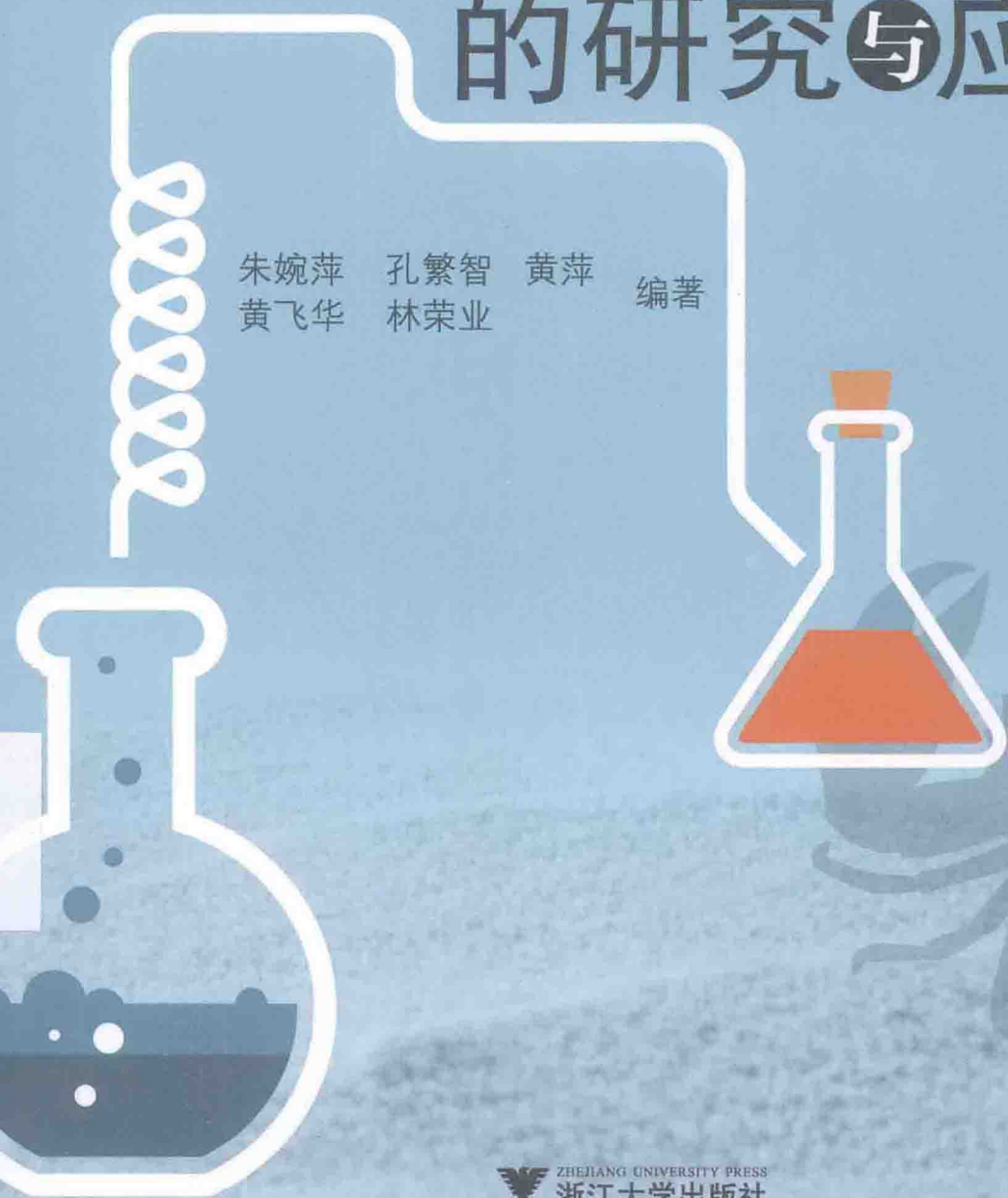


JIAKESU JIQI YANSHENGWU
DE YANJIU YU YINGYONG

甲壳素及其衍生物 的研究与应用

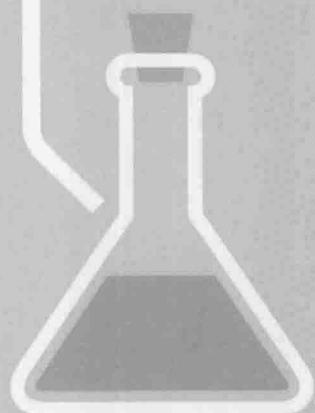
朱婉萍 孔繁智 黄萍 编著
黄飞华 林荣业



JIAKESU JIQI YANSHENGWU
DE YANJIU YU YINGYONG

甲壳素及其衍生物 的研究与应用

朱婉萍 孔繁智 黄萍 编著
黄飞华 林荣业



图书在版编目(CIP)数据

甲壳素及其衍生物的研究与应用 / 朱婉萍等编著. —杭州: 浙江大学出版社, 2014. 11

ISBN 978-7-308-13586-3

I. ①甲… II. ①朱… III. ①甲壳素—衍生物—研究 IV. ①Q539

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 167097 号

甲壳素及其衍生物的研究与应用

朱婉萍 孔繁智 黄 萍 黄飞华 林荣业 编著

策划编辑 季峥(zzstellar@126.com)

责任编辑 季峥

封面设计 林智广告

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州林智广告有限公司

印 刷 杭州日报报业集团盛元印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 34.75

插 页 1

字 数 880 千

版 印 次 2014 年 11 月第 1 版 2014 年 11 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-13586-3

定 价 168.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部联系方式: (0571) 88925591; <http://zjdxcbbs.tmall.com>

