 0.5 M Salzsäure ausgeschüttelt, mit dest. Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde im Rotationsverdampfer eingedampft. Es wurde ein weißer, wachsartiger Feststoff gewonnen.

Ausbeute: 11.52g(64.62% der Th.), Schmelzpunkt: 32°C, Rf-Wert: 0.72(sil. Kieselgel, Dioxan), IR(Film): 2910, 2845(CH), 1820, 1755(C=O), 1470(CH), 1080cm^{-1} (C-O), ¹H-NMR (CDCl₃): δ=4.32(q, 2H, COOCH₂), 2.46(t, 2H, CH₂COO), 1.68(p,2H, CH₂CH₂COO), 1.36(t, 3H, OCH₂CH₃), 1.28(s, 30H, CH₂), 0.84 ppm(t, 3H, CH₃), C₂₁H₄₀O₄(356.547) Ber. C 70.74 H 11.31, Gef. C.71.25 H 11.41

Poly(N-octadecanoylchitosan) (POC) 6. Zur Reaktion wurden 400g des Chitosans (zu 96% deacetyliert) in 50ml Lösungsmittel (10% ige Essigsäure/Methanol) homogenisiert. Die Lösung ließ sich absaugen und das Filtrat mit 50ml Methanol verdünnen. Dazu wurden 1.07g des Anhydrids 5, gelöst in 50ml Methanol/Isopropanol (1:1), bei Raumtemperatur zuge tropft. Nach Zugabe des Anhydrids 5 bildete sich langsam ein Gel. Mit 50ml Methanol wurde die Reaktionslösung wieder verdünnt und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in 100 ml Chloroform aufgenommen, eine Stunde gerührt und filtriert. Der Rückstand wurde mit Aceton/Wasser(7:1) gewaschen und anschließend in 10ml Methanolischer 1M-Natronlauge über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde dreimal mit Aceton/Wasser (7:1) gewaschen und über Phosphorpen-toxid bei 50°C 3 Tage im Vakuum getrocknet.

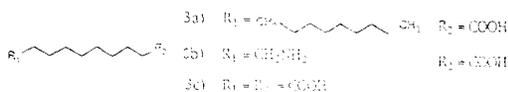
Ausbeute: 440mg (50% der Th.), IR(KBr): 3440(br. OH), 2920, 2850(CH), 1645(Amid I), 1550(Amid II), 1465cm⁻¹(CH), {(C₂₄H₄₅NO⁵) × H₂O}_n (445. 641)_n, Ber. C 64.69 H 10.63 N 3.14, Gef. C 63.55 H 10.20 N 3.58

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nach Literaturvorschrift^{3,4,10} wurde ein reines Chitin **1** hergestellt. Zur Darstellung eines Chitosans **2** wurde das Chitin **1** in 47%iger NaOH-Lösung deacetyliert. Um die Einheitlichkeit des Chitosans **2** zu belegen, haben Mima et al. die IR-Spektren zugeordnet.¹¹ Damit läßt sich mit Sicherheit feststellen, daß es sich um reines Chitosan handelt (Fig. 1).



Die käuflichen Produkt **3a-c** erwiesen sich als geeignete Ausgangssubstanzen für die Synthese der hydrophoben Seitenkette.



Frieser et al. haben im Jahr 1956 erstmals beschrieben, Säurechlorid **3a** durch Acylierung an die Aminogruppe des Zuckers gebunden werden kann.⁹ Die Reaktion sollte mit hoher Ausbeute verlaufen. Es traten jedoch Schwierigkeiten mit der käuflichen Verbindung **3a** auf. Da das Säurechlorid sowohl an der gewünschten Stelle der nucleophilen Aminogruppe des Chitosans **2**, als auch an den Hydroxygruppen des Zuckers angreift. Deshalb wurde die Umsetzung mit einem weniger reaktiven Carbonsäurederivat, dem gemischten Anhydrid **5**, durchgeführt. Das gemischte Octadecansäureanhydrid war aus Chlorameisensäureethylester zugänglich.

