

综 述

## 羧甲基壳聚糖

### ——一种多用途的甲壳素衍生物

夏文水 吴焱楠

(食品科学与工程系)

## 0 前 言

羧甲基壳聚糖(Carboxymethyl chitosan, CMchitosan)是壳聚糖(Chitosan)经羧甲基化反应后的一类甲壳素(Chitin)衍生物,由于壳聚糖分子中存在游离氨基,反应时取代基团可进入 O 和 N,则相应的产物有 O-羧甲基壳聚糖(O-CMchitosan),N-羧甲基壳聚糖(N-CMchitosan)和 N,O-羧甲基壳聚糖(N,O-CMchitosan).若甲壳素直接进行羧甲基化,则产物为羧甲基甲壳素(CMchitin).

近十几年来,壳聚糖的化学改性一直是甲壳素研究中十分活跃和引人注目的课题<sup>[1]</sup>.在迄今所报道的 600 多种甲壳素衍生物中,羧甲基壳聚糖是研究最多的一种.羧甲基壳聚糖的研究活动可追溯到 1937 年,Kigby 将氢氧化钠加入到壳聚糖的氯乙酸溶液中,得到一种水溶性产物——羧甲基壳聚糖;1940 年 Thor 制备出碱性甲壳素,从此开创了甲壳素羧甲基化的途径.早期所做的大部分研究工作,是希望制备一种水溶性甲壳素,以此作为溶菌酶和几丁质酶(Chitinase)的底物;80 年代初,由于制备高取代度的羧甲基纤维素取得很大进展,因此这个相关工艺的发展促进了羧甲基甲壳素的研究<sup>[2]</sup>.

## 1 羧甲基壳聚糖的制备方法

甲壳素和壳聚糖在羟基上的羧甲基化反应类似于羧甲基纤维素的制备.甲壳素用浓氢氧化钠溶液在低温下碱化,与氯乙酸进行羧甲基化反应,得到 O-CMchitin.若在室温下进行碱化反应,则产物为 O-CMchitosan.若加热到 60℃,可得到 N,O-CMchitosan.各种产物的生成,温度的影响是重要的<sup>[3]</sup>.由于甲壳素和壳聚糖不溶于碱性溶液,使该反应处于多相体系中.另一类反应是在酸性介质中进行,采用乙醛酸作为羧甲基化试剂,可使反应只发生在 N 上,经还原后可得到 N-CMchitosan.利用该反应将 O-CMchitosan 再与乙醛酸

收稿日期:1995-04-17

缩合还原后也可得到  $N,O-CMchitosan^{[1]}$ , 该反应的特点是取代有选择性, 不需要加热, 可在水溶液中进行, 且为均相体系。

在不同化学试剂、介质、温度、浓度、pH 值、时间等反应条件下, 羧甲基化产物会具有不同的取代程度、取代位置和取代分布, 从而影响到最后羧甲基化产物的各种性能。可通过控制反应条件, 选择性地制备一定已知结构的羧甲基壳聚糖。

## 2 功能性质与结构的关系

羧甲基甲壳素类衍生物具有类似于纤维素醚类的特性, 有优良的增稠性、分散性、乳化性、保湿性、成膜性、凝胶性等, 还具有两性高分子电解质和螯合金属离子的特性。与甲壳素和壳聚糖相比, 溶解性增加, 水溶性提高, 在广泛的 pH 范围内溶解, 为应用提供了方便。日本学者冲增哲曾对羧甲基壳聚糖的分子量、溶液稳定性粘度、电导度等进行了系统的研究<sup>[5]</sup>。这类化合物的功能性质丰富和独特, 这是由其本身的化学结构所决定的。

### 2.1 取代基团特性

壳聚糖经羧甲基化反应后分子内引入  $-CH_2COOH$  基团, 除取代基团体积、大小对分子溶解性等性质影响外, 酸性羧基的引入, 增加了在碱性溶剂中的溶解性, 并赋予大分子阴离子性质。对于具有一定脱乙酰化度 (Degree of deacetylation, DD) 的羧甲基壳聚糖, 其大分子是一个两性离子, 在溶液中表现出两性聚电解质的性质, 并相应有一特定的等电点。随着取代基数目的增加和完全, 阳离子型壳聚糖将由两性向阴离子型转变, 从而引起溶液性质的变化。另外, 氨基上羧甲基化后, 则产生甘氨酸基团  $-NHCH_2COOH$ , 这与羧甲基壳聚糖的螯合金属离子有关, 也具有一定的生物学意义。