编辑委员会名单

朱婉萍(浙江省中医药研究院)
孔繁智(浙江省中医药研究院)
黄 萍(浙江省肿瘤医院)
黄飞华(浙江省立同德医院)
林荣业(浙江金壳药业有限公司)
羊 波(浙江省立同德医院)
辛传伟(浙江省立同德医院)
张美玲(浙江省立同德医院)
祝永强(浙江省立同德医院)
杨秀丽(浙江省立同德医院)
郑造乾(浙江省立同德医院)
林蒙蒙(浙江省立同德医院)
应 茵(浙江省立同德医院)
叶佐武(浙江省立同德医院)
陈小因(杭州师范大学)
王 斌(浙江省立同德医院)
林昌宇(浙江金壳药业有限公司)
林昌恺(浙江金壳药业有限公司)
王昱霁(浙江省立同德医院)
蔡婷婷(浙江省立同德医院)
刘 霞(浙江省立同德医院)
李承乐(浙江省立同德医院)
袁 雍(浙江省立同德医院)
孙云峰(浙江省立同德医院)
夏仲尼(浙江省立同德医院)
韩 冰(浙江省立同德医院)

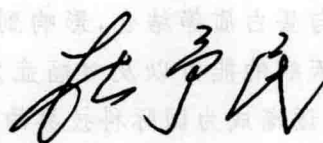
序 言

甲壳素在地球上仅次于纤维素的第二大天然高分子多糖,主要存在于甲壳类(虾、蟹、昆虫等)动物的外壳及真菌细胞壁中。甲壳素是由 2-乙酰氨基葡萄糖,通过 β -1,4-糖苷键连接而成的线性聚合物多糖。壳聚糖是其脱 2-乙酰基产物。甲壳素含有大量氮元素,也是典型的地球生物与海洋有机物的氮源。这种广泛存在的物质在生物医药、食品、化妆品、功能材料、纺织造纸、农业、环保、生物技术等诸多领域的应用已引起了人们极大的关注。甲壳素、壳聚糖已经发展为一个具有多功能性的多糖家族,除了易于化学反应、带正电荷、易成膜成丝外,还具有优异的生物相容性、生物降解性、生物粘附性与安全抗菌性等独特的生理功能。甲壳素科学已成为化学、生物学、材料学、医药学、微生物学等多学科研究目标。长时间以来,传统生物学观点认为糖类仅是提供、储存能量的分子,或是作为生物体结构和支撑物质。直到 20 世纪 80 年代,科学家发现了糖类在细胞表面可与蛋白质等结合,影响到细胞间相互信息传递、机体的免疫功能、各种感染诱发疾病的能力以及对癌症发生和转移的调控作用。因此,糖类资源的开发、应用已逐渐成为国际科技界的新研究热点之一。

