

多孔壳聚糖膜的专一性酶法制备及性能表征

董德刚, 管成, 裘梁, 乔贝贝, 潘旭兰, 王曼莹*

(江西中医药大学基础医学院, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**制备多孔医用壳聚糖膜并进行性能表征。**方法:**采用溶剂蒸发凝胶法制膜,通过内切壳聚糖酶对膜原位降解制备多孔壳聚糖膜,利用扫描电镜观察其形态,称重法检测其吸湿保湿性与酶解时间-余重关系,检测多孔壳聚糖膜对牛血清白蛋白的吸附性和对磺胺嘧啶银的控缓释性能。**结果:**壳聚糖与内切酶的比例 $0.1 \text{ g} \cdot \text{U}^{-1}$, 酶解时间 3 h, 膜表面及内部均产生了适用于药物载体的多孔结构。**结论:**通过内切酶酶解原位成孔的壳聚糖膜具有反应条件温和、致孔率可控、无毒性物质残留等优点,具有良好的应用前景。

[关键词] 专一性; 内切壳聚糖酶; 多孔; 壳聚糖膜

[中图分类号] R283.6; R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0009-04

[doi] 10.11653/syfj2013180009

Specificity Enzymatic Preparation and Performance Characterization of Porous Chitosan Membranes

DONG De-gang, GUAN Cheng, QIU Liang, QIAO Bei-bei, PAN Xu-lan, WANG Man-ying*

(School of Basic Medical Sciences, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare porous medical chitosan membranes and do their performance characterization. **Method:** Membranes were prepared by solvent evaporation gel method, degradation of chitosan enzyme to prepare porous chitosan membranes, then their morphology was observed by scanning electron microscope, weighing method was adopted to detect relationship between moisture absorption effect and hydrolysis time-remaining weight, and test adsorption of porous chitosan membranes to bovine serum albumin and controlled release properties to silver sulfadiazine. **Result:** Ratio of chitosan and endonuclease was $0.1 \text{ g} \cdot \text{U}^{-1}$, enzymolysis time was 3 h, both surface and internal of membranes generated porous structure which was suitable for pharmaceutical carriers. **Conclusion:** *In situ* endonuclease digestion of porous chitosan membranes had advantages of mild reaction conditions, pore rate controlled and non-toxic substance residues etc, which had a good application prospect.

[Key words] specificity; endo chitosanase; porous; chitosan membranes

壳聚糖化学名(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡聚糖,具有安全性高、生物相容性好、可修饰性及可塑性强^[1]等优点。壳聚糖以其氢键相互交联成网状

结构,利用适当溶剂可制成透明的薄膜或凝胶^[2]。壳聚糖膜可作为良好的医用生物敷料基质^[3-5],尤其适用于药物载体方面^[6]。支架材料中多孔结构有利于药物吸附、缓释和细胞生长、分化及迁移,制备多孔壳聚糖膜材料的方法包括使用二氧化硅^[7]、邻苯二甲酸二丁酯^[8]、聚乙二醇^[9]、琼胶固体颗粒^[10]等物质作为致孔剂,但这类方法存在空隙不均匀、残留致孔剂有毒性及脱除致孔剂过程中会损坏膜等缺陷。任东文等^[11]利用溶菌酶对壳聚糖混合膜降解,通过壳聚糖的选择性酶解原位成孔。本实验采用自制的专一性

[收稿日期] 20130215(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260604)

[第一作者] 董德刚,硕士,讲师,从事壳聚糖功能敷料的研发与利用, Tel: 13479117486, E-mail: andydau@126.com

[通讯作者] * 王曼莹,教授,博士生导师,从事生物技术研究, E-mail: wmying8888@sina.com

内切壳聚糖酶生物降解壳聚糖膜的方法制备多孔医用壳聚糖膜,具有制作周期短、反应条件温和、致孔率可控与无毒性物质残留等优点,为制备创伤敷料,人造皮肤、组织支架及药物控缓释载体提供良好的医用材料,具有一定的经济和社会效益。

1 材料

UV1102 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),BS110S 型分析天平(北京赛多利斯天平有限公司)DIF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),SN3400 型恒温培养箱(国华电器有限公司)扫面电镜(日本日立),Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