### 2.2 取代位置

在壳聚糖分子链上, 与化学性质有关的功能基团是氨基葡萄糖 (Glucosamine, GA) 单元上的  $C_6$  伯羟基,  $C_3$  仲羟基和  $C_2$  氨基或乙酰胺基以及糖苷键。其中, 糖苷键比较稳定, 不易断裂, 也不与其它羟基形成氢键; 乙酰胺基化学性质稳定, 但参与氢键形成。所以, 通常壳聚糖的化学反应性只涉及到 2 个羟基和氨基, 而氨基的含量又取决于壳聚糖的 DD。由于立体化学位阻、极性取代基的静电效应、分子内氢键的影响和反应条件的不同, 则各个基团的反应能力和反应机制也不一样。在碱性介质中, 羧甲基化反应主要发生在  $C_6$  伯羟基和  $C_2$  氨基上; 在酸性介质中, 主要是  $C_2$  氨基被羧甲基化。

### 2.3 取代程度 (Degree of substitute, DS)

平均每个 GA 或 N-乙酰胺基葡萄糖 (N-Acetylglucosamine, AGA) 单元上被羧甲基化的基团数目称为取代度。即每个 GA 或 AGA 单元上羟基和氨基基团参加反应的数目。对于  $O-CMchitin$ ,  $O-CMchitosan$  和  $N-CMchitosan$ , 其平均 DS 只能是  $\leq 2$ , 而对于  $N,O-CMchitosan$ , 其最大取代度为  $DS \leq 3$ 。通常情况下, 羧甲基壳聚糖取代度都是小于 2。取代度可通过元素分析、光谱分析和电位滴定等方法来测定<sup>[6]</sup>。值得注意的是当用乙醛酸作为羧甲基化试剂时, 由于反应活性高, 有时会生成某些 N,N-二羧甲基壳聚糖<sup>[7]</sup>。一方面, 随着 DS 的提高, 根据极性相似和溶剂化原则, 其溶解性也随之增加。另一方面, 合适的 DS 是产物具有优良特性的结构基础之一。

### 2.4 取代分布

取代基的分布由两个独立的部分组成,一是沿着甲壳素或壳聚糖分子链在每个 AGA 或 GA 单元上的分布;二是在每个 AGA 或 GA 单元中不同羟基和氨基上的分布,而 AGA 或 GA 单元的结构有三种类型,即(1)非还原端单元;(2)中间单元;(3)还原端单元。在非还原端单元上多一个仲羟基位于 C<sub>4</sub> 上,还原端单元是半缩醛结构,有还原能力,而中间单元则决定了高聚物的主要性质。前一取代分布更多地取决于甲壳素和壳聚糖的聚集态结构,后一取代分布主要是在 C<sub>6</sub> 伯羟基和 C<sub>2</sub> 氨基上,受到游离氨基分布的影响。如果取代分布不均匀,即使平均取代度达到指标,但产品的溶解性和其它功能性质也会较差。在非均相反应中,取代分布受到反应试剂、反应条件等影响,若在均相体系中,取代分布易为均匀化。

### 2.5 聚合度及其分布

甲壳素或壳聚糖聚合度及其分布反映了其分子量的大小和分布,对产物的溶解性和溶液性质,对酶降解的稳定性等有较大的影响。决定羧甲基壳聚糖聚合度和分布的主要因素为:原料的聚合度和分布及其在反应过程中的降解程度。在强酸溶液中,易引起 C<sub>1</sub> 和糖苷氧键的断裂,在强碱介质中,也易引起端基降解和糖苷键的断裂,另外,反应中也有氧化降解,都将引起聚合度的下降,造成产物粘度和其他性质下降。

## 3 应用

### 3.1 农业上的应用

在收获前的庄稼如玉米、花生中存在的黄曲霉素是 *Aspergillus flavus* 和 *A. parasiticus* 产生的次级代谢产物,对人体和动物有毒害作用。据报道,N-CMchitosan 可使黄曲霉素减少 90% 以上,而真菌生长降低到一半以下。产毒性真菌细胞显示,N-CMchitosan 的存在抑制了孢子发芽和真菌体孢子形成<sup>[8,9]</sup>。对大米、大豆、松子(Pine)和其它种子进行试验其结果表明,在发芽和幼苗生长期,几丁质酶活性增加,如稻谷在 6 天中增长了 8 倍。当种子与 N-CMchitosan 和壳聚糖低聚物接触时,几丁质酶活性进一步增强<sup>[10]</sup>。

当玉米、马铃薯用 N-CMchitosan 处理时,可使贮存蛋白质的含量增加 2~3 成,应用于西红柿,使贮存蛋白质含量倍增。N-CMchitosan 通过增加铵离子的利用而使庄稼贮存蛋白质含量增加<sup>[11]</sup>。同样,N-CMchitosan 能使玉米种子中蛋白质含量翻倍,整个细胞的 RNA 含量也有提高。这些结果不仅对增加玉米和其它庄稼的食用和经济价值有重要意义,而且也为研究植物代谢调节机制提供了新途径<sup>[12]</sup>。