1996 年,中国化学会应用化学委员会在大连召开了全国第一届甲壳素研讨会,拉开了甲壳素、壳聚糖学术交流与应用开发的序幕。1999 年 10 月,于武汉大学召开了全国第二届甲壳素化学与应用研讨会,并正式成立了中国化学会甲壳素专业委员会。从此,我国甲壳素、壳聚糖的基础与应用研究得到快速蓬勃的发展。我国许多高等院校、科研院所以及企事业单位在甲壳素生物材料和精细化工制品方面,如壳聚糖基衍生物构建的环境友好材料以及绿色新溶剂溶解甲壳素所创制新材料、壳寡糖链植物疫苗基础理论及在农业生产中的实际应用等方面进行了深入研究;近 30 个生物医用敷料制品批准上市,并开发了一大批在临床上具有自主知识产权的成果。近十多年来,国家对甲壳素、壳聚糖的研究与应用加大了投入与支持,研发队伍不断壮大,在国际重要期刊上相关的学术论文的数量也显著提升,部分研究领域已达到国际先进水平,并得到世界同行专家普遍认可。这表明我国甲壳素学科研究的自主创新能力进一步增强,已成为国际上

的主力军。目前,我国有相关甲壳素生产企业 100 多家,已成为世界甲壳素及其粗加工产品生产量与出口量最大的国家。但我国的甲壳素产业存在产品同质化且品种单一、技术与生产工艺较落后等问题,不具备竞争优势。企业需要做大做强,亟须加强产学研紧密结合,开展科技人员对精深加工的协同攻关,深化产业化关键技术的突破和加速技术进步,不断增强科技自主创新能力和核心竞争力,从而推动我国甲壳素产业整体向前发展。

浙江省中医药研究院孔繁智研究员、朱婉萍研究员所在的课题组,从事壳聚糖特别是壳聚糖医用敷料的研究已有二十多年,进行了急性与长期毒性、致突变、畸形、致癌作用等安全性与药理研究,建立了通过模型计算实现壳聚糖的定向降解新方法,还获得国家 FDA 新药证书,在壳聚糖及其衍生物在医药上的应用方面做了大量工作。在繁忙的工作之余,该课题组编著了《甲壳素及其衍生物的研究与应用》这本书,内容丰富,资料翔实,综述了国内外甲壳素及其衍生物研发、应用现状与发展方向,不仅介绍了甲壳糖、壳寡糖、单糖及其衍生物的研究进展,还着力阐述了它们在医药领域中的应用前景。本书可作为高等院校师生和广大科技工作者的参考书,对从事甲壳素相关行业的管理者与生产人员也具有参考价值。希望通过此书的出版能促进相关专业学者的交流与协作,进一步推进甲壳素科学与技术研究与应用的新发展。



中国化学会甲壳素专业委员会主任

武汉大学甲壳素研究与开发中心主任、教授

2014 年 8 月 30 日

前言

甲壳素,又名几丁质,是一种含氮多糖类物质。其最早发现于19世纪初,但由于资源分布广泛,结构组成复杂,一直未引起人们的重视。直到一百多年后,在美国波士顿召开了第一次甲壳素国际学术研讨会议,甲壳素的开发利用才正式拉开序幕。此后,关于甲壳素及其衍生物的研究突飞猛进,产品日新月异。如今,甲壳素产业遍布全球,其产品早已被用于轻纺化工、日用化学、食品及医药卫生等各大领域,举世瞩目。

甲壳素在地球上仅次于纤维素的第二大天然高分子多糖,广泛存在于甲壳类(虾、蟹、昆虫等)动物的外壳及真菌细胞壁中。作为目前唯一发现的碱性多糖,甲壳素性质独特,具有广泛的生物活性和良好的生物相容性。研究显示,甲壳素可以降“三高”(高血压、高血糖、高血脂),抗肿瘤,提高免疫力,是重要的保健食品和药品来源。将通过与现代生物技术的结合,其镇痛止血、抑菌抗炎、诱导组织再生、促进创伤愈合等功能特性在生物医用材料领域中显示出极大的应用与研究价值。不断的化学改性赋予其更多的功能,其降解后的低聚糖、氨基葡萄糖及各种壳聚糖盐类显示出更丰富的生物活性,而甲壳素、壳聚糖溶解性提升和相对分子质量控制技术俨然成为当前研究的热点,让我们对其的认识不断深入。而今,沧海桑田,甲壳素产业已逐步形成以虾壳废物回收为工业主体,产学研结合为发展模式,功能材料为开发亮点的现代工业化产业链,年产值数百亿元。甲壳素及其衍生物主要来自大海,也是海洋经济中一个重要的组分部分。

