

猪皮胶原海绵的冷冻干燥工艺

杨田义¹, 郭柏松², 张路¹, 代龙^{1*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 上海东富龙科技股份有限公司, 上海 201109)

[摘要] 目的: 优选猪皮胶原海绵的最佳冷冻干燥工艺。方法: 以吸水性、复水性值为指标, 通过正交试验法对猪皮胶原海绵的冷冻干燥工艺参数进行筛选, 优选出猪皮胶原海绵的最佳冷冻干燥工艺。结果: 预冻速率 $0.35\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 预冻时间 1.5 h, 预冻最低温度 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 一次升华温度 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。结论: 优选的冷冻干燥工艺制备的猪皮胶原海绵疏松多孔, 吸水性、复水性良好。

[关键词] 猪皮胶原海绵; 冷冻干燥; 工艺研究

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0035-03

Studies on Collagen Sponge Freeze-drying Process

YANG Tian-yi¹, GUO Bai-song², ZHANG Lu¹, DAI Long^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;
2. Shanghai Tofflon Science and Technology Co. Ltd., Shanghai 201109, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize selection of collagen sponge freeze-drying process, such as collagen protein molecules of freeze-drying reference. **Method:** Orthogonal test was used to choose the best collagen sponge freeze-drying process with water imbibition and re-hydration values as index. **Result:** The rate of pre-freezing was $0.35\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, the duration of pre-freezing was 1.5 h, the lowest temperature of pre-freezing was $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the temperature of the first sublimation was $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Conclusion:** The pigskin collagen sponge produced by the freeze-drying process which has been chosen is osteoporosis and porous, the water imbibition and re-hydration of the pigskin collagen sponge are well.

[Key words] collagen sponge; freeze-drying; technology research

胶原是人和动物的主要结构蛋白, 在人体内约占蛋白总量的 1/3, 具有促进凝血和加速创面愈合的作用^[1-2]。从猪皮中提取、纯化胶原, 通过合理的冷冻干燥工艺制得的猪皮胶原海绵不仅能保留猪皮胶原的生理活性, 而且疏松、多孔的物理形态有助于增强其止血、创面愈合作用, 临床上胶原海绵已经作

为Ⅲ类医疗器械用于创面止血。冷冻干燥工艺直接影响猪皮胶原海绵的物理形态, 进而影响其止血、创面愈合作用, 本实验以最能反映海绵剂物理形态的吸水性、复水性值为指标优选猪皮胶原海绵的最佳冷冻干燥工艺。

1 仪器与试剂

LYO-0.2 实验型冷冻干燥机(上海东富龙科技股份有限公司); 冷冻干燥显微镜系统(Biopharma Technology Limited 公司); S-520 扫描电子显微镜(日本日立公司); 透析袋(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20090629, 相对分子质量 8 000 ~ 14 000); YX-1000A 万用电表(上海精益)。

猪皮胶原溶液(自制, 质量浓度 1%); 胃蛋白酶(上海蓝季科技发展有限公司, 批号 090505, 酶活力

[收稿日期] 20100617(010)

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划(2008BA153B073)

[第一作者] 杨田义, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药新药开发、中药制剂与新剂型, Tel: 15169046272, E-mail: tianyi_yang@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 代龙, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药药剂新技术、新剂型, Tel: 0531-82960689, E-mail: dailongdailong@263.net

1:3 000);冰乙酸、碳酸钠、氯化钠等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 猪皮胶原溶液的制备^[3] 取猪皮适量,加入适当浓度的碳酸钠溶液浸泡,弃去碱液,蒸馏水漂洗至中性,加入含胃蛋白酶的乙酸溶液酶解,酶解液加氯化钠溶液盐析即得猪皮胶原,所得猪皮胶原加入适量蒸馏水使其充分分散,透析,调整质量浓度为 1%,即得猪皮胶原溶液。

2.2 猪皮胶原海绵冷冻干燥工艺的研究

2.2.1 猪皮胶原溶液共晶点的测定^[4] 取猪皮胶原溶液 100 mL,置于冷冻干燥机内,测定猪皮胶原溶液降温过程中的电阻值,并绘制猪皮胶原溶液电阻值与温度的关系曲线,结果见图 1,猪皮胶原溶液的电阻值在温度 -15 ℃ 左右时急剧升高。