### 3.2 医学上的应用

已经发现 N-CMchitosan 适合于阻止组织间粘结,以其凝胶或膜用于外科伤口,由于粘度和弹性大于血浆,可阻止血液在组织表面凝结从而阻止粘结<sup>[13]</sup>。

O-CMchitin 具有诱导半抗原特异性抗体的免疫功能和作为控制释放的药物载体。当 CMchitin 通过一个非生物降解空间甲苯异丙胺(MABA)连接后,将这种药物与某种免疫辅助剂注射到兔子身上,随后会产生 MA 特异性抗体<sup>[14]</sup>。若 O-CMchitin 与 Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS)短肽形成共聚体时,该化合物对鼠的肺癌转移有抑制作用,并增加和延长 RGDS 的医疗作用<sup>[15]</sup>。

对于低分子量的 N-CMchitosan,若在 C<sub>3</sub>,C<sub>6</sub> 位羟基和 C<sub>2</sub> 位 N 上进行磺化,其产物对 HIV-1 和 RLV 病毒具有抗回复活性。由于该化合物在对细胞不产生毒性的剂量下,对病

毒具有良好的抑制作用。因而,特别在抗 AIDS 病毒方面引起浓厚兴趣<sup>[16,17]</sup>。N-CMchitosan 的磺化物也具有类似肝素的活性,可专一性地作用于内凝血因子,而不与体外及普通凝血因子反应,其作用机制与肝素截然不同,这对抗凝血处理是重要的<sup>[18]</sup>。

### 3.3 食品工业上的应用

N,O-CMchitosan 水溶液形成的薄膜对气体有选择性的通透,特别适合于作为水果保鲜剂。美国和加拿大有一种商品名为“Nutri-save”的 NOCC 水果保鲜剂即将上市<sup>[20]</sup>。国内近几年来,研究了 N,O-CMchitosan 对猕猴桃、草莓、水蜜桃等水果的保鲜作用<sup>[21,22]</sup>。

N-CMchitosan 的螯合作用在保存肉类方面也发挥了有利的作用,它能避免己醛和不愉快气味的形成,起抗氧化的效果<sup>[23,24]</sup>。

据报道,将 CMchitin 作为增稠稳定剂,与果汁、酸味剂、甜味剂、维生素、牛磺酸配方而成的饮料,具有活血和抗过敏的功效<sup>[25]</sup>。

### 3.4 化妆品工业上的应用

CMchitin 和 N-CMchitosan 由于优良的水溶性、乳化性、成膜性能而适用于做为水质化妆品的功能性成分<sup>[26]</sup>。0.25% 的 N-CMchitosan 和 CMchitin 水溶液其粘度比其它种类的保湿剂要高,且持续保湿能力优于透明质酸。许多多糖溶液在加热过程中会引起粘度降低、凝胶化、沉淀等变化,而 0.25% 的 CMchitin 水溶液在广泛的 pH 范围内,即使是高温和长时期加热,都非常稳定,特别适用于那些需要加热或杀菌的化妆品,如清洗液、洗面奶等。尤其在 N-CMchitosan 中,带有大量的甘氨酸基团,它在皮肤中是大量存在的,将十分有助于皮肤的保健。在意大利米兰开始生产一种含有 N-CMchitosan 的名叫“Crema Idratanre”的化妆品。

另外,N-CMchitosan 与壳聚糖和其它改性壳聚糖,具有增强抗菌作用,这也是应用在化妆品的又一个优点。特别是对口腔中典型的蛀齿细菌有非常高的抑菌作用,可作为牙膏的配方成分<sup>[27]</sup>。

### 3.5 螯合金属离子及其它用途

N-CMchitosan 能螯合过渡金属离子,形成有色的一般为不溶性的产物,其结果取决于 pH 的变化<sup>[28]</sup>。对 Co,Cu,Zn,Hg,Pb 最大的螯合作用是在 pH6~7,而对于 Ni 和 Ca 则分别是在 pH7.5 和 pH5.5。降低 pH 值,则抑制 N-CMchitosan 的键合能力,尤其对 Cu 和 Pb。在一定浓度范围内,Cu,Hg,Pb 和 Ur 可被定量除去。相对而言,温度和取代程度对螯合作用影响不大。对乙酰化程度为 0.42 和 DS 为 0.58 的 N-CMchitosan,对各种金属离子的亲和力依次顺序是 Cu>Cd>>Pb,Ni>Co>>Ca<sup>[29]</sup>。