回眸20世纪50年代,我国沿海只有几十家小型企业从事甲壳素的回收和生产,由于技术落后,外加之后困难时期的经济调整,甲壳素产业一直没有得到较快的发展。直到90年代,国内外甲壳素研究空前活跃,面对市场的急大需求,一大批企业一哄而上,产值迅速扩大,但产品仍供不应求。

我国甲壳素的资源非常丰富,但每年生产的90%的壳聚糖产品作为工业原料出口国外,国内主要作为饲料和工业添加剂等低端产品,附加值极低。同时,产量扩增的背后是严重的污染。受到污染的限制,大量企业面临退出生产的窘困局面。与我们合作多年的浙江金壳药业有限公司率先调整发展战略,推动并

完成“甲壳素清洁生产应用与研究”项目研究,建成我国第一条符合 GMP 药用生产标准的甲壳素清洁生产线,具有重大指导意义。我们课题组对甲壳素及其衍生物做了大量的研究,取得了丰硕成果。例如,以壳聚糖为辅料,建立了壳聚糖药用辅料的国家标准,完成了国家新药口腔溃疡膜——冰硼膜的开发与研究。此外,我们也对壳聚糖进行了系统的安全性研究,包括对神经系统、心血管系统、呼吸系统的影响、最大耐受量、急性毒性、长期毒性、致突变、致畸、致癌等方面的研究,使壳聚糖的应用安全性更有依据。因此,本书除了介绍甲壳素及其衍生物的国内外研究现状、发展趋势、各类壳聚糖及衍生物的制备、质量控制、生物学功能、在医药等领域的应用外,书中将对以上内容进行介绍,以供读者探讨交流。

在本书的编写过程中,得到了浙江大学、武汉大学等单位专家学者的鼓励和支持。浙江大学胡永洲教授在百忙之中对本书提出许多宝贵意见。浙江大学第二附属医院潘以方主任医师指导并参与人工泪液的研究。浙江省立同德医院柴秀娟主任医师参与完成甲壳素安全性与药效的研究。在此向关心和参与本书编写和出版的同仁表示衷心的感谢。

希望本书的出版对甲壳素及其衍生物的产品应用与研究有所帮助和推动。限于学识和水平有限,加之时间仓促,本书难免存在不足之处,敬请读者朋友批评指正。

《甲壳素及其衍生物的研究与应用》编委会

2014 年 8 月

目 录

CONTENTS

第一章 概 述	1
1.1 甲壳素和壳聚糖的发现与存在	1
1.1.1 甲壳素和壳聚糖的发现和命名	1
1.1.2 甲壳素和壳聚糖的存在	2
1.2 甲壳素和壳聚糖的研究与生产发展史	4
1.2.1 国外研究与生产发展史	4
1.2.2 国内研究与生产发展史	5
1.3 国内外研究现状与现代应用概述	5
1.3.1 国内外研究现状	5
1.3.2 现代应用概述	6
1.4 学术研讨会概况	15
1.5 甲壳素与壳聚糖研究发展趋势	17
1.5.1 质量控制技术是关键	17
1.5.2 相对分子质量控制是新起点	17
1.5.3 改善溶解性是重点	17
1.5.4 清洁生产是新思路	18
1.5.5 重新评价甲壳素的生理活性是新思考	18
参考文献	18
第二章 甲壳素	22
2.1 甲壳素的结构	22
2.1.1 甲壳素的晶体结构	22
2.1.2 微纤维结构	27