壳聚糖(脱乙酰度 91.3%,相对分子质量 1.79×10^5 Da,江西省黎川新鑫生物有限公司),壳聚糖内切酶(eCSN,自制),牛血清白蛋白(BSA,上海生工),磺胺嘧啶银(Ag-SD,国药集团化学试剂有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 内切壳聚糖酶水解产物分析 eCSN 酶活力的测定采用文献[12]的改进方法。将 1% 壳聚糖 475 μ L 和酶液 25 μ L 混合均匀,50 $^{\circ}$ C 水浴保温反应 20 min,加入 DNS 试剂 500 μ L 终止反应,沸水浴加热 5 min,冷却后加水至 5 mL,8 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,取上清液于 520 nm 处测定吸光度(A),计算还原糖的释放量(1 个酶活力单位定义为每 min 释放相当于 1 μ mol 还原糖的酶量)。以底物与酶的比例 0.1 $g \cdot U^{-1}$ 降解后,检测酶解产物组成^[13]。

2.2 壳聚糖膜的制备 配制 3% 壳聚糖乙酸溶液,过滤,置于聚氯乙烯模具中铺平,真空干燥后加 2% 氢氧化钠溶液浸泡,用水清洗至中性。常温干燥,即得透明坚韧的壳聚糖膜,厚度约 100 ~ 150 μ m,将得到的壳聚糖膜剪成直径 3 cm 的片段,密闭容器中保存待用。

2.3 多孔壳聚糖膜酶法制备 取 250 mL 烧杯 5 个,分别标记为 a,b,c,d,e,每个烧杯中加入 1 片壳聚糖膜,加水 50 mL,置于 50 $^{\circ}$ C 恒温箱中,待壳聚糖膜充分吸水后,各加入酶液(含 3 U eCSN)60 μ L,分别于 0,1,2,3,4,5 h 取出降解后的壳聚糖膜,迅速用水清洗多遍,以去除残留 eCSN,常温下干燥,存于密闭容器中,采用 TLC 检测产物组成,见图 1。计算壳聚糖膜经 eCSN 降解后失重,结果显示壳聚糖膜质量剩余率分别为 100%,96%,91%,82%,61%,55%,各种膜材料均保持完整,外观无明显变化,表明壳聚糖膜中高相对分子质量壳聚糖被 eCSN 降解

为低相对分子质量壳聚糖并最终降解为溶于水的壳寡糖。将壳聚糖膜的表面喷金处理后,扫描电镜观察其表面形态,见图 2。

$$\text{失重} = (M_0 - M_1) / M_0 \times 100\%$$

式中 M_0 为壳聚糖膜降解前质量, M_1 为降解后质量。

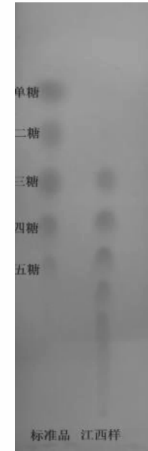
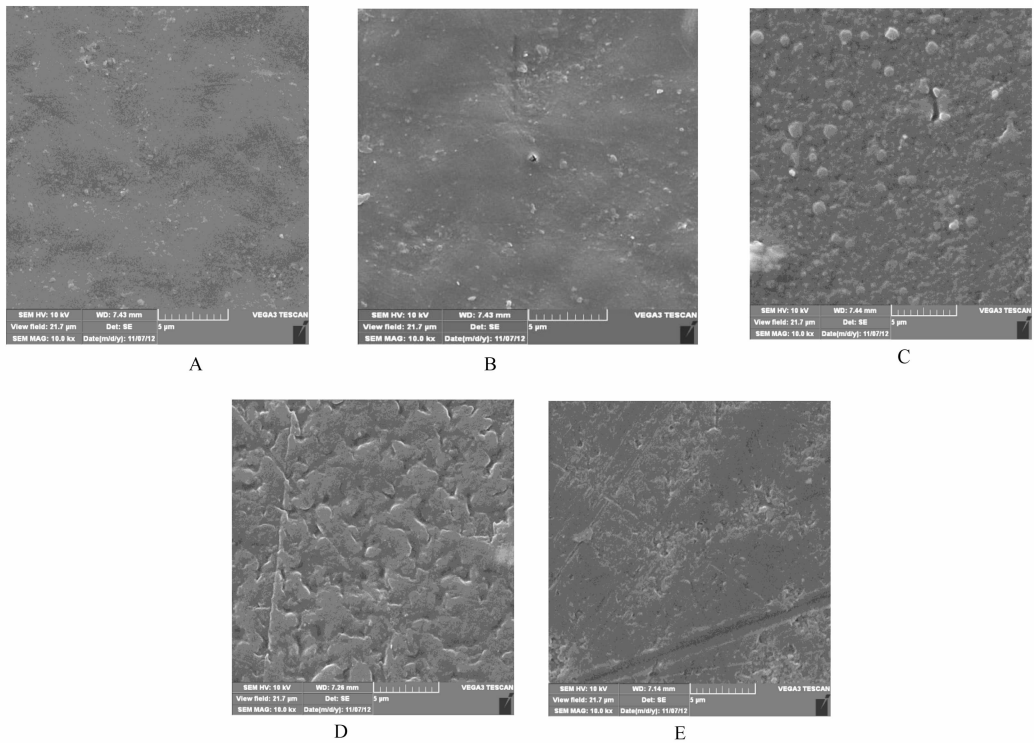