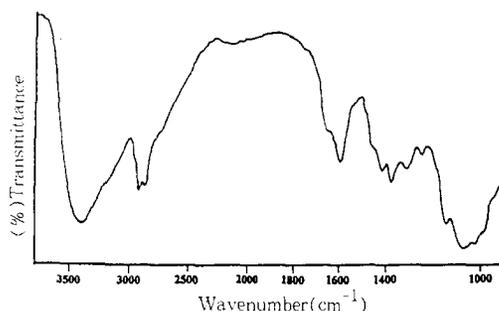
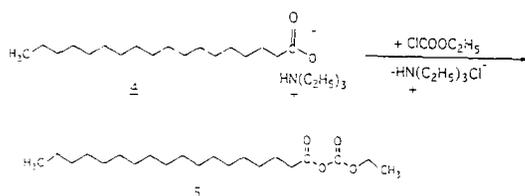


Fig. 1. IR-Spektrum (KBr) of chitosan **2**.

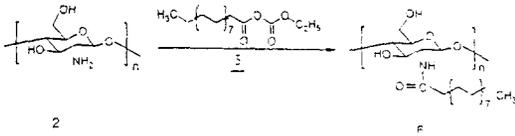


Die Synthese gelang durch Zugabe von Chlorameisensäureethylester zu einer Lösung von Octadecansäure **3a** in trockenem Tetrahydrofuran bei 10°C, die zur Erhöhung der Nucleophilie mit einem geringenüberschub Triethylamin versetzt wurde. Das Anhydrid konnte mit einer Ausbeute von 65% als Feststoff mit dem Schmelzpunkt 32°C isoliert werden. Das IR-Spektrum weist die charakteristischen Carbonylschwingungsbanden bei 1820 und 1755cm⁻¹ auf. Im ¹H-NMR-Spektrum kann man klar das erwartete Triplettssignal bei 2.46 ppm, sowie das Quartettsignal bei 4.32 ppm der Methylenprotonen des Ethylester¹² erkennen. Die Elementaranalyse lieferte ebenfalls befriedigende Ergebnisse.

Es wurden Versuche ausgeführt, um die infolge modifizierter Seitengruppen veränderten Eigenschaften des Polysaccharids zu untersuchen. Dazu wurde je eine Octadecanoylgruppe, CH₃(CH₂)₁₆CO-, an die Aminogruppe von Chitosan durch Acylierung mit dem entsprechenden Säureanhydrid angehängt.

Die Octadecanoylierung von Chitosan wurde in einer Lösung aus einem Teil 10% iger Essig-

Amphiphile Überstrukturen aus Chitin-Derivaten



säure und einem Teil Methanol unter homogenen Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

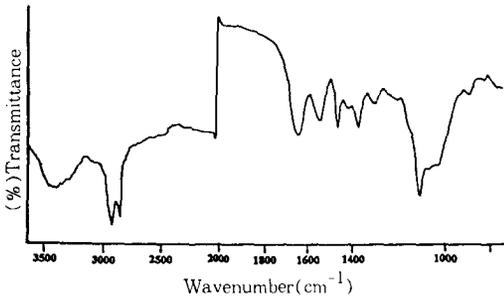


Fig. 2. IR-Spectrum (KBr) of POC 6.

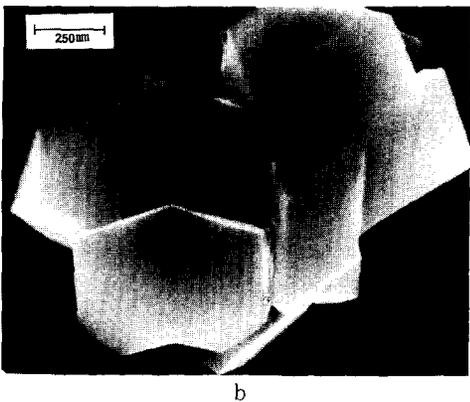
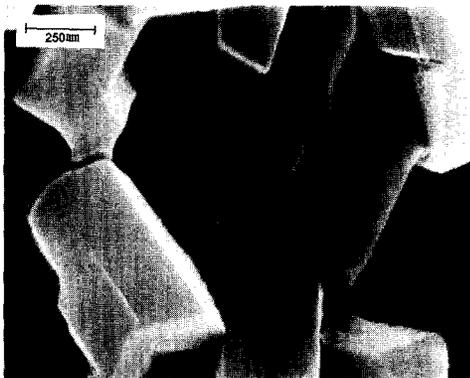


Fig. 3. a, b scanning electron micrographs (SEM) of POC 6.