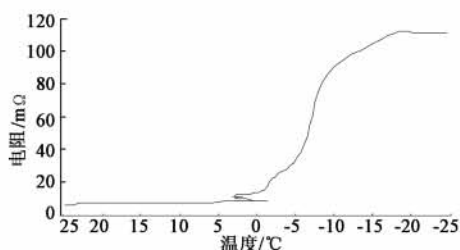


图 1 降温过程中猪皮胶原溶液电阻值与温度的关系曲线

2.2.2 猪皮胶原溶液共熔点的测定 取猪皮胶原溶液 100 mL,置于冷冻干燥机内,测定猪皮胶原溶液升温过程中的电阻值,并绘制猪皮胶原溶液电阻值与温度的关系曲线,结果见图 2,猪皮胶原溶液的电阻值在温度 -5 ℃ 左右时急剧降低。

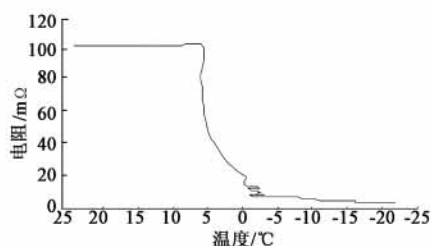


图 2 升温过程中猪皮胶原溶液电阻值与温度的关系曲线

2.2.3 猪皮胶原溶液塌陷温度的测定 取猪皮胶原溶液少许,置于冷冻干燥显微镜系统的载物台上,-30 ℃ 预冻 30 min,慢慢升温(1 ℃·min⁻¹),观察猪皮胶原的状态,记录开始塌陷时的温度。连续测定 3 次,结果猪皮胶原溶液的塌陷温度平均值 0.75 ℃,RSD 2.7%。

2.2.4 正交试验筛选

2.2.4.1 因素水平的确定 冷冻干燥过程中预冻速率、预冻时间、预冻最低温度、一次升华温度对猪皮胶原海绵的成型起主要作用,参考 2.2.1 项、2.2.2 项、2.2.3 项下测得的共晶点、共熔点、塌陷温度建立因素水平表,结果见表 1。

表 1 冷冻干燥过程 L₉(3⁴) 正交试验法因素水平

水平	A 预冻速率 / ℃·min ⁻¹	B 预冻时间 /h	C 预冻最低 温度/ ℃	D 一次升华 温度/ ℃
1	0.35	0.5	-45	-15
2	0.70	1.0	-35	-10
3	1.05	1.5	-25	-5

2.2.4.2 评价指标的确定 本研究以得到疏松、多孔的海绵为目的,选择最能反映海绵剂成型状态的吸水性、复水性值为评价指标。吸水性较复水性(复水性是指充分吸水的海绵被挤干后再次吸水的能力)更能反映猪皮胶原海绵的成型状态,权重系数分别取 0.6 和 0.4,分别把 2 项最好的指标定为 100 分,则各实验结果的综合评分 $Z = [(100 - \text{吸水性最高值}) + X] \times 0.6 + [(100 - \text{复水性最高值}) + Y] \times 0.4$ (Z 为各试验的综合评分; X 为各试验的吸水性值; Y 为各试验的复水性值)。

$$\text{吸水性值} = (\text{充分吸水的海绵质量}) / (\text{未吸水的海绵质量})$$

$$\text{复水性值} = (\text{二次吸水的海绵质量}) / (\text{未吸水的海绵质量})$$

2.2.4.3 正交试验及结果 选取 2.2.4.1 项下的因素水平进行正交试验,结果见表 2。

表 2 冷冻干燥正交试验

No	A	B	C	D	吸水性值	复水性值	综合评分
1	0.35	0.5	-45	-15	30	29	95.2
2	0.35	1.0	-35	-10	36	31	99.6
3	0.35	1.5	-25	-5	31	28	95.4
4	0.70	0.5	-35	-5	26	24	90.8
5	0.70	1.0	-25	-15	22	20	86.8
6	0.70	1.5	-45	-10	29	27	93.8
7	1.05	0.5	-25	-10	20	19	85.2
8	1.05	1.0	-45	-5	31	22	93
9	1.05	1.5	-35	-15	30	26	94
K ₁	290.2	271.2	282.0	276.0			
K ₂	271.4	279.4	284.4	278.6			
K ₃	272.2	283.2	267.4	279.2			
R	18.8	12.0	17.0	3.2			

极差结果表明,A 为主要因素,C 为次要因素,D 极差最小设为误差项,进行方差分析,因素 A、C 有显著意义,其他因素均无显著意义。为提高干燥效

率、节省成本确定 D_2 为最优水平则最佳工艺 $A_1B_3C_2D_2$,即预冻速率 $0.35\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,预冻时间 1.5 h ,预冻最低温度 $-35\text{ }^\circ\text{C}$,一次升华温度 $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 。

表3 综合评分方差分析

因素	SS	f	F	P
A	75.34	2	39.06	<0.05
B	25.08	2	13	
C	56.44	2	29.26	<0.05
D(误差)	1.93	2	1	