图 1 壳聚糖酶解 2 h 后产物的 TLC

由图 1 可知,降解产物无单糖和二糖,且分散度低,说明可用于膜的专一性酶法原位降解制备多孔壳聚糖膜。图 2 显示壳聚糖膜中壳聚糖大分子被 eCSN 降解的产物溶于水,其原位留下了多孔结构;壳聚糖膜在降解 2 h 后形貌发生了显著变化,3 h 后孔的形成在表面非常明显,说明壳聚糖膜适用于制备控缓释药物载体,4 h 时膜的表面呈片层结构,显示空隙不明显。

2.4 壳聚糖膜的吸湿、保湿性能 采用称重法检测。称取干燥后壳聚糖多孔膜,置于一定潮湿度(RH 75%)封闭空气环境中,每隔一段时间测定湿膜质量,计算吸湿率,见表 1,表明 3 种壳聚糖膜均具有吸湿能力,随着时间的推移,膜的吸湿率总体呈上升趋势,3 种膜的吸湿率无明显差异。将壳聚糖膜干燥后称重,用水浸湿、溶胀后用滤纸吸去表面水分后称重,置于一定潮湿度(RH 43%)封闭空气环境中,每隔一段时间测定湿膜质量,计算保湿率,见表 1,发现 3 种壳聚糖湿膜中水分均在 0 ~ 15 h 内大量失去,3 种膜的保湿率无明显差异。壳聚糖膜分子上羧基互斥性及羟基亲水性,使其具有较强的吸湿、保湿性,可保持创面湿润,有利于微环境的建立,促进创面愈合。

2.5 壳聚糖膜的吸附性能 选择牛血清白蛋白(BSA)为目标蛋白,检测多孔膜的吸附性能。分别剪取并称取 3 种干燥膜 0.05 g,分别置于 50 mL 锥



A. 酶解 0 h; B. 酶解 1 h; C. 酶解 2 h; D. 酶解 3 h; E. 酶解 4 h

图 2 壳聚糖膜酶解后 SEM 表征

表 1 不同多孔壳聚糖膜吸湿率和保湿率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

%

t/h	吸湿率			保湿率		
	酶解 0 h	酶解 3 h	酶解 4 h	酶解 0 h	酶解 3 h	酶解 4 h
0	0	0	0	230	250	236
4	39 ± 2	40 ± 8	43 ± 4	201 ± 12	200 ± 4	205 ± 10
8	51 ± 7	79 ± 9	75 ± 10	182 ± 5	168 ± 8	172 ± 9
10	45 ± 4	50 ± 7	51 ± 7	150 ± 4	138 ± 7	140 ± 6
12	65 ± 12	62 ± 4	82 ± 5	119 ± 14	110 ± 12	108 ± 5
14	70 ± 13	72 ± 13	48 ± 8	90 ± 15	90 ± 8	91 ± 9
16	59 ± 6	65 ± 15	57 ± 11	79 ± 17	80 ± 5	82 ± 13
18	75 ± 5	70 ± 10	72 ± 7	60 ± 11	59 ± 12	61 ± 14

形瓶中,各加 $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液 15 mL (pH 5.5 的 PBS 溶解),放入 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床中 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡,吸附过夜后取上清液,于 280 nm 处测定 A, 计算 BSA 吸附量,见表 2。结果表明 3 种膜均对 BSA 的吸附具有明显的动力学性征,开始吸附速率较快,随着时间的延长呈规律性减小,8 h 后基本趋于饱和。因为 BSA 分子在开始时主要表现为膜表面富集,吸附较快;溶液中 BSA 浓度逐渐减小,同时膜表面 BSA 分子沿微孔向内部扩散,扩散阻力逐渐增强,吸附速率受扩散影响,吸附速率减慢;吸附后期主要在膜内表面吸附,已基本达到饱和和吸附量,此时膜与溶液中 BSA 浓度达平衡。饱和时 3 种膜对 BSA 的