2.2 甲壳素的溶解性	28
2.2.1 概述	28
2.2.2 溶解甲壳素的溶剂	30
2.2.3 甲壳素溶解的影响因素	36
2.2.4 甲壳素的溶解过程及机理	38
2.2.5 甲壳素溶液的稳定性	39
2.3 红外光谱和紫外光谱	45
2.3.1 红外光谱	45
2.3.2 紫外光谱	46
2.4 质谱	49
2.5 核磁共振谱	51
2.5.1 甲壳素 NMR 波谱的一般特征	51
2.5.2 乙酰度及多糖修饰后取代基的取代位置和取代度	51
2.5.3 构型和构象	52
2.5.4 糖残基及分布	52
2.5.5 晶体结构和结晶度	53
2.5.6 甲壳素及其衍生物与离子及其他有机分子的相互作用	53
2.5.7 展望	53
2.6 相对分子质量和相对分子质量分布	55
2.6.1 黏度法	57
2.6.2 凝胶色谱法	61
2.6.3 多角度激光光散射法	61
2.7 甲壳素的生物合成途径	64
2.7.1 甲壳素合成过程中的酶和甲壳素合成酶	65
2.7.2 甲壳素分解过程中的酶和甲壳素分解酶	69
2.8 甲壳素的制备	71
2.8.1 物理法	71
2.8.2 化学法	71
2.8.3 微生物法	76
2.8.4 化学微生物结合法	79
2.9 甲壳素的生物特性(简述)	80
参考文献	80

第三章 壳聚糖	91
3.1 壳聚糖的结构	91
3.1.1 壳聚糖的结构单元	91
3.1.2 壳聚糖的结晶结构	92
3.1.3 壳聚糖的红外光谱	95
3.1.4 壳聚糖的核磁共振谱	96
3.2 壳聚糖的液晶性研究	98
3.2.1 液晶态概述	98
3.2.2 液晶织构	100
3.2.3 液晶临界浓度	103
3.2.4 胆甾相的特殊性质(圆二色性)	107
3.3 壳聚糖的溶解性	109
3.3.1 溶解性概述	109
3.3.2 影响因素	109
3.3.3 外加物质	114
3.4 壳聚糖的制备	118
3.4.1 制备的一般原理(结构)	118
3.4.2 甲壳素脱乙酰制备壳聚糖	121
3.4.3 资源化法制备壳聚糖	130
3.4.4 微生物法制备壳聚糖	135
3.5 壳聚糖的质量控制技术	139
3.5.1 壳聚糖脱乙酰度的测定	140
3.5.2 黏度的测定	151
3.5.3 灰分的测定	153
3.5.4 重金属含量的测定	154
3.5.5 含氮量的测定	157
3.5.6 水分的测定	158
3.5.7 微生物限量	158
3.6 纳米技术在壳聚糖中的应用	159
3.6.1 壳聚糖纳米粒的制备	160

3.6.2 壳聚糖纳米粒的特性及作用特点	167
3.6.3 载药 CS-NPs 的应用	170
参考文献	174

第四章 低聚壳聚糖及单糖衍生物

4.1 概 述	186
4.2 低聚壳聚糖的制备	186
4.2.1 化学降解法	187
4.2.2 物理降解法	192
4.2.3 酶降解法	194
4.2.4 壳寡糖的制备及壳聚糖酶水解作用分析	209
4.2.5 壳寡糖单体的制备及表征	212
4.3 分离纯化与表征方法	215
4.3.1 分离纯化方法	215
4.3.2 相对分子质量的测定	216
4.4 低聚壳聚糖的生理功能	219
4.4.1 降低胆固醇、血脂	219
4.4.2 增强免疫功能	219
4.4.3 抗肿瘤活性	219
4.4.4 抗菌活性	222
4.4.5 防治糖尿病功能	224
4.4.6 调节肠道菌群	225
4.4.7 促进药物吸收	225
4.4.8 吸湿保湿性质	225
4.5 壳寡糖的应用	225
4.5.1 壳寡糖在农业方面的应用	225
4.5.2 壳寡糖在医药方面的应用	227
4.5.3 壳寡糖在食品方面的应用	228
4.6 壳寡糖单糖及其衍生物	229
4.6.1 氨基葡萄糖盐酸盐	230
4.6.2 氯脲霉素	232