Während der Zugabe von gemischtem Octadecansäureanhydrid **5**, das in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol/Isopropanol (1:1) gelöst war, bildete die Reaktionslösung ein Gel. Das breiartige Reaktionsgemisch wurde mit einem Überschuss von Chloroform versetzt, ausgefällt und wie folgt aufgearbeitet: Der Rückstand wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton/Wasser (7:1) gewaschen. Weiterhin wurde er mit 1N-Natronlauge in Methanol 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt um die freien Aminogruppen zu gewinnen, die mit Essigsäure eine unreaktive Salzform hätten bilden können. Ebenfalls liegt sich effektiv durch diese alkalische Bearbeitung der während der Reaktionsdauer an den Hydroxygruppen entstandene Ester abspalten. Nach dreitägiger Trocknung über Phosphorpentoxid bei 50°C im Vakuum konnte die polymere Zuckerkopfgruppe mit hydrophober Seitenkette **6** mit einer Ausbeute von 51% isoliert werden. Das IR-Spektrum zeigt die Valenzschwingungen der C-H-Gruppen bei 2920 und 2820cm⁻¹ und die sehr intensiven Valenzschwingungsbanden der Aminogruppe bei 1645 und 1550 cm⁻¹(Fig. 2). Zwar ist ein Wassermolekül an dem Produkt fest

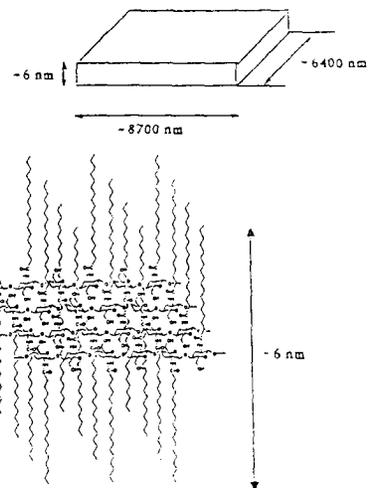


Fig. 4. Crystal monolayer model of aggregation from POC 6. The volume of crystal monolayer model is approximately (8700 × 6400 × 6)nm.

gebunden, die Elementaranalyse stimmt jedoch sehr gut mit den theoretisch berechneten Werten überein.

In der Literatur^{4,5,6} wird beschrieben, daß Chitin und Chitosan durch geeignete chemische Prozesse in nützliche Filme und Fasern überführt werden können. In dieser Arbeit zeigt die Verbindung **6** durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen im Gegensatz zu der Literatur¹³ keine Faserstruktur, sondern planare Strukturaggregate (Fig. 3a, 3b und Fig. 4).

Es ist wahrscheinlich, daß sich die Eigenschaften des Polysaccharids wegen der modifizierten Seitengruppen verändern. Diese Modifizierung hat offensichtlich zur Folge, daß die Bildung von hydrophoben Chitinderivaten die Faserstruktur auflöst und stattdessen planare Strukturen in Form wohldefinierter Kristallite erzeugt.

Der Aufbau aus den Einzelmolekülen ist nur mit dem Modell in Abbildung 4 erklärbar: Das Grundgerüst aus Chitin bildet in der Mitte eine Schicht; die Seitenketten sollten sich nach oben und nach unten ausrichten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. R. A. A. Muzzarelli, Natural Chelating Polymers, "Alginic Acid, Chitin and Chitosan", p. 83, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig, 1973.
2. A. B. Foster and J. M. Webber, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **15**, 371 (1960).
3. N. A. Gow and G. Gooday, *Carbohydr. Res.*, **165**, 105 (1987).
4. P. R. Austin and C. J. Brine, *Science*, **212**, 749 (1981).
5. W. Schreiber, *Nach. Chem. Tech. Lab.*, **25**, 305 (1977).
6. J. F. Kennedy, "Carbohydrate Chemistry", p. 632, Clarendon Press Inc., Oxford, 1988.
7. R. Maruea, B. J. Suder, and J. P. Wighman, *J. Appl. Polym. Sci.*, **27**, 4827 (1982).
8. J. -H. Fuhrhop and C. Boettcher, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1768 (1990).
9. M. Frieser and L. Frieser, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2825 (1956).
10. M. Kurita, T. Sannan, and Y. Iwakura, *Makromol. Chem.*, **178**, 2595 (1977).
11. S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**, 1909 (1983).
12. Hesse, meier, und Zeeh, "Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie", p. 94, Thiemen Verlag, 1984.
13. J. -F. Revol, K. H. Gardner, and H. Chanzy, *Biopolymers*, **27**, 345 (1988).