最大吸附量差异较大,因为酶解致孔增大了膜的总表面积,吸附量也相应较大。

表 2 不同壳聚糖膜对 BSA 的吸附量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

t/h	酶解 0 h	酶解 3 h	酶解 4 h
0	0	0	0
2	24 ± 8	42 ± 11	30 ± 7
4	41 ± 9	63 ± 7	56 ± 5
8	73 ± 12	93 ± 8	87 ± 6
12	76 ± 10	99 ± 11	88 ± 9
16	77 ± 7	98 ± 9	88 ± 10
20	77 ± 3	99 ± 10	90 ± 7

2.6 壳聚糖膜对药物控释性能检测 选择 Ag-SD 为研究对象,检测其体外控释性能,采用 HPLC 测定 Ag-SD 含量^[14],结果显示纯壳聚糖膜体外释放 5 h 后,Ag-SD 含量基本不变,说明该条件下药物在 6 h 后基本释放完全,而多孔壳聚糖膜体外释放 7.5 h 后,药物含量才基本不变,说明多孔壳聚糖膜控制药物释放能力明显高于纯壳聚糖膜,且膜上残余的壳聚糖能更好地协同促进创面愈合,见图 3。

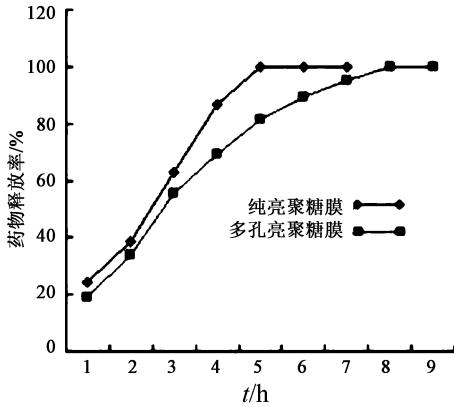


图 3 纯壳聚糖膜与多孔壳聚糖膜药物缓释能力比较

3 讨论

利用专一性壳聚糖内切酶对壳聚糖的高效降解作用得到具有纳米结构的多孔膜,该方法反应条件温和且无毒性物质残留,可获得低分散度壳聚糖。单一的多孔壳聚糖膜干燥后,表现为自然卷曲,形态与密封性上不甚理想,可尝试添加甘油、明胶及赋形剂制备成适用于食品保鲜及创面促愈的复合型敷料;壳聚糖的相对分子质量也是评价壳聚糖膜质量的重要指标,理论上,壳聚糖相对分子质量大不利于其自然降解,相对分子质量过小不利于其成膜性与抗菌性。

[参考文献]

[1] 钱程.壳聚糖纤维医用敷料的生产及应用[J].纺织学报,2006,27(11):100.
[2] 胡先文,王清环,胡文进.壳聚糖/琼脂复合凝胶的制备与药物缓释性能[C].潜江:中国第二届国际和海

峡两岸甲壳素研讨会暨第七届甲壳素科学技术会议论文集,2010:155.

[3] Mi F L, Wu Y B, Shyu S S, et al. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release[J]. J Memb Sci, 2003, 212(1/2): 237.
[4] Sung J H, Hwang M R, Kim J O, et al. Gel characterisation and *in vivo* evaluation of minocycline loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan[J]. Int J Pharm, 2010, 392(1/2): 232.
[5] Jeon Y J, Shahidi F, Kim S K. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods[J]. Food Res Int, 2000, 16(2): 159.
[6] 赵志宇,郭兰,王小波,等.槲皮素壳聚糖复合膜治疗大鼠口腔溃疡的研究[J].中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 161.
[7] ZENG X F, Ruckenstein E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes [J]. Ind Eng Chem Res, 1996, 35(11): 4169.
[8] 马晓莉,姚子华.医用多孔壳聚糖膜的制备及性能研究[J].功能高分子学报,2005,18(3):434.
[9] ZENG M F, FANG Z P, XU C W. Effect of compatibility on the structure of the microporous membrane prepared by selective dissolution of chitosan/synthetic polymer blend membrane[J]. J Memb Sci, 2004, 230(1/2): 175.
[10] 王学宝,林丹,王贤亲,等.多孔壳聚糖膜的制备表征及其吸附性能研究[J].广州化工,2010,38(6):128.
[11] 任东文,衣洪福,包德才,等.制备多孔壳聚糖膜的新方法:选择性酶解原位成孔[J].功能材料,2006,37(3):462.
[12] 游清徽.壳聚糖酶的研制及酶法生产壳寡糖[D].南昌:江西师范大学,2006.
[13] 陈小娥,方旭波,余辉,等.壳寡糖的薄层层析分析[J].浙江海洋学院学报,2008,27(4):361.
[14] 吴继禹,王志强,黄学荪.磺胺嘧啶银涂剂两种含量测定方法的比较研究[J].海峡药学,2010,22(3):41.

[责任编辑 全燕]