4.6.3 <i>N</i> -乙酰氨基葡萄糖	232
参考文献	233
第五章 甲壳素及壳聚糖结构衍生化产物	241
5.1 酸酯化衍生物	241
5.1.1 无机酸酯化	241
5.1.2 有机酸酯化	247
5.2 羧烷基化衍生物	257
5.2.1 羧甲基甲壳素	257
5.2.2 羧甲基壳聚糖	262
5.2.3 其他羧化衍生物	272
5.3 羟基化衍生物	278
5.3.1 羟乙基甲壳素	278
5.3.2 羟丙基甲壳素	283
5.3.3 羟乙基壳聚糖	284
5.3.4 羟丙基壳聚糖	286
5.3.5 羟丁基壳聚糖	289
5.4 烷基化及硅烷基化衍生物	291
5.4.1 烷基化甲壳素衍生物	292
5.4.2 <i>O</i> -烷基化壳聚糖	294
5.4.3 <i>N</i> -烷基化壳聚糖	298
5.4.4 <i>N,O</i> -烷基化壳聚糖	302
5.4.5 硅烷基化衍生物	302
5.5 酰化衍生物	307
5.5.1 甲壳素酰化衍生物	307
5.5.2 壳聚糖酰化衍生物	311
5.6 季铵盐衍生物	334
5.6.1 壳聚糖有机酸盐	334
5.6.2 卤代法制备壳聚糖季铵盐衍生物	340
5.6.3 季铵盐法制备壳聚糖季铵盐衍生物	342
5.7 接枝共聚反应	348

5.7.1 接枝共聚反应机理	350
5.7.2 与小分子乙烯基单体的接枝共聚	356
5.7.3 壳聚糖与大分子化合物的偶联反应	361
5.7.4 制备甲壳素 / 壳聚糖前驱体法制备接枝产物	389
5.8 氧化反应和交联反应	400
5.8.1 甲壳素与壳聚糖的氧化反应	400
5.8.2 交联反应	407
参考文献	423

第六章 甲壳素在医药领域中的应用

6.1 医用纤维和人造组织材料	431
6.1.1 吸收性手术缝合线	431
6.1.2 人造皮肤	431
6.1.3 冰硼膜	432
6.1.4 骨修复	440
6.1.5 在组织工程中的应用	441
6.2 缓释药物载体的应用	446
6.2.1 壳聚糖缓释体系	446
6.2.2 缓释载体的应用	450
6.3 甲壳素的抑菌作用	451
6.3.1 抑菌实验	452
6.3.2 实验结果	452
6.4 妇产科组织粘连的防治	455
6.4.1 粘连的发生机制	455
6.4.2 医用壳聚糖在妇产科组织粘连防治中的作用	457
6.4.3 医用壳聚糖在妇产科手术中的使用方法	458
6.5 在眼科中的应用	461
6.5.1 人工泪液	462
6.5.2 医用黏弹剂	466
6.5.3 可吸收手术缝线	469
6.5.4 防止泪道激光术后泪道黏膜粘连	469

6.5.5 抑制青光眼滤过术后纤维增生	470
6.5.6 滴眼液的增稠剂和增效剂	470
6.5.7 眼用药物长效缓释剂	470
6.5.8 角膜支架材料	471
6.5.9 展望	471
6.6 在生物医学领域的应用	471
6.6.1 甲壳素/壳聚糖天然高分子聚电解质复合物	471
6.6.2 甲壳素/壳聚糖合成高分子聚电解质复合物	486
6.7 降胆固醇和防治动脉粥样硬化作用	488
6.7.1 甲壳素/壳聚糖降胆固醇作用	488
6.7.2 甲壳素/壳聚糖防治动脉粥样硬化作用	490
6.8 抗肿瘤作用	491
6.8.1 壳聚糖的抗肿瘤作用	491
6.8.2 壳聚糖衍生物的抗肿瘤作用	492
6.8.3 壳聚糖及其衍生物作为载体的抗肿瘤作用	493
6.9 抗凝血作用	494
6.9.1 止血作用	494
6.9.2 抗凝作用	497
6.10 降血糖作用	499
6.10.1 壳聚糖及其衍生物本身的降血糖性质	499
6.10.2 壳聚糖及其衍生物用于胰岛素口服制剂	500
6.11 抗溃疡作用	501
6.12 预防龋齿作用	503
参考文献	505

第七章 壳聚糖的安全性研究

7.1 壳聚糖的一般药理研究试验	512
7.1.1 试验内容	512
7.1.2 试验方法	512
7.1.3 试验结果	512
7.1.4 结论	515

7.2	小鼠壳聚糖灌胃的最大耐受量测定	515
7.2.1	试验方法	515
7.2.2	试验结果	515
7.3	小鼠腹腔注射的急性毒性试验	516
7.3.1	试验方法	516
7.3.2	试验结果	516
7.4	壳聚糖大鼠长期毒性试验	516
7.4.1	试验方法	516
7.4.2	试验结果	517
7.4.3	结论	521
7.5	壳聚糖小鼠骨髓细胞微核试验	521
7.5.1	壳聚糖小鼠微核试验	521
7.5.2	壳聚糖 Ames 试验	522
7.5.3	壳聚糖哺乳动物培养细胞染色体畸变试验	524
参考文献		525