用氯代环氧丙烷交联 N-CMchitosan 可以提高螯合能力,这对用作色谱载体是有意义的。交联的 N-CMchitosan 可以用来除去海水、饮用水、核废水中的过渡金属离子,最有用的是使废水再生。事实上,与离子交换树脂和活性炭相比,交联的 N-CMchitosan 可用于螯合浓度非常低的过渡金属离子或浓度较高的碱土金属离子并伴随有微量元素的情况,如从核工厂产生的酸溶液中除去钴-60 和从氟化钠浓度高的海水中富集 Cu,Cr,Fe 离子等<sup>[30]</sup>。此外,N-CMchitosan 与染料在水介质中的相互作用一直在受到研究<sup>[31,32]</sup>。

## 4 展 望

从羧甲基纤维素工业的发展来看,目前世界各厂家已生产出 250 多种不同型号的羧甲

基纤维素,广泛应用于洗涤剂、食品、纺织、印染、造纸、石油、采矿、医药、陶瓷、涂料、化妆品等许多工业和制造业部门。而甲壳素也是自然界最丰富的有机化合物之一,特别是该分子中存在羟基和氨基,可供结构修饰的基团多,其相应的衍生物大大增加。壳聚糖经羧甲基化反应后,被赋予水溶性,其功能性提高,这类改性壳聚糖比原结构和合成聚合物,具有更多的生物相容性、更高的亲水性,更大的生物降解性和更易处理的物理形态。然而,由于甲壳素和壳聚糖化学结构及聚集态结构的复杂性,改性后产物的复杂性,尚需在制备方法、衍生物理化性质、结构与性质的关系以及提高非均相反应中羧甲基化反应的均匀性方面进行深入的研究和探讨。但是可以预言这类水溶性甲壳素衍生物比羧甲基纤维素将具有更大更广泛的潜在应用价值。

#### 参 考 文 献

- 1 夏文水,陈洁. 无锡轻工业学院学报,1993,12(3)
- 2 Muzzarelli R A A. Carbohydrate Polymers,1988,8:1~12
- 3 Hayes E R. US Patent, 1986,4:619,995
- 4 Muzzarelli R A A. Eur. Patent Appl.1987.212,688
- 5 冲增哲. 日本农业化学杂志,1958,32:19
- 6 Muzzarelli R A A, Biochem J. Biophys. Methods,1980,2:299~306
- 7 Rinando M, Dung P L, Milas M. Int. J. Biol. Macromol. 1992,14:122~128
- 8 Cuero R G, Duffus E, Osuji G, et al. J. Agricult. Sci. 1991,117:165~169
- 9 Cuero R G, Osuji G, et al. Biotechnol. Letters,1991,13:441~444
- 10 Hirano S, Yamamoto T, Hayashi M, et al. Agric. Biol. Chem. 1990,54:2719~2720
- 11 Osuji G O, Cuero R G. J. Agr. Food,1992,40:724~734
- 12 Osuji G O, Cuero R G. Food Biotechnol,1992,6:105~126
- 13 Highem P A, Posey-Dowty J D. Eur. Pat. Appl. 0,426,368
- 14 Tokura S, Miura Y, Johmen M, et al. J. Controlled Release,1994,280:135~41
- 15 Komazawa H, Saiki I, Igarashi Y, et al. Carbohydrate Polym,1993,21(4):297~307
- 16 Vercellotti S V, Ruprecht R M, Gama-sasa M A. PCT Int. Appl. WO92/05791
- 17 Gama-sasa M A, Fazely F, Koch J A, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1991,174:489~496
- 18 Muzzarelli R A A, Tanfani F, Gmanuelli M, et al. Carbohydr. Res. 1982,107:199~214
- 19 Muzzarelli R A A, Delben F. Carbohydr. Symp. Darmstadt,1987
- 20 Cardan C A, Blair H S, et al. Chem. Eng. Res. Des. 1991,69A:195~6
- 21 唐本璜,杨军艳等. 食品与发酵工业. 1994,4:31
- 22 许时婴,沈欣等. 无锡轻工业学院学报,1993,12(2)
- 23 Angelo A J S, Crippen K L, Dupuy H P, et al. J. Food Sci. 1990,55:1501~1505
- 24 Angelo A J S, Vercellotti J R, Dupuy H P, et al. Food Technol,1988.133~138
- 25 Yoshihito N. JP02,283,261
- 26 Proserpio G, Bardi E, Massera A M. Cosmetic Index,1992
- 27 Muzzarelli R A A, Tarsi R, Emanuelli M, et al. Prod. Chim. 1987,3:13~16
- 28 Dobbetti L, Delben F. Carbohydr. Polym. 1992,18:273~282
- 29 Delben F, Muzzarelli R A A. Carbohydr. Polym. 1989,11:221~232
- 30 Muzzarelli R A A, Weckx M, Filippini O, et al. Carbohydr. Polym. 1989,11:293~306
- 31 Stefancich S, Delben F, Muzzarelli R A A. Carbohydr. Polym. 1994,24:17~23
- 32 Delben F, Gabrielli P, Muzzarelli R A A, et al. Carbohydr. Polym.1994,24:25~30