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

2.2.5 验证试验 按照最佳工艺 $A_1B_3C_2D_2$ 进行3次试验,测定猪皮胶原海绵的吸水性、复水性值,计算综合评分,扫描电子显微镜观察猪皮胶原海绵的网孔结构,结果见表4,图3,3次验证试验所得猪皮胶原海绵疏松多孔,吸水性、复水性良好,该工艺可行。

表4 验证试验数据

No.	吸水性值	复水性值	综合评分
1	36	32	100
2	37	31	100.2
3	35	33	99.8

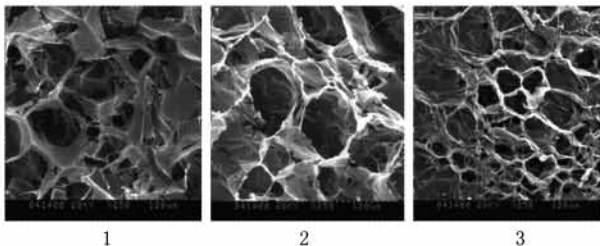


图3 3批猪皮胶原海绵扫描电镜图片

3 讨论

目前在冷冻干燥工艺方面对抗生素类等小分子的研究较多,对猪皮胶原等大分子蛋白类的研究较少,而且对冷冻干燥工艺的研究大都以干燥为目的,并未考虑成型;本研究则以得到干燥、疏松、多孔,吸水性、复水性良好的海绵为目的,兼顾了干燥和成型,为猪皮胶原等大分子蛋白类冷冻干燥工艺的研究提供了参考。

在冷冻干燥工艺的研究中要明确3个易混淆的基本概念:共晶点、共熔点、塌陷温度。

含水物质的导电性主要是通过溶液中的带离子定向移动实现的,当物料中的水分被完全冻结,带离子也随之被固定下来,不能自由移动,物料的导电能力因而显著下降,此时物料的电导急剧增加^[4]。利用这一原理,测量物料降温冻结过程中电阻值的

变化,其中电阻值变化最为剧烈时对应的温度即为物料的共晶温度。本实验中猪皮胶原溶液的电导值在 $-15\text{ }^\circ\text{C}$ 左右时急剧升高,因此猪皮胶原的共晶点温度 $-15\text{ }^\circ\text{C}$ 。

固态混合溶液在升温熔化过程中,当达到某一温度时,固体中开始出现液态,电阻值会急剧下降此温度称为溶液的共熔点。本试验中猪皮胶原溶液的电导值在 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 左右时急剧下降,因此猪皮胶原的共熔点温度 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 。压强对溶液共熔点的影响不大,常压下测得的猪皮胶原溶液的共熔点温度对真空状态下一次升华温度的确定能够起到指导作用。

猪皮胶原溶液在一次升华过程中,当温度达到某一临界值时,固体基质的刚性不足以维持蜂窝状结构,空穴的固形物基质将发生塌陷,原先蒸汽扩散的通道被封闭,此临界温度称为崩解温度或塌陷温度。

通过测定样品的共晶点、共熔点、塌陷温度,为冷冻干燥过程中预冻最低温度、一次升华温度的确定提供参考。预冻最低温度需低于共晶点温度 $10\sim 15\text{ }^\circ\text{C}$,一次升华温度不得高于共熔点温度和塌陷温度,结合生产效率、生产成本对冷冻干燥参数进行优化。

对于预冻速率快慢与成型的关系曾有研究认为:快速冻结法产生的冰晶小、间隙小;缓慢冻结法产生的冰晶大、间隙大^[5],但本实验发现,快速冻结法所得的海绵有较大的裂痕,间隙大;而缓慢冻结法所得的海绵无裂痕、间隙小。此现象可能与胶原等大分子的不同特性有关,至于其机制还要在以后的研究中进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 李国英. 猪皮胶原的生理作用[J]. 中国皮革,2002,31(19):20.
- [2] 刘杰,王德文,彭瑞英,等. 人工猪皮胶原膜对大鼠皮肤创伤促愈作用的研究[J]. 军事医学科学院院刊,2001,25(4):280.
- [3] 韩德权,金明姬,吴桐,等. 猪皮胶原粉的制备工艺及功能特性研究[J]. 食品科学,2009,30(10):60.
- [4] 李心刚,胡桂秋,黄晶. 冷冻干燥工艺中预冻温度的确定[J]. 承德石油高等专科学校学报,2005,7(4):19.
- [5] 钱应璞. 冷冻干燥制药工程与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:8.

[责任编辑 全燕]