第八章 甲壳素清洁生产技术

526

8.1	清洁生产项目的实施背景	526
8.1.1	清洁生产的概念	526
8.1.2	甲壳素生产排污的现状	527
8.1.3	甲壳素清洁生产的意义	528
8.2	清洁生产项目的实施过程	528
8.2.1	甲壳素清洁生产工艺优化	529
8.2.2	企业生产中试现场操作说明	530
8.2.3	企业拟定甲壳素清洁生产方案	532
8.3	清洁生产中的两项重要技术创新	534
8.3.1	甲壳素清洁生产中酸浸废液的微排放	534
8.3.2	甲壳素清洁生产废水的 UASB-好氧法处理	537
参考文献		539

第一章 概述

1.1 甲壳素和壳聚糖的发现与存在

1.1.1 甲壳素和壳聚糖的发现和命名

1811年,法国一位研究自然科史的 Braconnot 教授,用温热的稀碱溶液反复处理蘑菇,最后得到一些纤维状的白色残渣,他以为从蘑菇中得到了纤维,并称之为“fungine”,意为真菌纤维素^[1]。1823年,另一位法国科学家 Odier 从甲壳类昆虫的翅膀中分离出同样的物质,他认为这是一种新型的物质,命名为“chitin”^[2]。1859年,Rouget 将甲壳素置于氢氧化钾浓溶液中,首次制得了壳聚糖(chitosan)^[3]。

“Chitin”这个词是由希腊文衍变而来的,意即“被膜、铠甲”。其在《英汉化学化工词汇》中翻译成“几丁质”、“壳多糖”、“聚乙酰氨基葡萄糖”、“甲壳质”。《辞海》称其为“甲壳质”、“甲壳素”、“壳糖”。在许多中文科技期刊文献中,除以上几种名称外,也有“几丁”、“蟹壳素”、“蟹壳多糖”、“甲壳胺”、“几丁聚糖”、“几丁糖”、“明角壳蛋白”、“明角质”、“壳蛋白”等多种叫法。多年以来,我们一直倡导将“甲壳素”作为统一命名,这较为符合天然高分子化合物的命名习惯和多数人的使用习惯。因此本书一律使用“甲壳素”的叫法。

甲壳素是一种天然高分子化合物,属于碳水化合物中的多糖,其化学名称是(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡聚糖,是由N-乙酰氨基葡萄糖以 β -1,4-糖苷键缩合而成的线性生物高分子,相对分子质量从几十万到几百万,其结构式见图1.1。

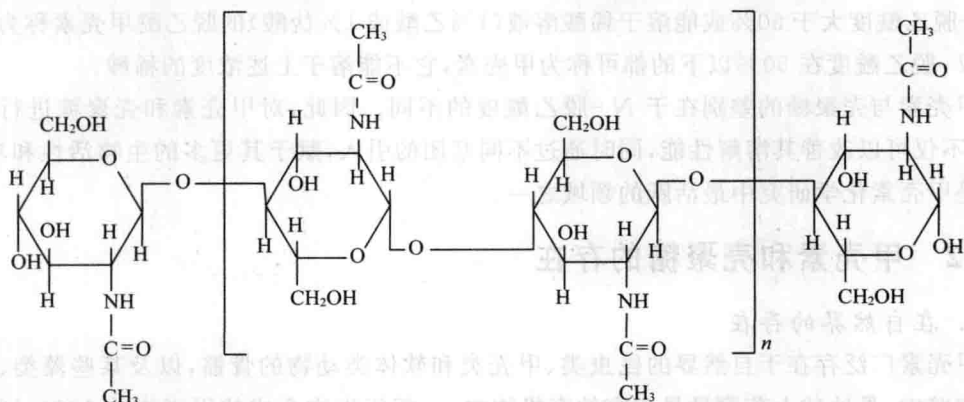


图 1.1 甲壳素的结构式